

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

FİKİR KATEGORİSİ

TAKIM ADI

THERANOSTIC PATCH

PROJE ADI

Bakteriyel Enfeksiyonlara Karşı

Theranostic Yara Örtülerinin Geliştirilmesi

BAŞVURU ID

44171

KATEGORİ

Fikir Kategorisi Üniversite ve Üzeri Seviyesi

İçindekiler

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)	2
2. Problem/Sorun:.....	3
3. Çözüm	3
4. Yöntem	4
4.1. Dikey Sıralı Karbon Nanotüp Üretimi	4
4.2. Mikroığne Dizisinin Hazırlanması	4
4.3. Cilt Yamasının İmalatı	4
4.4. Kırmızı Lahana Ekstresi Hazırlanışı	5
5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü	6
6. Uygulanabilirlik.....	7
7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması	7
8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar):	8
9. Riskler	8
10. Kaynaklar	9

1. Proje Özeti (Proje Tanımı)

Mikroığne tabanlı sistemlerin ağrısız, kendi kendine uygulanabilme ve doğrudan numune alma kolaylığı sağlamaları nedeniyle son zamanlarda biyosensör olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Aynı zamanda ilk geçiş etkisi sorunu olmaksızın, makromoleküllerin yanı sıra küçük molekülleri deriye ilemesiyle transdermal ilaç taşıyıcı olarak da oldukça ilgi çekmiştir (Serrano vd., 2018). Projemizdeki mikroığne üretiminde kullanılan polimer bozunma ürünlerinin toksik olmaması, biyoyumlu olması, düşük immünojenliği ve biyolojik olarak parçalanabilir olması nedeniyle tercih edilmiştir. Hazırlanan mikroığneler cildin yalnızca stratum corneum tabakasına nüfuz edecektir ve bu nedenle dermisteki sinir uçlarına ve kılcal kan damarlarına ulaşmadıkları için ağrıya neden olmayacaklardır (Rawson vd., 2019). Cilde nüfuz eden mikroığne ilk aşamada beta laktam grubu antimikrobiyal enfeksiyon bölgesine iletecektir ve ortamda beta laktamaz enzimi varlığında beta laktam grubu hidroliz olarak ortamın pH'sını düşürecek. Değişen pH antosiyanin indikatörü kullanılarak takip edilecek ve ortamda beta laktama dirençli bakteri olup olmadığı tespit edilecektir. Mikroığne bazlı cilt yamasının ikinci işlevi ile ortamda beta laktam grubu antimikrobiyale dirençli bakteri olması durumunda değişen pH ile aside bağımlı olarak içeriğindeki antibiyotiği salan nanopartiküller mikroığneler aracılığıyla ortamda bulunarak tedavi sağlayacaktır. Mikroığneye yüklenen doğru antimikrobiyal ortama salınmış olacak ve

tedavi gerçekleştirilecektir. Böylece theranostic cilt yamalarıyla yaralarda enfeksiyon durumu takip edilecek ve doğru antimikrobiyal tedavi minimum düzeyde cihaza ve personele bağlı olarak tespit edilecektir.

2. Problem/Sorun:

β -Laktamlar, çok sayıda türün neden olduğu bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde en başarılı ilaçlar arasındadır. Son 60 yıldır dünya antibiyotik pazarında % 65'den fazlasını paya sahip olmakla birlikte artan antimikrobiyal direnç sorunu tedavideki başarı oranını düşürmektedir (Coleman, 2011). β -Laktamlar antimikrobiyal etkilerini, bakteriyel hücre duvarının peptidoglikan bileşeninin çapraz bağlanmasından sorumlu olan penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) olarak bilinen enzim grubunun D-Ala-D-Ala substratını taklit ederek gösterir. Böylelikle transpeptidasyon aktivitesini inhibe eder ve hücre duvarının bütünlüğünü bozarak sonuçta hücre lizisine neden olur (Worthington vd., 2013). Beta-laktamazlar, dirençli bakteriler tarafından salınarak beta laktam antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının amid bağlarını koparır ve bu antibiyotikleri inaktif hale getirir. (Vural, 2013). *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi beta laktamaz enzimine sahip bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlarda, gelişen direnç nedeniyle beta laktam antibiyotiklerin kullanımı uygun değildir. Bu nedenle enfeksiyon bölgesindeki bakterinin beta laktamaz enzimine sahip olup olmadığını tespit etmek ve doğru antimikrobiyal uygulamak doğru tedavinin uygulanması açısından kritik öneme sahiptir (Nag vd., 2020; Handal vd., 2000). Ancak tespit için uygulanan izolasyon, PCR işlemleri oldukça zaman alıcı, klinik ortamda uygulanması zor ve maliyetlidir (Senda vd., 1996). Sonuç olarak, direnç veya toksisite gibi zararlı sonuçları en aza indirirken terapötik etkinliği en üst düzeye çıkarmak için uygun antimikrobiyal minimal invaziv olarak tespit etmeye bir ihtiyaç vardır. Hastada yaranın enfekte olup olmadığını tespit etmek, dirençli bakteriyle enfekte olmuşsa uygun antibiyotiği kullanmak hala çözülememiş olup ciddi komplikasyonlara sebep olabilen tıbbi olgular arasındadır.

