

**BİYOBOZUNUR ve ENJEKTE EDİLEBİLİR
POLİMERİK İLAÇ SALIM SİSTEMLERİNİN
DİZAYNI ve SOL-JEL GEÇİŞ ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

ESRA ÖZDEMİR

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
İçin Öngördüğü
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

2006

BİYOBOZUNUR ve ENJEKTE EDİLEBİLİR
POLİMERİK İLAÇ SALIM SİSTEMLERİNİN
DİZAYNI ve SOL-JEL GEÇİŞ ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

DESIGN of BIODEGRADABLE and INJECTABLE
POLYMERIC DRUG DELIVERY SYSTEMS and
INVESTIGATION of THEIR SOL-GEL REVERSIBILITY

ESRA ÖZDEMİR

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
İçin Öngördüğü
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

2006

Biyobozunur ve Enjekte Edilebilir Polimerik İlaç Salım Sistemlerinin Dizaynı ve Sol-Gel Geçiş Özelliklerinin İncelenmesi

Esra Özdemir

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

ÖZ

Sunulan çalışmada sıcaklık duyarlı, sol-jel geçiş özelliğine sahip kitosan doğal polimerinin çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan gliseril fosfat disodyum tuzu (GP tuzu) ile fiziksel olarak çapraz bağlanması sonucunda elde edilen hidrojeller ve bu hidrojellerden in-vitro ortamda Bovine Serum Albumin'nin (BSA), in-vivo ortamda 5-Fluorouracil'in (5-FU) salım kinetiği incelenmiştir.

Çapraz-bağlanma, nötr ortamda, oda sıcaklığında (25°C) çeşitli kitosan/(çapraz-bağlayıcı) bileşimlerinde gerçekleşmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 0.5 ml (560 mg GP tuzu/1 ml su) GP tuzu ve 9.5 ml Kitosan/HCl çözeltisi ile hazırlanan, istenilen mekanik dayanıma ve şişme karakteristiğine sahip hidrojel olarak seçilmiştir. Bu bileşimin 25°C sıcaklıkta sıvı, 37°C sıcaklıkta jel formunda olduğu belirlenmiştir. Çalışmalarda, ortalama 0.80 mm çapında, 0.25-0.30 mm kalınlığında kuru membran formunda sentezlenen hidrojeller kullanılmıştır.

Hidrojellerin karakterizasyonu, fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) içeren ortamda, 37°C sıcaklıkta yürütülen şişme deneylerinin yanı sıra, yığın yapı özellikleri için FT-IR spektrumlarının incelenmesi, yüzey/kesit morfolojilerinin SEM ile gözlenmesi, sol-jel geçiş sıcaklığının belirlenmesi için viskozimetrik incelemeler ve ısı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DSC çalışmaları sonucunda yapılmıştır. Ayrıca yüklenen ilaçların jel içerisinde dağılımları konfokal lazer mikroskop ile gözlenmiştir.

Yükleme çalışmalarında, hidrojele in-vitro ortamda (pH=7.4, 25°C) BSA ve 5-FU yüklenmiştir. Yüklemeler 1 mg/ml ve 3 mg/ml BSA çözeltileri kullanılarak "emdirme" (embedding) yöntemi ile gerçekleşmiştir. Ayrıca çapraz bağlama sırasında da yükleme yapılmış ve her iki değişik yükleme metodu için salım sonuçları karşılaştırılmıştır. Floresan spektrofotometresi ile yürütülen salım çalışmaları sonucunda BSA salımı "emdirme" yöntemi ile yüklenen jellerden 20 gün sürerken "çapraz bağlama" yöntemi ile salımın 15 gün sürdüğü gözlenmiştir. 5-FU yüklemeleri için yalnızca "çapraz bağlama" yöntemi kullanılmıştır. %10'luk (w/v) 5-FU çözeltisi ile yüklenen jellerden in-vitro ortamda salım yaklaşık 7 gün sürmüş ve UV spektrofotometresi ile kümülatif salım değerleri belirlenmiştir.

