

AKÜ FEMÜBİD 22 (2022) 035701 (654-661)

AKU J. Sci. Eng. 22 (2022) 035701 (654-661)

DOI: 10.35414/akufemubid.1027082

Araştırma Makalesi / Research Article

Elektroçirime Yöntemi ile Antitüberkülostatik İlaç Yüklü Nanofiber Üretimi ve Karakterizasyonu

Hilal İrem ONURLU^{1,2}, Dilek BİLGİÇ ALKAYA^{1,2,4*}, Serap AYZ SEYHAN^{1,2,4}, Sümeyye CESUR⁴, Oğuzhan GÜNDÜZ^{3,4}

¹Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul /Türkiye

²Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, İstanbul/Türkiye

³Marmara Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Metalürji Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye

⁴Marmara Üniversitesi Nanoteknoloji Biyomalzeme Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

Sorumlu Yazar: e-posta: dbilgic@marmara.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7837-0250>
e-posta: onurluirem@gmail.com ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4298-2992>
e-posta: sayaz@marmara.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5908-2766>
e-posta: sumeyyecsr@gmail.com ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5050-1303>
e-posta: oguzhan@marmara.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9427-7574>

Geliş Tarihi: 24.11.2021

Kabul Tarihi: 09.06.2022

Öz

Bu çalışma, Tüberküloz hastalarında antitüberküloz ilaçların etkili kombine formülasyonlarının üretilmesindeki zorluklar nedeniyle yeni kombinasyon formülasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla tasarlanmıştır. Bunun için tedavide etkin antitüberkülostatikler olan pirazinamid, izoniazid, rifampisin ve etambutol biyolojik olarak parçalanabilen polikaprolakton (PCL), nanofiberlere yüklenmiş, böylelikle mevcut yan etkilerinin azaltılması da hedeflenmiştir. *Mycobacterium Tuberculosis* basiline karşı etkin bir tedavi için çalışmada etken maddelerin elektroçirime yöntemiyle polimerik nanofiber formasyonları içine yüklenmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PCL polimeri DMF:THF (1:1 w/w) karışımı içinde çözülmüş ve homojen bir çözelti verecek şekilde Tween 80 (%1) eklenmiştir. Elde edilen çözülden elektroçirime yöntemi ile lifler elde edilmiştir. Sistem, farklı konsantrasyon ve voltajlar (17 kV, 20 kV, 23 kV, 26 kV ve 29 kV) uygulanarak optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmasında, %12 konsantrasyonda hazırlanan çözülden en uygun PCL fiber yapısı elde edilmiştir. Sistem optimizasyonu sonunda 4 farklı etken maddenin 20 kV, 1.0 ml/h akış hızı, 18 cm plaka mesafesi koşullarında metanol içerisinde çözeltilerinde tek tek ve kombinasyonları halinde fiber ile kaplanması sağlanmıştır. Çözeltilerinin elektriksel iletkenliği, yüzey gerilimi, yoğunluk ve viskozite özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra, elektroçirime yöntemiyle elde edilen nanofiberlerin karakterizasyon amacıyla SEM görüntüleri alınmış ve ilaç salınımı in vitro olarak incelenmiştir. İlaç salımı pH: 7.4 fosfat tamponu ile gerçekleştirilmiş ve salım UV spektrofotometresi ile analiz edilmiştir. İlaç kaplı liflerden ilaç salımı, uzun süreli ve kontrollü bir şekilde sağlanmıştır.

Anahtar kelimeler

Antitüberküloz;
Elektroçirime;
Polikaprolakton;
İlaç Salım

Production and Characterization of Antituberculostatic Drug-Loaded Nanofibers by Electrospinning Method

Abstract

This study was designed to evaluate new combination formulations because of the difficulties in producing effectively combined formulations of antituberculosis drugs in tuberculosis patients. For this, pyrazinamide, isoniazid, rifampicin, and ethambutol, which are effective antituberculostatics in treatment, are loaded on biodegradable polycaprolactone nanofibers, thus reducing the existing side effects. Loading of active ingredients into polymeric nanofiber formulations by electrospinning method in the study for an effective treatment against *Mycobacterium Tuberculosis bacillus*. For this, polycaprolactone (PCL) polymer prepared at different concentrations was dissolved in DMF: THF (1:1 w/w) mixture, and Tween 80 (1%) was added to give a homogeneous solution. Nanofibers were obtained from the solution obtained by the electrospinning method. The system was optimized by

Keywords:

Antituberculosis;
Electrospinning;
Polycaprolactone; Drug
Release.

applying different concentration voltages (17 kV, 20 kV, 23 kV, 26 kV, and 29 kV). In the system optimization study, the most suitable PCL nanofiber structure was obtained from the solution prepared at 12% concentration. At the end of the system optimization, 4 different active substances were coated with fiber individually or in combinations in their solutions in methanol at 20 kV, 1.0 ml/h flow rate, 18 cm plate distance conditions. The electrical conductivity, surface tension, density, and viscosity properties of the solutions were determined. Then, SEM images were taken for characterization of nanofibers obtained by electrospinning method, and drug release was investigated in vitro. Drug release was performed with pH: 7.4 phosphate buffer and release were analyzed by UV spectrophotometer. Drug release from drug-coated nanofibers was achieved in a long-term and controlled manner.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