3. Çözüm

Mikroiğne tabanlı sistemlerin ağrısız, kendi kendine uygulanabilme ve doğrudan numune alma kolaylığı sağlamaları nedeniyle son zamanlarda biyosensör olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. Aynı zamanda ilk geçiş etkisi sorunu olmaksızın, makromoleküllerin yanı sıra küçük molekülleri deriye iletilmesiyle transdermal ilaç taşıyıcı olarak da oldukça ilgi çekmiştir (Serrano vd., 2018). Projemizdeki mikroiğne üretiminde kullanılan polimer bozunma ürünlerinin toksik olmaması, biyoyumlu olması, düşük immünojenliği ve biyolojik olarak parçalanabilir olması nedeniyle tercih edilmiştir. Hazırlanan mikroiğneler cildin yalnızca stratum corneum tabakasına nüfuz edecektir ve bu nedenle dermisteki sinir uçlarına ve kılcak kan damarlarına ulaşmadıkları için ağrıya neden olmayacaklardır (Rawson vd., 2019). Cilde nüfuz eden mikroiğne ilk aşamada beta laktam grubu antimikrobiyal enfeksiyon bölgesine iletecektir ve ortamda beta laktamaz enzimi varlığında beta laktam grubu hidroliz olarak ortamın pH'sını düşürecek. Değişen pH antosiyanin indikatörü kullanılarak takip edilecek ve ortamda beta laktama dirençli bakteri olup olmadığı tespit edilecektir. Mikroiğne bazlı cilt yamasının ikinci işlevi ile ortamda beta laktam grubu antimikrobiyale dirençli bakteri olması durumunda değişen pH ile aside bağımlı olarak içeriğindeki antibiyotiği salınan nanopartiküller mikroiğneler aracılığıyla ortamda bulunarak tedavi sağlayacaktır. Mikroiğneye yüklenen doğru antimikrobiyal ortama salınmış olacak ve

tedavi gerçekleştirilecektir. Böylece theranostic cilt yamalarıyla yaralarda enfeksiyon durumu takip edilecek ve doğru antimikrobiyal tedavi minimum düzeyde cihaza ve personele bağlı olarak tespit edilecektir.

4. Yöntem

4.1. Dikey Sıralı Karbon Nanotüp Üretimi

Kimyasal buhar biriktirme (CVD) tekniğiyle, dikey olarak hizalanmış karbon nanotüpler (VA-CNT), demir nanopartiküller tarafından katalize edilen atomik kendi kendine montaj yoluyla silikon gofretler üzerinde üretilir. Bir substrat malzemesi üzerinde demir katalizörün konumunu kontrol ederek, dikey olarak hizalanmış karbon nanotüpler, demir katalizörün konumuna uyan içi boş mikroıgneleler halinde modellenir. Katalizör deseninin geometrisini tanımlamak için fotolitografi kullanılır. Elektron ışını buharlaştırması, sırasıyla 10 nm ve 1 nm kalınlıklarında bir alümina destek tabakası ve bir üst demir katalizör tabakasını çökeltmek amacıyla kullanılır. Dikey hizalanmış karbon nanotüpler, 4 inçlik bir proses tüp fırınında termal CVD ile katalizör desenli gofretlerden üretilir. CVD işleminden hemen önce, katalizör beş dakika süreyle 700°C sıcaklıkta ve 600 torr basınçta sırasıyla 600 ve 200 sccm hidrojen ve argon gaz karışımı altında tüp fırınında nanopartiküller halinde sinterlenir. CVD sırasında, VA-CNT'leri imal etmek için bir saat boyunca 700°C sıcaklıkta ve 600 torr basınçta numune üzerine sırasıyla 300 ve 450 sccm olan bir etilen ve hidrojen gaz karışımı akitilir. Bu yöntemle VA-CNT'lerin yüksekliği 250 µm ila 300 µm ye kadar büyütülür (Lyon, 2014).