In-vivo çalışmalarda Wistar Albino cinsi sıçanların kas içine 1.2 mg 5-FU yüklenerek hazırlanan kitosan çözeltisi enjekte edilmiş ve salım çalışmaları HPLC ile izlenmiştir. Salım yaklaşık 60 saat boyunca incelenmiştir. Çalışma sonucunda sıçanlarda yapılan histolojik incelemeler enjekte edilebilen kitosan jellerin çevre dokularda istenmeyen bir reaksiyona neden olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Sol-jel geçişli hidrojeller, Kitosan, BSA, 5-FU, Enjekte edilebilir hidrojel, in-vivo salım

Danışman: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION of THERMOSENSITIVE, SOL-GEL REVERSIBLE CHITOSAN HYDROGELS and INVESTIGATION of DRUG RELEASE KINETICS FROM HYDROGELS IN-VITRO and IN-VIVO CONDITIONS

Esra Özdemir

Hacettepe University, Department of Chemical Engineering, Chemical Engineering Section

ABSTRACT

In the presented study, the thermally sensitive, injectable, neutral hydrogel solutions based on physically crosslinked chitosan by glycerol phosphate disodium salt (GP salt) were synthesized. The release kinetics of Bovine Serum Albumin (BSA) in-vitro and 5-Fluorouracil (5-FU) in-vivo conditions from these hydrogels were investigated.

Crosslinking was realized at room temperature (25°C) and neutral pH (7.4) with different chitosan/crosslinker compositions. As due to the desired mechanical properties and swelling characteristics, 0.5 ml (560 mg salt/1 ml water) GP salt and 9.5 ml chitosan/HCl solution was chosen. This hydrogel composition was liquid at room temperature (25°C) and became a gel at physiological temperature 37°C. For loading and swelling studies, hydrogels in dry membrane form (approximately 0.80 mm ID and 0.25-0.30 mm thickness) were used.

The characterization studies included investigation of swelling behavior in phosphate buffer solution (PBS, pH=7.4), the atomic structure of hydrogels by FT-IR, the surface/crosssectional structures of hydrogels by SEM, the temperature of sol-gel reversibility by viscosimeter and glass transition temperature of hydrogels by DSC. After deposited of BSA and 5-FU into hydrogels, the positions of dispersed particles were observed by CLSM.

In loading studies, in-vitro conditions (pH=7.4, 25°C), BSA and 5-FU were deposited into hydrogels. 1 mg/ml and 3 mg/ml BSA solutions prepared with phosphate buffer saline, were used for embedding method. Obtained embedded amount (0.0136 g) was used for crosslinking method as an amount of powder form and 2.6 ml of 5 mg/ml BSA solution. BSA was released throughout 20 days from hydrogels loaded with embedding and throughout 15 days from hydrogels loaded with crosslinking method. Releasing of BSA from hydrogels was observed with Fluorescence Spectrophotometer. %10 (w/v) of 5-FU was used in-vitro releasing from hydrogels and observed with UV Spectrophotometer.

During in-vivo studies 1.2 mg 5-FU deposited in 1 ml chitosan hydrogels was injected to Wistar Albino rats intramuscularly. The release profiles of drug was observed with HPLC throughout 60 hours. At the end of in-vivo studies histological investigations were performed on rats.

Keywords: Sol-gel reversible hydrogels, chitosan, BSA, 5-FU, injectable hydrogels, in-vivo drug delivery

Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe University, Chemical Engineering department, Chemical Engineering Section

TEŞEKKÜR

Gerek lisans gerek yüksek lisans çalışmalarım boyunca bütün özellikleriyle beni kendisine hayran bırakan, beni destekleyip sabrını ve sevgisini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr Menemşe Gümüşderelioğlu'na

Çalışmalarında yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen Doç Dr. M.Ali Onur'a