Tüberküloz, başta akciğer olmak üzere vücutta diğer organlarda da görülebilen Mycobacterium Tuberculosis isimli bir basilin neden olduğu bulaşıcı bir hastalıktır. Hastalığın ilk zamanlarında tek bir ilaçla başlayan tedavi daha sonraları basilin direnç kazanmasıyla yetersiz kalmıştır. Ayrıca tek ilaç tedavisi ile uzun süren tedavi kürlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle tedavide ikili, üçlü ilaç kombinasyonlarının kullanılması hatta primer ilaç direnci % 4 ün üzerinde ise tedaviye dördü ilaç kullanımı uygun görülmektedir. Şu anda kişiler için tedavinin temeli komplike olmayan tüberküloz ile 6 aylık bir rejimdir. 2 aylık izoniazid, rifampisin, etambutol ve pirazinamid tedavisini takiben 4 ay izoniazid ve rifampisin tedavisi devam etmektedir. Uzun süreli ve tam kür sağlamayan tedavilerden tam kürün elde edildiği daha kısa süreli tedavi için çoklu ilaç kullanılmaya başlanmasıyla kombine kullanılan etken madde tayinine ilişkin çalışmalar hız kazanmıştır. Tedavide ilaçların aktivitesinin arttığı ve basile karşı etkin olduğu çalışmalar ile de desteklenmiştir (Espinosa-Mansilla *et al.* 2001, Prasad and Singh 2010, Srivasta 2012, Fang 2018, Vasava *et al.* 2019, Smith and Fredericks 1999). Ancak kombine formülasyonların üretilmesinde çözünme özellikleri gibi zayıf biyoyararlanım gösterebilmesinden dolayı zorluklar yaşanmaktadır (Cavenaghi 1989). Ayrıca bu tedavide hasta tarafından sık dozlama yapılması gerekmekte ve bu da bunlara bağlılığın zayıf olmasına yol açmaktadır. Hasta üzerinde çeşitli yan etkilere ve toksisiteye sebep olması da kullanımda dezavantaj olmaktadır (Janim 2007, Tafozoli 2008). Bu nedenle, uzun etkili implantlar ve sistemler, ilaç dağıtımı için dozlama sıklığını azaltabilen ve hasta uyumunu iyileştirebilen ve dolayısıyla tedavinin etkinliğini artıran yeni

yöntemler olarak değerlendirilmektedir. Elektroçirime yöntemi ile oluşturulan polimer yapıları nanofiberlerin enkapsülasyonunun etken madde salınımindaki etkisinden dolayı kontrollü ilaç salınımindaki önemli bir yeri vardır (Pitt 1990, Soppmath *et al.* 2001, Repanas ve Glasmacher 2015, Schlesinger 2015). Bu konuda yapılan in vitro çalışmalarda etken maddelerin fiber yapıları farklı kombinasyonlarla yüklenmesi ve daha sonra kontrollü olarak salım sağladığı bildirilmiştir (Hu 2015, Hassounah *et al.* 2016, Hivechi 2019, Carneiro *et al.* 2019, PamDnh 2015, Rajaschar 2020). İkili ve üçlü etken madde yüklemelerinin yapıldığı çalışmalar incelenmiş ancak literatür araştırmasında tedavide birinci basamak ilaç olarak kullanılan rifampisin, izoniazid, pirazinamid ve etambutolün aynı anda ve kombinasyonları halinde PCL nanofiber yapıya yüklendiği ve salımlarının yapıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle rifampisin, izoniazid, pirazinamid ve etambutol etken maddelerini, biyodegradasyona uğrayabilen bir nanofiber yapısı üretecek olan metodu oluşturularak elde edilen fiberlere bu ilaç kombinasyonlarının yüklenmesi amaçlanmıştır. Nano yapıların içerisine yüklenen ilaçların salımları, nanofiberlerin yüzey alanının geniş olmasından dolayı etkili bir şekilde etkin madde salımı sağlaması sebebiyle daha kontrollü bir ilaç salınımı imkanı sunmaktadır. Bu bilgiler ışığında in vitro olarak salım çalışması da pH 7,4 ortamında ince bağırsak ortamındaki ilaç salınımı spektrofotometrik yöntemle in vitro ortamda incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Polikaprolakton (PCL, Sigma Aldrich): ($C_{6n}H_{10n}O_{2n}$) molekül ağırlığı 80000 g/mol' dür. Model ilaç olarak kullanılan Rifampisin ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, molekül ağırlığı, 822,94 g/mol); İzoniazid ($C_6H_7N_3O$ molekül

ağırlığı 137,14 g/mol); Pirazinamid ($C_5H_5N_3O$, molekül ağırlığı 123,11 g/mol) ve Etambutol ($C_{10}H_{24}N_2O_2 \cdot 2HCl$), molekül ağırlığı 204,31g/mol) Sigma Aldrich firmasından satın alınmıştır.