4.2. Mikroıgne Dizisinin Hazırlanması

Nanotüp poliimid kompozitini ve silikon levhanın üstünde bir poliimid tabanını aynı anda oluşturmak için döndürerek kaplama yöntemi kullanılır. Numunenin üzerine karbon nanotüpleri tamamen kaplayan bir poliimid reçine damlatılır. Numune daha sonra 60 saniye boyunca 1.000 rpm'de santrifüjlenir. Döndürerek kaplamadan sonra, poliimid 100°C'den 250°C'ye dört aşamalı bir sıcaklık rampası kullanılarak termal olarak kürlenir. Numune, 100 ° C'de 1 saat süreyle bir ocak üzerine yerleştirilir, ardından 150 ° C'de 30 dakika ve 200 ° C'de 30 dakika ısıyla muamele edilir. Numune daha sonra 4 saat boyunca 250°C'de bir vakumlu fırına taşınır. Poliimid ve silikon yonga plakası arasındaki zayıf yapışma nedeniyle mikroıgne cihazı, basitçe bir tıraş bıçağı veya cımbız kullanılarak silikon gofretten ayrılır. Substrat ayrımından sonra mikroıgne üretim süreci tamamlanır (Lyon, 2014).

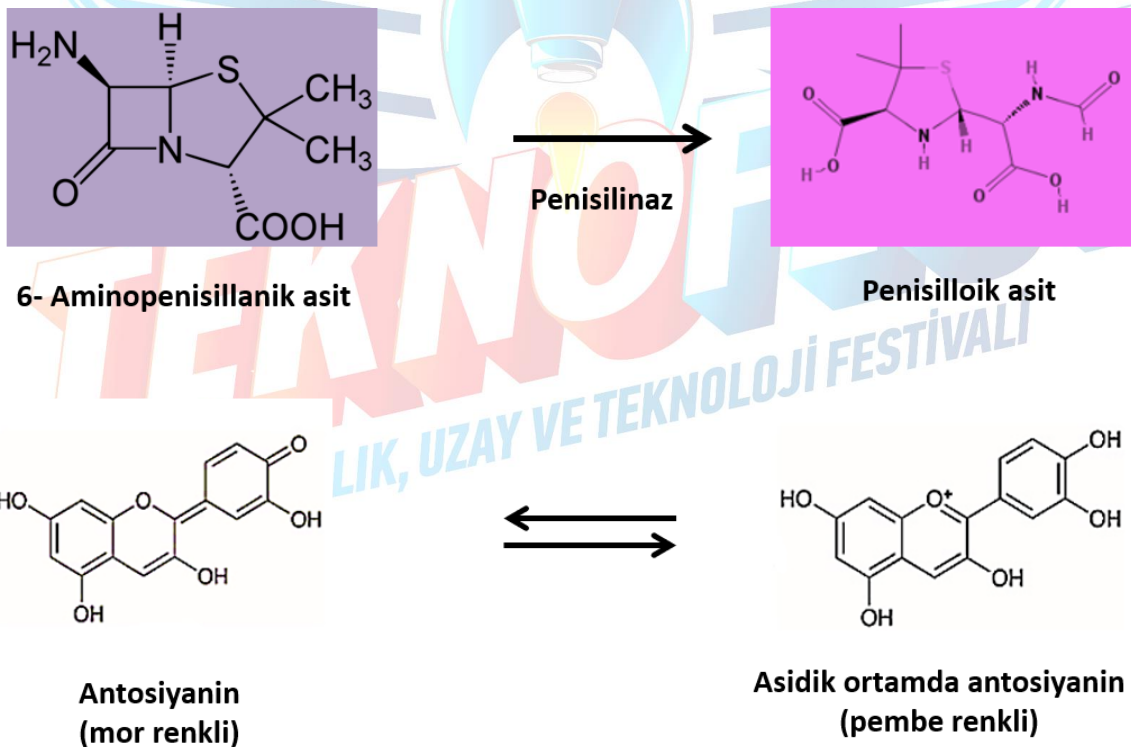
4.3. Cilt Yamasının İmalatı

Projemizde mikroıgneleler, beta laktam grubu ve gerekli durumlarda kullanılacak doğru antibiyotığı içeren ikili ilaç rezervuarlı cilt yamalarına tutturulmuştur. Her yama, rezervuarları oluşturmak için birbirine bağlanan iki PDMS katmanından oluşturulmuştur. Daha sonra kılıf olarak ince bir deforme olabilen silikon tabakası eklenir. PDMS ve EcoFlex katmanlarını imal etmek için reçineler, mikro-işlenmiş asetale plastik kalıplara dökülür. Her malzeme 80 ° C'de 1 saate kadar termal olarak kürlenir. PDMS yara örtüsü, birbirine bağlanmış iki ayrı katmandan yapılmıştır. Bu katmanlar arasındaki yapışmayı desteklemek için 5 dakika boyunca 500 W ve 200 mTorr'da 100 sccm oksijenin uzaktan oksijen plazma yüzey işlemi yapılır. Plazma işleminden sonra, PDMS katmanları, yaklaşık 10N'lik sabit bir basınç altında preslenir ve bağı oluşturmak için 30 dakika boyunca 80°C'de bir konveksiyon fırınına yerleştirilir. Kapağı takmak için, PDMS yüzeyi yapıştırıcı ile fırçalanır. Kaplamayı deri yamasının üzerine