Çalışmalarında sonsuz katkıları bulunan değerli labaratuvar arkadaşlarım, Araş. Gör. Ayşe Karakeçili'ye, Araş. Gör. Esin Aslankaraoğlu'na, Araş. Gör. Alper K. Doğan'a, Araş. Gör. Pelin Ağı'ye, Araş. Gör. Hilal Şaşmazel'e, Müge Daştan'a, Deniz Erce'ye,

Sınırsız kahkahalara sebep olan, tüm detayları kaçırmadan espiye dönüştüren, hayatımda eksikliklerini ve desteklerini her zaman hissedeceğim sayın Araş. Gör. Taşkın Irmak'a, Araş. Gör. Yeliz Durak'a, Araş. Gör. Seda Tıgılı'ya, Araş. Gör. Hande Türköz'e, Araş. Gör. Begüm Elmas'a Araş. Gör. Ender Aslan'a, Araş. Gör. Oğuzhan Çağlayan'a, Araş. Gör. Ferda Gönen'e ve Belgin Aslan'a, Güray Güven'e, K. Utku Özen'e, ve Yalaz Yalçın'a

Altı yıldır bıkmadan sızlanmalarına dayanıp, en iyi en kötü anlarımda yanımda olan maddi manevi beni destekleyen canım arkadaşlarım Araş. Gör. Osman Okur'a, Erinç Ozan'a, Soner Çakmak'a ve Tuğrul Tolga Demirtaş'a

Hem hocam hem de arkadaşım olarak beni hep destekleyen, bilgisi ve tecrübelerinden bolca yararlandığım sayın Prof. Dr. Abdürrezzak Öncü'ye

İyiye kötüyü, güzeli çirkini birlikte yaşadığım dileklerimiz için birbirimiz için olduğunu bildiğim canım arkadaşım Sayın Sezin Ertan Gönen'ne

Her sabah bölüme geldiğimde güler yüzüyle beni karşılayıp sıkı sıkı sarılarak doyumsuz dostluğunu eksik etmeyen canım arkadaşım, ablam ve sırdaşım, tanıdığım en farklı ve en inanılmaz insan, sayın Araş. Gör. Berna Çağlayan'a

Tüm öğrenim hayatım boyunca özlem ve sevgiyi yoğurup, beni hep destekleyip gözeten, onlarsız asla ayakta kalamayacağım, her şeyim aileme

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hidrojeller.....	4
2.1.1. Sıcaklık duyarlır Sol-Jel Geçiş Özelliğine Sahip Hidrojeller.....	5
2.1.1.1. Doğal polimerlerden sentezlenen hidrojeller.....	7
2.1.1.1.a. Kitosan.....	8
2.1.1.2. Sentetik polimerlerden sentezlenen hidrojeller.....	15
2.1.1.2.a. N-isopropil akrilamid kopolimerleri.....	15
2.1.1.2.b. PEG/PPO blok kopolimerleri ve bunların türevleri.....	17
2.1.1.2.c. PEG/PLGA blok kopolimerleri.....	19
2.2. Sol-Jel Faz Değişim Mekanizmaları.....	21

2.2.1. Yumak-Heliks Konformasyonu.....	22
2.2.2. Yüksek Sıcaklıklarda Suyun Az Çözücülüğü.....	23
2.2.3. Unimer- Misel Konsantrasyonu.....	23
2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	25
2.3.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler.....	27
2.3.2. Enjekte Edilebilir Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	27
2.3.3. Protein İlaçların Kontrollü Salımı.....	28
2.3.4. Şişme ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi.....	30
2.3.4.1. Şişme Kinetiği.....	30
2.4. Salım Kinetiği.....	33
3. DENEYSEL ÇALIŞMA.....	37
3.1. Kimyasal Maddeler.....	37
3.2. Kitosan Hidrojellerin Hazırlanması.....	38
3.3. Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları.....	39
3.3.1. Şişme Deneyleri.....	39
3.3.2. FT-IR Analizleri.....	39
3.3.3. SEM Analizleri.....	40
3.3.4. DSC Analizleri.....	40
3.3.5. Mekanik Dayanım Testleri.....	40
3.3.6. CLSM Testleri.....	41
3.3.7. Viskozimetrik İncelemeler.....	41