2.1 Polimer Çözeltisi Hazırlama

Elektroegirme işlemi öncesinde en uygun fiberi elde etme amacıyla farklı konsantrasyonlarda PCL çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti konsantrasyonları sırasıyla %3, %6, %9, %12 ve %15 olmak suretiyle çözücü olarak DMF ve THF (v/v 1:1) kullanılmıştır. Ağırlıkça hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında manyetik balık kullanılarak 2 saat boyunca, 400 rpm hızında karıştırılarak, oda sıcaklığında, polimer yapısı, çözücü karışımının içerisinde tamamen çözünene ve homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon için en uygun fiberi elde etme amacıyla yapılan çalışma sürecinde en ince ve temiz SEM görüntülerine sahip fiberlerin gözlemlendiği polimer konsantrasyonu Tween 80'li olarak tekrar denenmiştir. Tartımı alınan polimer, DMF:THF (1:1 v/v) de 2 saat boyunca, oda sıcaklığında, 400 rpm hızla çözüldükten ve homojen bir çözelti elde edildikten sonra ağırlıkça %1 oranında Tween 80 ilave edilmiş ve 10 dakika kadar daha karıştırılma işlemine devam edilmiştir. Sonrasında 17 kV- 29 kV parametre çalışmasında fiber elde etme amacıyla elektrospin atışları yapılmıştır.

2.2 İlaç Yüklü Polimer Çözeltileri Hazırlama

Hazırlanan PCL nanofiber yapıları öncelikli olarak ilaçlar tek tek yüklenmiştir. Tek tek yüklenen ilaçların öncelikli olarak stok çözeltileri hazırlanmıştır. Rifampisin, izoniazid, pirazinamid ve etambutol için uygun çözücü olarak metanol seçilmiştir. Seçilen çözücü polimerin yapısını bozmamakla beraber, ilaç etkin maddelerinin kolaylıkla çözünmesini sağlamaktadır. Çözünen etkin madde çözeltilerinden ağırlıkça 0,3 mg olmak suretiyle alınıp, hazırlanan polimer çözeltisine karıştırma işleminin başında ilave edilmektedir. Bu sayede ilaç etkin maddesinin polimerin dış yüzeyine daha iyi kaplanması ve dolayısıyla daha homojen bir dağılım amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmada,

polimer yapıya ilaç yüklemeleri sırasıyla, rifampisin, izoniazid, pirazinamid ve etambutol olarak tek tek ve bunun akabinde öncelikli olarak rifampisin ve izoniazid sonrasında rifampisin, izoniazid ve pirazinamid, en son yapılacak olan çalışmada ise bu dört adet ilaç etkin maddenin birlikte polimerin yapısına yüklemesi yapılmıştır.

2.3 Çözeltilerin Fiziksel Karakterizasyonu

Hazırlanan çözeltilerinin fiziksel karakterizasyonunu belirlemek için yoğunluk, elektriksel iletkenlik, yüzey gerilimi ve viskozite değerleri ölçülmüştür. Yoğunluk standart 10 ml'lik bir şişe kullanılarak ölçüldü. Elektrik iletkenliği Cond 3110 SET 1, WTW ;yüzey gerilimi Sigma 703D, Attention kullanılarak ölçülmüştür. Viskozite ise DV-E, Brookfield AMETEK, cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

2.4 Elektroegirme Yöntemiyle Nanofiberlerin Üretimi

Nanofiberleri hazırlamak için bu çalışmada 10 ml'lik plastik şırınga, yüksek voltajlı güç kaynağı, şırınga pompası (NE-300, New Era Pump Systems, Inc.) kullanılmıştır. Belirtilen elektroegirme prosedürü için laboratuvar ölçekli bir elektroegirme ünitesi (NS24, Inovenso Co.) kullanılmıştır. Elektrospinlemeden önce hazırlanan çözeltiler bir şırıngaya çekilmiştir. Şırınga, çözelti akış hızını kontrol etmek için şırınga pompasına yerleştirilmiş bundan sonra hem iğnenin ucu hem de toplayıcı yüksek voltajlı bir güç kaynağına bağlanarak dairesel toplayıcı, nanofiberleri toplamak için bir kağıtla kaplanmış olan iğne ucundan 18 cm uzağa yerleştirilmiştir. Çözeltinin akış hızı 1 ml/saat olarak belirlenmiştir. Fiber optimizasyon çalışmasında değiştirilen ve etkisi gözlemlenen bir diğer parametre olarak kV seçilmiştir. Sırası ile fiber atışları yapılırken uygulanan kilovolt şiddetleri, 17 kV, 20 kV, 23 kV, 26 kV ve 29 kV olarak belirlenmiştir.