yerleştirdikten sonra, Ecoflex reçinesini ayarlamak için düzenek tekrar 30 dakika boyunca 80°C'de bir konveksiyon fırınına yerleştirilir. Benzer şekilde mikroıgne dizisi ve şınga adaptörünü cilt yamasına takmak için, yapıştırıcı olarak PDMS reçinesi kullanılır ve 30 dakika boyunca 80°C'lik bir konveksiyon fırınında sertleştirilir (Lyon, 2014).

4.4. Kırmızı Lahana Ekstresi Hazırlanışı

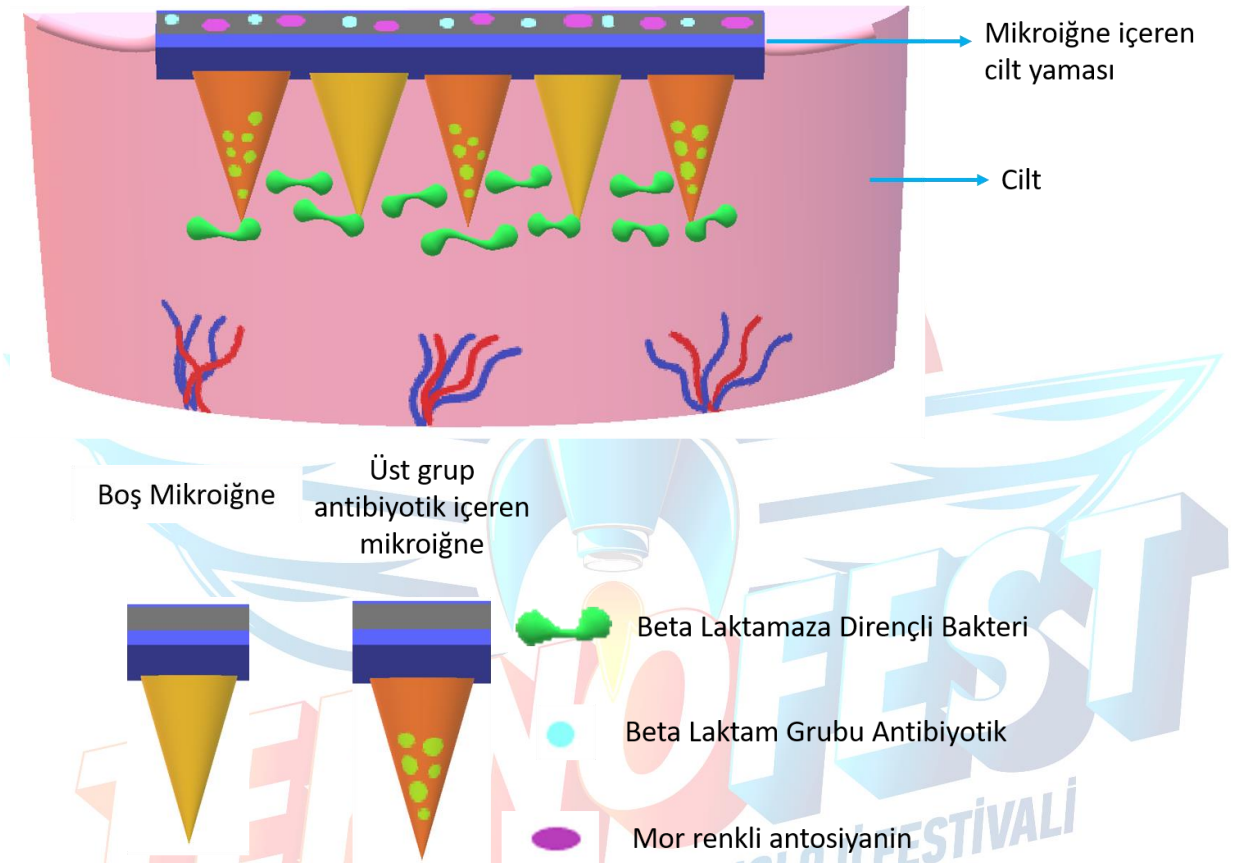
Kırmızı lahana (*Brassicaoleracea L.*) bitkisi yaygın olarak yetişmesinden dolayı yerel bir marketten elde edilebilir. Yaprakları ayrılarak suyla temizlenir. Kurulandıktan sonra bir parçalayıcı yardımıyla küçük parçalara ayrılır. 1:1 kırmızı lahana ve solvent olacak şekilde 100 gram kırmızı lahana tartılır ve 100 ml distile su ile bir cam kap içersine alınır. 30 dk boyuca kaynatılarak antosiyanince zengin ekstre elde edilir. Elde edilen antosiyanin ekstresi uygun filtre kağıdıyla filtre edilir kullanım anına kadar -20 °C'de bekletilir. Beta laktamaz enzimi salgılayan bakteri varlığında antibiyotikteki beta laktam halkası parçalanır ve serbest -COOH ucu açığa çıkmış olur. Bu durum ortamın pH'ını ciddi oranda düşürür. Antosiyanin ise pH'a bağımlı olarak renk değiştiren doğal pH indikatörü olduğu için kolorimetrik olarak ortam pH'ının değişimini göstermiş olur. Örnek olarak beta laktam grubu varlığında meydana gelecek renk değişimi Şekil 1'de verilmiştir. Beta laktam grubu antibiyotik varlığında mor renkli olarak ortamda bulunması planlanan antosiyanin molekülleri yapısında meydana gelen elektron yoğunluğunun azalmasına bağılı olarak beta laktamaz enzimi varlığında pembe renge dönmektedir.