3.4. Salım Çalışmaları.....	41
3.4.1. Jellere Protein Yükleme.....	41
3.4.2. In-vitro Salım Çalışmaları.....	42
3.4.3. In-vivo Salım Çalışmaları.....	43
3.4.4. Histolojik Çalışmalar.....	44
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI.....	46
4.1. Kitosan Jellerin Seçimi ve Üretimi.....	46
4.1.1. Kitosan Jelleri Seçimi.....	46
4.1.2. Kitosan Jellerin Üretimi.....	48
4.2. Jellerin Karakterizasyonu.....	50
4.2.1. FT-IR Analiz Sonuçları.....	50
4.2.2. SEM Analiz Sonuçları.....	54
4.2.3. DSC Analiz Sonuçları.....	57
4.2.4. Mekanik Dayanım Testlerinin Sonuçları.....	59
4.2.5. CLSM Analiz Sonuçları.....	60
4.2.6. Viskozimetrik Analiz Sonuçları.....	62
4.3. Şişme Deneyleri.....	62
4.3.1. Şişme Kinetiğinin Matematiksel Analizi.....	64
4.4. Jellerden BSA Salımı ile İlgili Sonuçlar ve Tartışılması.....	66
4.4.1. Hidrojellere Protein Yükleme.....	67
4.4.2. Protein Salım Kinetiği ile İlgili Sonuçlar.....	69

4.4.3. BSA Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi.....	72
4.5. Jellerden 5-FU Salımı ile İlgili Sonuçlar ve Tartışılması.....	73
4.5.1. In-vitro Ortamda Jellerden 5-FU Salımı.....	73
4.5.2. In-vivo Ortamda Jellerden 5-FU Salımı.....	74
4.5.3. In-vivo Salım Çalışmaları Sonucunda Dokulara Uygulanan Histolojik İnceleme Sonuçları.....	77
5. GENEL SONUÇLAR.....	80
6. EKLER.....	84
EK 1. Şişme Kinetik Çalışmaları ile İlgili Veriler.....	84
EK 2. BSA'nın Kantitatif Tayini.....	85
EK 3. BSA Yüklü Jellerden Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması.....	86
EK 4. In-vitro Koşulda 5-FU Kantitatif Tatini.....	90
EK 5. In-vivo Ortamda 5-FU Tayini.....	91
EK 6. 5-FU Yüklü Jellerden In-vitro Ortamda Kümülatif Salım Salım Değerlerinin Hesaplanması.....	92
EK 7. 5-FU Yüklü Jellerden In-vivo Ortamda Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması.....	94
EK 8. In-vivo Deneyler İçin Alınan Etik Kurul Onayı.....	96
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	97
8. ÖZGEÇMİŞ.....	103

SİMGELER ve KISALTMALAR

SİMGELER

ϕ_m	Misellerin hacimsel kesri
M_t	Polimerden t anında absorplanan veya desorplanan kütle
M_∞	Polimerden dengede ($t=\infty$) absorplanan veya desorplanan kütle
k	Ampirik hız sabiti
n	Transport üsteli
t	zaman
L	Absorplanan veya desorplanan kütlenin kalınlığı
D	Difüzyon katsayısı
T_m	Erime sıcaklığı

KISALTMALAR

CGC	Kritik jel derişimi
PEG	Poli etilen glikol
PPO	Poli propilen oksit
PEO	Poli etilen oksit
GP	Gliseril fosfat
BSA	Sığır serum albumini
5-FU	5-fluorouracil
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
SEM	Scanning electron microscope
DSC	Differential scanning calorimetry
UV	Ultra violet
HPLC	High performance liquid chromatography
LCST	Low critical solution temperature
IPN	interpenatrating network
HPN	Hybridepenatrating network
PVA	Poli vinil alkol
EWC	Equilibrium water content
HCl	Hidroklorik asit
KBr	potasyum bromür
FITC	Fluoresceinisothiocyanate