2.5 Tüberküloz İlaçlarının in Vitro İnce Bağırsak Ortamında Salımın İncelenmesi

Derişimi 0,3 mg/ml olacak şekilde hazırlanan rifampisin, izoniazid, etambutol ve pirazinamid saf metanolde çözülerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden hesaplanan hacimlerde alınarak

hazırlanan %12'lik PCL çözeltisine eklenmiştir. Öncelikle rifampisin, izoniazid, pirazinamid ve etambutol için bu işlem tek tek gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltiler 2 saat boyunca 400 rpm ve oda sıcaklığında karıştırılmış olup PCL çözündükten sonra içerisine %1'lik Tween 80 çözeltisi ilave edilerek 10 dakika daha karıştırılmıştır. Aynı işlem 2'li, 3'lü ve 4'lü ilaç kombinasyonları olacak şekilde tekrarlanmıştır. Elektrospin cihazı kullanılarak 20 kV ve 1 ml/saat akış hızında nanofiber atışları gerçekleştirilmiştir. Bir beher içerisinde 37°C'de ağız kapalı durumdaki 30 ml fosfat tamponları içerisine %1'lik Tween 80 çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. Son pH değerleri HCL veya NaOH kullanılarak 7,4'e ayarlanmıştır. Karışan ortam içerisine nanofiberler eklenmiş ve her 30 dakikada ortamdan 2 ml çözelti alınarak santrifüjlenmiştir. Her seferinde alınan çözelti kadar behere kullanılan ortam çözeltisinden (%1 'lik Tween 80 içeren pH 7,4 potasyum fosfat tamponu) eklenmiştir. Bu işlem 8 saat boyunca tekrarlanmıştır ve süpernatantlarda ilaçların analizi yapılmıştır. Böylece ortama ne kadar antitüberküloz ilacı salındığı saptanmıştır.

3. Bulgular

3.1 Fiziksel Karakterizasyon

Bu çalışmadaki çözeltilerin fiziksel karakterizasyon sonuçları çizelge 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Çözeltilerin fiziksel karakterizasyonu

PCL çözeltileri (ağırlık oranı)	Viskozite (Pa.S)	Elektriksel İletkenlik (μSm^{-1})	Yoğunluk (kg m^{-3})	Yüzey Gerilimi (mN m^{-1})
% 3	929±1,6	1,5 ±0,05	0,905±0,1	26,501±0,5
% 6	1039±1,6	1,0±0,05	0,91 ±0,1	28,692±0,5
% 9	1029±1,6	0,6±0,05	0,926±0,1	28,480±0,5
% 12	982±1,6	0,5±0,05	0,926±0,1	31,520±0,5
% 15	2671±1,6	0,4±0,05	0,93±0,1	31,650±0,5

Seçilecek polimer sisteminin türü, polimerin ortalama molekül ağırlığı ve çözücü sisteminin; hazırlanacak polimer çözeltisinin viskozitesi, elektrik iletkenliği ve yüzey gerilimi üzerinde çok önemli etkiye sahiptir(Dinler 2019). Çözelti viskozitesinin uygun aralıktan düşük değerde olması, jet stabilitesini bozarak fiber yapıları arasında küresel boncuk benzeri yapıların oluşmasına, böylece

elektroçirime işleminin etkin bir şekilde gerçekleştirilememesine neden olmaktadır. Viskozitesinin uygun aralıktan yüksek bir değerde olması ise enjekte edilen çözeltinin iğne ucunda katılaşmasına ve stabil jetin bozularak fiber çapı dağılımının tekdüzeliğini olumsuz etkilemesine neden olmaktadır. Bu nedenle seçilen polimer ve çözücü sisteminin oranı belirlenirken uygun viskozite değerinin incelenmesi gerekmektedir. Aynı şekilde çözeltinin elektrik iletkenliği ve yüzey gerilimi de tekdüze fiberlerin oluşumu üzerine etkilidir.

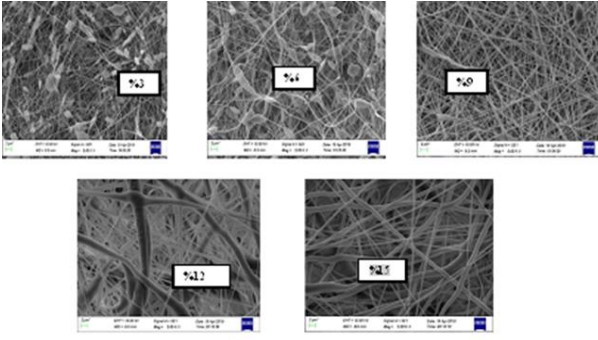
Çizelge 1'de görüldüğü gibi, polimer konsantrasyonu arttıkça viskozitenin arttığı, elektriksel iletkenliğin azaldığı gözlemlenmiştir. Artan polimer konsantrasyonu ile birlikte çözeltisinin yoğunluğu artmıştır. Artan yoğunluğa bağlı olarak ise fiber çaplarında kalınlaşma gözlemlenmiştir. Elektrospin işlemi uygulanırken uygulanan gerilimde, voltajın artması ile birlikte fiberlerin çaplarının arttığı çalışma mesafesi arttıkça ise ortalama fiber çapının azaldığı saptanmıştır.

3.2 Morfolojik Karakterizasyon

Optimizasyon çalışması süresinde çeşitli konsantrasyonlarda ve çeşitli gerilim parametrelerinde oynamalar yapılmıştır. Fiber yapıları iğne ucu ve toplayıcı plaka arasında oluşan elektriksel alandan dolayı voltajın fiber morfolojisini etkilemektedir. Voltajın yetersizliğinde Taylor konisi oluşmaz yüksekliğinde ise enjekte edilen polimer çözeltisi miktarı ile stabil jet oluşmamasından dolayı istenen yapı gözlenemez. Bu nedenle uygun voltaj düzenlenmesi yapılmıştır.