Şekil 1. Antosiyanin moleküllerinin antibiyotik dirençli bakteriler varlığındaki renk değişimi

Şekil 2'de ise mikroıgne içeren cilt yamasının bölümleri ve ayrıntılı dizaynı şematize edilmiştir. Üst grup antibiyotik grubu olarak kolistin kullanımı planlanmaktadır. Cilt yamasının theranostic (therapeutic + diagnostic) denilmesindeki temel amaca uygun şekilde

iki görevi de üstlenecek biçimde standardize edilecektir. İlk aşamada beta laktam grubu antibiyotik salımı yapılarak bakterinin eradikasyonunun sağlanması hedeflenmektedir. İkinci aşamada eğer bakteri beta laktam grubuna dirençliyse beta laktam halkasını parçalayacak ve ortam asidik pH'a kayacaktır. Bu durumda antosiyanin moleküllerinde renk değişimi meydana gelecektir. Cilt yamasındaki renk değişimi dirençli bakterinin varlığını göstererek 'diagnostic' kısmını tamamlayacaktır. Eş zamanlı olarak da pH'a bağımlı olarak koyu turuncu renkle gösterilmiş mikro iğnelere tedavideki üst grup antibiyotiğin salımı gerçekleştirilmiş olacaktır. Böylece doğru antibiyotik tedavisi sağlanmış olacaktır.



Şekil 2. Mikro iğne içeren cilt yamasının bölümleri ve ayrıntılı dizaynı

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Önerilen projede biyoyumlu, nontoksik, ekipman-cihaz-personel ihtiyacını minimuma indirgeyen, sanayiye kolaylıkla uygulanabilir, doğa dostu, daha az kimyasal atık oluşturan, ülkemizde de önemli bir ihtiyaca çözüm niteliğinde olan yerli ve milli bir mikro iğne bazlı cilt yaması geliştirilecektir. Bu alanda ülkemizde üretilen mikro iğne bazlı beta laktama dirençli bakteri varlığını tespit eden ve doğru antimikrobiyal ortama salınan bir yara örtüsü mevcut değildir. Yapılan literatür çalışmasında ise kırmızı lahana, antosiyanin veya doğal kaynaklı olarak bir bitkinin kullandığı herhangi bir mikro iğne bazlı yara örtüsü bulunamamıştır. Projemizin oldukça yenilikçi olup tamamen sağlık hizmet anlamında büyük bir eksikliği kapatıp, ihtiyacı karşılayacağı düşünülmektedir. Bu anlamda projenin ara çıktıları göz önüne alınarak patent hakkı elde etme olasılığı vardır. Bitkilerden elde edilen ekstraktların kullanılması, ağrısız, kendi kendine uygulanabilir, minimal invaziv bir yöntem olması, hızlı

projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (B Planı) ilgili iş paketleri belirtilerek ana hatlarıyla Tablo 3'teki Risk Yönetimi Tablosu'nda ifade edilmiştir.