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Bazı sıcaklık duyarlı hidrojellerin kimyasal yapıları	6
2.2. Kitin doğal polimerinin kimyasal yapısı	8
2.3. Kitin'in deasetilasyon işlemi	9
2.4. Kitosan doğal polimerinin kimyasal yapısı	9
2.5. Çapraz bağlanma ile oluşan kitosan zincirlerinin yapıları	10-11
2.6. pH duyarlı şişme ve ilaç salımı	13
2.7. Kitosan/Poli(vinilalkol) kompleks hidrojellerin yapısı	14
2.8. Poli(etilenoksit-b-propilenoksit-b-etilenoksit) kopolimerinin kimyasal yapısı	17
2.9. PEG-PLLA-PEG triblokkopolimerinin kimyasal yapısı	19
2.10. PEG-PLLA-PEG Triblokkopolimeri için sol-jel geçişi. (●) 5000–2040–5000; (■) 5000–3000–5000; (▼) 5000-5000-5000	20
2.11. PEG-PLGA-PEG triblokkopolimer çözeltisi için jelleşme faz diyagramı	20
2.12. Jelleşmede etkili olan kuvvetlerin gösterimi	22
2.13. Yumak-heliks konformasyonu için jelleşme mekanizması	23
2.14. PEO-PPO-PEO (Poloxamer) hidrojelinin jelleşme mekanizması	25
2.15. İlaç plazma konsantrasyonunun zamanla değişimi	26
3.1. Yükleme ve salım çalışmalarında kullanılan maddeler a) Model protein BSA b) Etken madde 5-FU	37
3.2. Kitosan-bazlı membranların hazırlanması	39
4.1. Kitosan pelletten alınan FTIR spektrumu	52

4.2.	Değişik çapraz bağlayıcı miktarları ile hazırlanmış kitosan membranlar	53
	(a) 1.00 ml GP tuzu, (b) 0.75 ml GP tuzu,	
	(b) (c) 0.50 ml GP tuzu, (d) 0.25 ml GP tuzu	
4.3.	Emdirme yöntemi ile BSA yüklenmiş kitosan membrandan alınan FTIR spektrumları	53
	(a) 1 mg/ml BSA çözeltisi, (b) 3 mg/ml BSA çözeltisi	
4.4.	Çapraz bağlama yöntemi ile BSA yüklenmiş kitosan membrandan alınan FTIR spektrumları	54
	(a) 5 mg/ml BSA çözeltisi, (b) 0.0136 g katı BSA	
4.5.	BSA yüklü kitosan membranlar	55-56
	a) Membran yüzeyi (büyütme x 120)	
	b) Membran kesiti (büyütme x 670)	
	c) Membran kesiti (büyütme x 1100)	
4.6.	5-FU yüklü kitosan membranların yüzey fotoğrafı (büyütme x 650)	57
4.7.	Ticari kitosana için DSC diagramı	57
4.8.	D2 jeli için DSC diagramı	58
4.9.	Emdirme yöntemi ile yüklenmiş Kitosan/BSA jeli için DSC diagramı	59
4.10.	0.5 ml GP tuzu ile çapraz bağlanmış kitosan membrana ait çekme eğrisi	60
4.11.	BSA yüklü kitosan jellerin CLSM görüntüleri	61
	a) Emdirme yöntemi ile BSA yüklü jel (x 40 büyütme)	
	b) Emdirme yöntemi ile BSA yüklü jel (x 63 büyütme)	
	c) Çapraz bağlama yöntemi ile BSA yüklü jel (x 40 büyütme)	
	d) Çapraz bağlama yöntemi ile BSA yüklü jel (x 63 büyütme)	
4.12.	Kitosan çözeltisinde sıcaklıkla viskozite değişimi	62