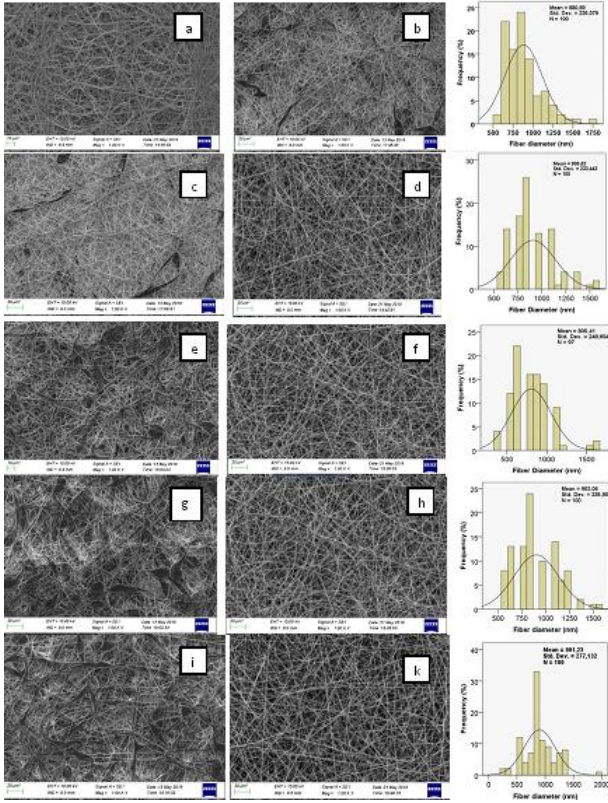
3.3 Konsantrasyon Etkisi

PCL konsantrasyonu ile de optimum viskozite sağlanmış, elde edilen SEM görüntülerinde de gösterilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. PCL konsatrasyon etkisi

3.4 Gerilim Etkisi



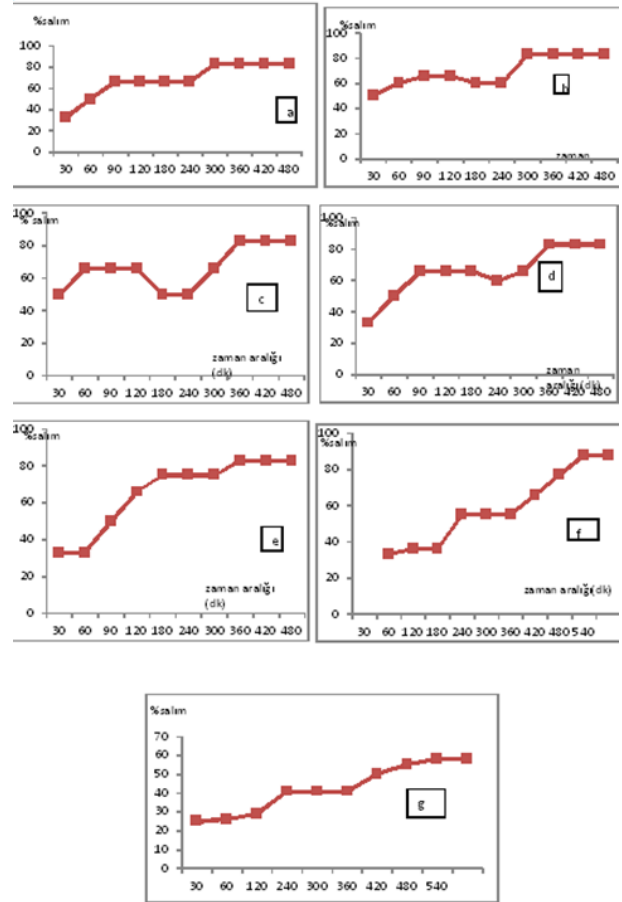
Şekil 2. %12 PCL polimeriyle üretilen fiberlerin Tween 80 varlığında ve yokluğunda SEM görüntüleri ve çap dağılımları. Tween 80'siz a)17 kV c)20 kV, e)23 kV g)26 kV, i)29 kV; Tween 80'li b)17 kV d)20 kV, f)23 kV h)26 kV, k)29 kV SEM görüntüleri

3.5 Fiber Çap Ölçümleri

Çap ölçümleri, ağırlıkça %1 olacak şekilde Tween 80 ilave edilen polimer çözeltisinden elde edilen fiberlere yapılmıştır. Burada 17 kV, 20 kV, 23 kV, 26 kV ve 29 kV da elektroçirime yöntemi ile fiber atışları yapılmıştır. Elde edilen 100 tane nanofiberin çapı ölçülmüş ve çapların ortalaması alınmıştır. Fiberlerin SPSS programı ile çapları ölçülmüş ve 880-905 nm çaplarında oldukları saptanmıştır.