IP No	En Önemli Riskler	Risk Yönetimi (B Planı)
4	Enfeksiyonlu bölgeden yeterli miktarda reaksiyon verecek sıvın ekstrakte edilemeyebilir.	Mikroiğne tasarımındaki iğne sayısı artırılarak daha fazla sıvının ekstrakte edilmesi sağlanabilir.

Tablo 3. Risk Yönetim Tablosu

“Enfeksiyonlu bölgeden yeterli miktarda reaksiyon verecek sıvının ekstrakte edilemeyebilir.” riskinin olasılığı düşüktür fakat projeye etkisi orta derecededir. Bundan dolayı Tablo 4'deki Olasılık ve Etki Matrisi'ne göre değerlendirildiğinde düşük risk olarak değerlendirilebilir. Bu durumda risk $1 \times 5 = 5$ düşük risk olarak tanımlanabilir. Risk yönetim tablomuzdan da anlaşıldığı gibi tolere edilemez bir riskimiz bulunmamaktadır.

Olasılık	Düşük	Orta	Yüksek	Etki
Yüksek	Orta Risk	Yüksek Risk	Çok Yüksek Risk	
Orta	Düşük Risk	Orta Risk	Yüksek Risk	
Düşük	Çok Düşük Risk	Düşük Risk	Orta Risk	

Tablo 4. Olasılık ve Etki Matrisi

10. Kaynaklar

- Coleman, K. (2011). Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- β -lactam β -lactamase inhibitors. *Current opinion in microbiology*, 14(5), 550-555.
- Handal, T., & Olsen, I. (2000). Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *European journal of oral sciences*, 108(3), 163-174.
- Jiang, X., & Lillehoj, P. B. (2020). Microneedle-based skin patch for blood-free rapid diagnostic testing. *Microsystems & nanoengineering*, 6(1), 1-11.
- Kim, D., Cao, Y., Mariappan, D., Bono Jr, M. S., Hart, A. J., & Marelli, B. (2021). A Microneedle Technology for Sampling and Sensing Bacteria in the Food Supply Chain. *Advanced Functional Materials*, 31(1), 2005370.

- Li, W., Terry, R. N., Tang, J., Feng, M. R., Schwendeman, S. P., & Prausnitz, M. R. (2019). Rapidly separable microneedle patch for the sustained release of a contraceptive. *Nature biomedical engineering*, 3(3), 220-229.
- Lyon, B. J., Aria, A. I., & Gharib, M. (2014). Fabrication of carbon nanotube—polyimide composite hollow microneedles for transdermal drug delivery. *Biomedical microdevices*, 16(6), 879-886.
- Nag, P., Sadani, K., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2020). Beta-lactam antibiotics induced bacteriolysis on LSPR sensors for assessment of antimicrobial resistance and quantification of antibiotics. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 311, 127945.
- Rawson, T. M., Gowers, S. A., Freeman, D. M., Wilson, R. C., Sharma, S., Gilchrist, M., ... & Holmes, A. H. (2019). Microneedle biosensors for real-time, minimally invasive drug monitoring of phenoxymethylpenicillin: a first-in-human evaluation in healthy volunteers. *The Lancet Digital Health*, 1(7), e335-e343.
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., ... & Ohta, M. (1996). PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *Journal of clinical microbiology*, 34(12), 2909.
- Serrano-Castañeda, P., Escobar-Chavez, J. J., Rodríguez-Cruz, I. M., Melgoza, L. M., & Martínez-Hernández, J. (2018). Microneedles as enhancer of drug absorption through the skin and applications in medicine and cosmetology. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 21, 73-93.
- Vural T. (2003). Beta Laktamazlar. *Turkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*. 2003;1(2):231-6.
- Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Overcoming resistance to β -lactam antibiotics. *The Journal of organic chemistry*, 78(9), 4207-4213.