4.13. Değişik çapraz bağlayıcı oranlarıyla hazırlanan kitosan membranlara ait şişme sonuçları	63
4.14. Çalışma kapsamında hazırlanan membranların kesirsel şişme(F)-zaman eğrileri	65
4.15. Çözelti konsantrasyonunun BSA yüklemesine etkisi	68
a) Başlangıç çözelti konsantrasyonu: 3 mg/ml	
b) Başlangıç çözelti konsantrasyonu: 1 mg/ml	
4.16. Emdirme yöntemi kullanılarak yüklenmiş S1 jelinden BSA salımı	70
4.17. Çapraz bağlama yöntemi kullanılarak yüklenmiş jellerden salım	71
4.18. Emdirme yöntemi kullanılarak yüklenmiş jellerden ilk 5 saatte salım	72
4.19. Çapraz bağlanma yöntemi kullanılarak yüklenmiş jellerden ilk 5 saatte salım	72
4.20. In-vitro ortamda kitosan jellerden 5-FU salımı	74
4.21. In-vivo salım çalışmaları için kullanılan HPLC kromatogram örneği	75
4.22. In-vivo ortamda kontrol olarak 5-FU salımı	76
4.23. In-vivo ortamda kitosan jellerden 5-FU salımı	76
4.24. Histolojik kesit	
a) kontrol dokusu	
b) kontrol grubu ile aynı özellikleri taşıyan kas dokusu	78

4.25. Kas doku içerisindeki kan damarı	78
4.26. Kas doku ve etrafındaki bağ dokusu	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Çeşitli polimerlerin su içerisindeki LCST değerleri	7
2.2. İlaç salım sistemlerinde Poloxamer'in kullanımı	18
2.3. Protein ilaçların salımları için hidrojel kullanımının avantajları	28
4.1. Çapraz bağlayıcı miktarının hidrojel sentezine etkisi	49
4.2. Kitosan miktarının hidrojel sentezine etkisi	50
4.3. Kitosana ait FTIR spektrumların değerlendirilmesi	52
4.4. Mekanik dayanım test sonuçları	59
4.5. Çapraz bağlayıcı miktarına göre jellerin denge şişme değerleri	64
4.6. Tüm örnekler için n, k ve R^2 değerleri	65
4.7. BSA salımında kullanılan jellerin özellikleri ve simgeleri	69
4.8. Salım çalışmalarında kullanılan tüm örnekler için n, k ve R^2 değerleri	73

1.GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Son yirmi yıldır yapılan çalışmalar özellikle polimerik malzemelerin ilaç salım sistemlerinde kullanımları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda, kolay formülasyon, etkili ilaç yükleme, biyouyumluluk, biyobozunurluk, kontrollü kütle aktarımı gibi avantajlar nedeniyle termoplastik, fiziksel olarak çapraz bağlanan hidrojel kullanılmaktadır (Jeong B., 1999).

Hidrojel, fizyolojik koşullar altında sentezlendiklerinde ve istenilen zaman diliminde bileşimlerini koruyabildiklerinde pek çok yarar sağlayabilmektedirler. Ayrıca, oluşan jel biyouyumlu ve oluşan zararsız biyobozunma ürünleriyle biyobozunur ise uygulamalarda etkin bir şekilde kullanılabilir (Jeong B., 2002).

Hidrojel polimerik malzemeler içinde biyomedikal uygulamalar için en uygun sınıfı oluştururlar. Hidrojel, düşük oranda polimer yüksek oranda çözücü içerirler (sulu çözeltilerde ağırlıkça %1-30 oranında polimer). Düşük yüzey gerilimleri, yüksek molekül ağırlığı, yüksek oksijen geçirgenliği ve mekanik dayanımları ile yumuşak fizyolojik dokulara benzemektedirler (Crampton K.E., 2005).

Enjekte olabilen hidrojel kontrollü ilaç salımında önemli yer tutmaktadır (Singh D., 2000). Araştırmalar enjekte olabilen sistemler içerisinde cerrahi müdahaleye gerek duyulmaması nedeniyle, sıcaklık duyarlı, sol-jel geçiş özelliğine sahip polimerler üzerine yoğunlaşmıştır.