3.6 Etken Madde Salınım Sonuçları

Hazırlanan etken madde kombinasyonlarının salımları incelendiğinde etken maddelerin tekli yüklemelerde %50 sinin ilk 1 saatte salım yaptığı ancak kombine yüklemelerde salımın yavaş olduğu ve izlenen 9 saatlik zaman diliminin sonunda da %80 etken madde çıkışı gözlemlendiği saptanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. PCL polimerine yüklenen etken madde kombinasyonlarının 9 saatlik in vitro salım grafikleri. a) Rifampisin, b) İsoniazid, c) Prazinamid, d) Etambutol, e) Rifampisin-İsoniazid, f) Rifampisin-İsoniazid-Prazinamid, g) Rifampisin-İsoniazid-Prazinamid-Etambutol

4. Tartışma ve Sonuç

Tüberküloz hastalığı ile mücadelede basil üzerinde etkili ilaçların sayısının azlığı ve basilin bu ilaçlara giderek direnç kazanması, hastalığın tedavisini zorlaştırmaktadır. Çoklu ilaç kullanımı yani ilaçların yan yana alınması ile hastalık durdurulabilmekte ancak hasta birey üzerinde de çoklu ilaç kullanımı ciddi yan etkilere neden olabilmektedir. Hastalığın tedavisini güçleştiren en önemli etken ise Mycobacterium tuberculosis basiline karşı tek bir tüberküloz ilacı, basilin direncinin kırılmasında

yeterli olmaması ve bu nedenle tüberküloz ilaçlarının kombinasyonlar halinde kullanılmasını gerektirmesidir. İyileşme süresini kısaltmak için rifampisin, izoniazid, etambutol ve pirazinamidin sabit bir doz kombinasyonunun kullanılması önerilmektedir (Rajaram *et al.* 2014). Antitüberküloz ilaçlar olarak ise rifampisin, izoniazid ve etambutol birinci basamak ilaçlar olarak sınıflandırılmıştır. Kullanımları, halen yaygın olup ciddi ve potansiyel olarak ölümcül bir enfeksiyon olan tüberküloz tedavisinde popülerdir. Pirazinamid gibi diğer antitüberküloz ilaçları, karaciğerde toksisiteye neden oldukları için ikinci basamak ilaçlar olarak kabul edilir. Kombine ilaç kullanımı ile tedavide ilaçların aktivitesinin arttığı ve basile karşı etkin olduğu çalışmalar ile de desteklenmiştir (Vasava *et al.* 2019). Ancak kullanılan ilaçların yan etkisini azaltmak ve daha az kullanım ve daha etkin yararlanılabilmesi için yapılan fiber yüklemeler ile çalışmalar ve tedavi de umut verebilecek başka bir alana yönlendirilmiştir. Bu amaçla tedavi etkinliği, hasta uyum ve toksisite açısından değerlendirme yapılarak elektroegirme tekniği kullanılarak biyoparçalanır polimerler olan poli(ϵ -kaprolakton) polimeri kullanılarak polimerik nanofiber formülasyonlarının üretimi ve değerlendirilmesi ile ilgili araştırmalar yapılmıştır.

İn vitro yapılan çalışmalar incelendiğinde etken maddelerin bu yapılar farklı kombinasyonlarla yüklenmesi ve daha sonra kontrollü olarak salım sağladığı bildirilmiştir (Anwar *et al.* 2014, Gajendiran *et al.* 2019), Liu *et al.* 2021). Ancak hastalığın tedavisinde çoklu ilaç kullanımını olan rifampisin, izoniazid, pirazinamid ve etambutol aynı anda ve kombinasyonları halinde PCL nanofiber yapıya yüklediği ve salımlarının incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmaya bu bilgiler ışığında yön verilmiştir.

Tüberküloz ilaçları ile kaplanan PCL nanofiberlerinin formülasyonu için, elektroegirme metodu kullanımı önerilmiştir. Polimer konsantrasyonu, çözücü tipi ve oranı, voltaj, akış hızı ve iğne-toplayıcı arasındaki mesafe gibi farklı işlem parametrelerinin üretilen nanofiber özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Polimer sisteminin türü ve çözücü sisteminin; hazırlanacak polimer çözeltisinin viskozitesi, elektrik

iletkenliği ve yüzey gerilimindeki etkisi olduğundan çözelti viskozitesinin düşük değerinde olması jet stabilitenin bozulmasına ve fiber yapıları arasında boncuk benzeri yapıların oluşmasına, böylece elektroegirme işleminin etkin bir şekilde gerçekleştirilememesine neden olmaktadır. Viskozitesinin yüksek bir değerinde olması ise enjekte edilen çözeltinin iğne ucunda donmasına ve stabil jetin bozulması fiber çapı dağılımının tekdüzeliğini olumsuz etkilemesine neden olmaktadır (Dinler 2019). Bu nedenle seçilen polimer ve çözücü sisteminin oranı belirlenirken uygun viskozite değerinin incelenmesi gerekmektedir. Aynı şekilde çözeltinin elektrik iletkenliği ve yüzey gerilimi de tekdüze fiberlerin oluşumu üzerine etkilidir. Yapılan optimizasyon çalışması süresince polikaprolakton için konsantrasyon ve elektroegirme işlemi sırasında uygulanan gerilimde değişimler yapılarak sistem optimizasyonu yapılmıştır. Her bir adımda % konsantrasyon PCL çözeltisinin fiziksel özellikleri incelenmiştir ve konsantrasyona bağlı değişimler grafiksel olarak ifade edilmiştir. Artan PCL konsantrasyonu ile birlikte, fiber atımı sürecinde, konsantrasyon arttıkça daha temiz bir yapının elde edildiği ve bead denilen boncukların oluşmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, PCL konsantrasyonu arttıkça, fiberlerin çap kalınlıkları artmıştır. Karşılaştırmalı bir çalışma yapabilmek adına uygun fiberlerin gözlemlendiği %12 konsantrasyonundaki PCL çözeltisine, Tween 80 (ağırlıkça %1) oranında eklenmiş ve tekrar çeşitli voltajlarda elektroegirme işlemi uygulanmıştır (Wang *et al.* 2016). Bu işlem sonucunda ise elde edilen SEM görüntülerinden yola çıkarak söyleyebiliriz ki, Tween 80 PCL yapısını optimize ederek daha net fiberler elde etmemizi sağlamıştır. Yüzey aktif madde olarak kullandığımız Tween 80, polimerimizin yapısını bozmamıştır. Bu sebeple, yapılan çalışmada %12'lik PCL'e ağırlıkça %1'lik Tween 80 ilave edilerek ilaç yüklemeleri bu fiberlere yapılmıştır.

Voltaj parametresinde uygulanan değişimlerin optimizasyon çalışması süresince ise, 17kV/ 20 kV / 23kV / 26 kV ve 29 kV' da yapılan fiber atışlarının akabinde PCL' e ait fiberleri inceleyebilmek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. SEM görüntüleri alınan PCL nanofiberlerin çapları ölçülmüştür. Genellikle

voltaj arttığında fiber çapının da arttığı görülmüştür. Ortalama fiber çapının küçülmesi, etkin maddenin salındığı ortamda daha geniş bir yüzey alanı yarattığı için difüzyon hızını, dolayısıyla etkin maddenin salımını hızlandırmaktadır.

Bu sebeple çapların analizi yapılmış ve en ince çapa sahip ve en az kirlilik içeren sonucu veren 20 kV çalışmamızda uygulama voltajı olarak seçilmiştir. PCL nanofiberlerin optimizasyon işleminden sonra, 0,3 mg olacak şekilde öncelikle tek tek sonrasında ise kombinasyonları halinde fiberlere ilaç yüklemesi yapılmıştır ve bu ilaçların bağırsak ortamında in vitro olarak ilaç salım incelenmiştir. Kontrollü ilaç salımları sağlanmıştır ve kombinasyonlar halinde kullanılması ile yüklenen miktarın yavaş bir salım gösterdiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, tüberküloz ilaçları tek başına kullanıldığında hasta üzerinde basilin direncini kırmakta yetersiz kalırken, kombinasyonları halinde kullanılması tedavide etkin olmakla birlikte artan yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, nanofiber yapıların girintili çıkıntılı özelliğinden faydalanarak daha fazla ilaç yüklenebilme, kontrollü ilaç salımı uzun süreli yapabilme ve polimerin biyobozunur olma özelliğinden faydalanarak daha düşük dozlarda hasta bireye tüberküloz ilaçlarının verilebilmesini ve yan etkilerin azaltılabilmesini sağlayacağı; bu sayede, hasta üzerinde daha az toksisiteye neden olacağını düşünülmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı tarafından 12.09.2017 tarihli SAG-C-YLP-120917-0517 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projemize destek sağladıkları için teşekkür ederiz.

5. Kaynaklar

Anwar, İ.H., Shehata N.A., Kimsawatde, G.C., Hudson, A.G., Sriranganathan, N., Joseph, G.E. and Mahajan, R.L., 2014. Studying the activity of antituberclousis drugs inside electrospun polyvinyl alcohol, polyethylene oxide, and polycaprolacton nanofibers. *Journal Of Biomedical Materials Research A* 102A, **11**, 4009-4015.

Baker, S.R., Banerjee, S., Bonin, K. and Guthold, M., 2016. Determining the mechanical properties of electrospun poly-ε-caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiberanchoring technique, *Materials Science and Engineering C*, **59**,203–212.

Booyesen, L.L.I.J., Kalombo, L., Brooks, E., Hansen, R., Gilliland, J., Grappa, V., Lungenhofer, P., Makokotlela, B.S., Swai, H.S., Fkotze, A. and Lenaerts, A.H, 2013. In vitro / in vivo pharmacokinetic and pharmadynamic study of spray-dried-poly - (DL-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles encapsulating rifampicin and isoniazid, *International Journal of Pharmaceutical*, **444**,10-17.

Carneiro, S.P., Carvalho, K.V., de Oliveira Aguiar Soares, R.D., Carneiro, C.M., de Andrade, M.H.G., Duarte, R.S. and dos Santos, O.D.H., 2019. Functionalized rifampicin- loaded nanostructured lipid carriers enhance macrophages uptake and antimycobacterial activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **175**, 306–313.

Cavenaghi, R., 1989. Rifampicin raw material characteristics and their effect on bioavailability, *Bulletin of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, **64**, 36–37.

Dinh-Duy P., Fathal E., Tsapis N.,2015. Pyrazinamide-loaded poly(lactide - co - glycolide) nanoparticles: optimization by experimental desing, *Journal of drug delivery and technology*, **30**,384-390.

Dinler, B, 2019. Rifampisin Ve Vankomisin İçeren İmplantel Nanofiberlerden Etkin Madde Çıkışını Etkileyen Parametrelerin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 140.

Espinosa, M.A., Valenzuela, M.I. Acedo, Peña A. Muñoz de la Peña, Salinas, F. and Cañada F., 2001. Comparative study of partial least squares and a modification of hybrid linear analysis calibration in the simultaneous spectrophotometric determination of rifampicin, pyrazinamide and isoniazid, *Analytica Chimica Acta*, **427**, 129–136.

Fang, P., Cai, H., Li, H., Zhu, R., Tan, Q., Wei, G., Xu, P., Liu, Y., ZhangWen-Y., Chen Y. and Zhang F.,2010. Simultaneous determination of isoniazid,rifampicin,lexofloxacin in Mouse tissue and plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **878**,2286-2291.

Gajendirana, M., Heejung, J., Kyobum K. and Sengottuvelan B, 2019. In vitro controlled release of tuberculosis drugs by amphiphilic branched copolymer nanoparticles, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **45**,13:8.

Hassounah, .A., Shehata, N.A., Hudson, G.A, Sriranganathan, N., Eugene, G., Joseph, R. and Mahajan L. ,2016. Designing and testing single tablet for tuberculosis treatment through electrospinning.

- Fabrication and Self-Assembly of Nanobiomaterials Applications of *Nanobiomaterials* 1, 335-365.
- Hivechi, A., Bahrami, S.H. and Siegel R. A., 2019. Drug release and biodegradability of electrospun cellulose nanocrystal ,reinforced polycaprolactone, *Materials Science & Engineering C* , **94**,929–937.
- Hollinger, V.V. and Ranade, M.A. 2004. *Drug Delivery Systems: Second Edition*. CRC Press LLC., 72-390.
- Hu, J., Prabhakaran, M.P., Tian, L., Ding, X. and Ramakrish N., 2015. Drug loaded emulsion electrospun nanofibers: charecterization , drug release and in vitro biocompatibility , *The royal Society of Chemistry*, **5**, 100256-100267.
- Janin, Y.L. 2007. Antituberculosis drugs: ten years of research. *Bioorganic. & Medicinal. Chemistry*. **15**, 2479–2513.
- Liu, Y. ;Li, C. ;Chen, J.,;Han, Y., Wei, M., Liu, J., Yu, X. Li, F., Hu, P., Fu, L. and Liu, Y., 2021. Electrospun high bioavailable rifampicin-isoniazid-polyvinylpyrrolidone fiber membranes, *Applied Nanoscience*, **11**(8), 2271-2280.
- Pitt C.G., 1990. Polycaprolactone and its copolymers. In: Chasin M, Langer R, editors. biodegradable polymers as drug delivery systems. New York: Marcel Dekker, 71–120.
- Prasad, B. and Singh, S., 2010. LC–MS/TOF and UHPLC–MS/MS study of in vivo fate of rifamycin isonicotinyl hydrazone formed on oral co-administration of rifampicin and isoniazid, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **52**,377–383.
- Rajaram, S., Vemuri, V. and Deepthi, N. R., 2014. Ascorbic acid improves stability and pharmacokinetics of rifampicin in the presence of isoniazid, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **100**,103–108.
- Rajasekhar, C., Suvadhan, K. and Inamuddin, 2020. Simultaneous detection of ethambutol and pyrazinamide with IL@CoFe₂O₄NPs@MWCNTs fabricated glassy carbon electrode. *Scientific Reports*, **10**, 13563.
- Repanas, A. and Glasmacher, B., 2015. Dipyridamole embedded in Polycaprolactone fibers prepared by coaxial electrospinning as a novel drug delivery system, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **29**, 132-142.
- Schlesinger, E., Ciaccio N. and Desai, T.A., 2015. Polycaprolactone thin-film drug delivery system: Empirical and predictive model for device desing, *Materials Science and Engineering C*, **57**,232-239.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. and Rudzinski, W.E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Control. Release*, **70**,1–20.
- Schlesinger, E., Ciaccio ,N. and Desai T.A., 2015. Polycaprolactone thin-film drug delivery system: Empirical and predictive model for device desing, *Materials Science and Engineering C*, **57**,232-239.
- Smith, P.J., van Dyk, J and Fredericks A., 1999. Determination of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by high performance liquid chromatography after their simultaneous extraction from plasma. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **3**(11),325–328.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R. and Rudzinski, W.E., 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Control. Release*, **70**,1–20.
- Srivastava, A., Waterhouse, D., Ardrey, A. and Ward, S. A., 2012. Quantification of rifampicin in human plasma and cerebrospinal fluid by a highly sensitive and rapid liquid chromatography- tandem mass spectrometric method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **70**, 523-528.
- Tafazoli, S., Mashregi, M. and O'Brien, P. J., 2008. Role of hydrazine in isoniazid-induced hepatotoxicity in a hepatocyte infammation model. *Toxicology. Applied Pharmacology*, **229**, 94–101.
- Vasava, M. S., Nair, S.G., Rathwa, S.K. and Patel, D.B., 2019. Development of new drug-regimens against multidrug-resistant tuberculosis, *Indian Journal of Tuberculosis*, **66**(1), 12-19.