Sol-jel faz geçiş özelliğine sahip polimerlerde sol faz akışkan faz jel faz ise polimer şişip şeklini tamamladığında, belli bir zaman aralığında akmayan faz olarak tanımlanmaktadır. Kritik jel derişiminin (CGC) üzerinde jel faz ortaya çıkar ve genellikle polimerin molekül ağırlığı ile ters orantılıdır (Jeong B., 2002).

Bu tip jelleşme özelliğine sahip polimerlerden ticari olarak bulunan ve en yaygın olarak kullanılan PEG-PPO-PEG termoset triblok-kopolimeridir. Ticari olarak Pluronic olarak adlandırılan bu yapı CGC üzerinde, iki geçiş sıcaklığı arasında jel, diğer sıcaklıklarda çözelti halinde bulunmaktadır. ¹³C-NMR spektroskopisinde PPO'nun dehidrasyonunun jelleşmeyi sağladığı ortaya çıkmıştır (Moghimi M., Hunter C., 2000). Pluronic, her ne kadar ticari olarak yaygın biçimde kullanılsa

da, in-vivo deneylerde LD₅₀ değerin yüksek bulunması, düşük fizyolojik bozunmaya sahip olması, vücut içerisinde jelin kısa sürede çözünmesi yüzünden uzun süreli tedavilerde kullanılamaması ve deneyler sırasında beklenmedik plasma kolesterol düşüşü ve trigliserid artışı gözlenmesi gibi dezavantajlara sahiptir (Jeong B., Kim S. W., 1999).

Bu dezavantajlardan dolayı araştırmalar doğal bir polimer olan kitosan üzerine yoğunlaşmıştır. Kitosan, pH bağımlı, katyonik bir polisakkarittir ve kabuklulardan sağlanan kitinin alkil deasetilasyon işleminden elde edilmektedir. Asetik asit ve formik asit gibi oldukça seyreltik asitlerde çözünebilen kitosan $\beta(1-4)2$ -amino-2-deoksi-D-glukoz tekrarlanan gruplarından oluşmaktadır. Kitosan bozunma ürünlerinin vücut içerisinde herhangi bir zararlı etkisi görülmemiştir (Chenite A., 2000).

Sol-jel geçiş özelliğine sahip kitosan hidrojellerin hazırlanmasıyla ilgili çalışmalar kitosan sulu çözeltisine tek bir anyonik uç taşıyan glukoz-fosfat tuzu eklemeye yoğunlaşmaktadır (Jeong B., 2002). Bu çözelti 37°C'ye çıkarıldığında nötr pH'da homojen berrak bir jel haline gelir. Bu yapıda ilk jelleşme kuvvetinin nötr kitosan moleküllerindeki hidrofobik kuvvetlerden kaynaklandığına inanılmaktadır. Sıcaklık arttırıldıkça tuzun su üzerindeki etkisiyle (çözücü etkisini azaltılması açısından) bu kuvvetler desteklenir.

Bu çalışmada, 0.50 ml GP tuzu (560 mg GP tuzu/1 ml su) ile çapraz bağlanmış kitosan hidrojellerinin özellikleri incelenmiş ve bu jellerden in-vitro ortamda sığır serum albumini (BSA) ve 5-FU salımı ile in-vivo ortamda 5-fluorouracil (5-FU) salımı incelenmiştir.

Hazırlanan hidrojeller, 37°C'de pH=7.4 fosfat tampon ortamında gerçekleştirilen dinamik şişme deneyleri, FT-IR ve SEM analizleri ile karakterize edilmiştir. Mekanik dayanımlarının belirlenebilmesi için mekanik çekme deneyleri yapılmıştır. Sol-jel faz değişim sıcaklığının gözlenebilmesi için viskozimetrik incelemeler ve ısı özelliklerinin belirlenebilmesi için DSC analizleri yapılmıştır. BSA yüklemesi sonucunda proteinin jel içerisinde dağılımını gözlemek için konfokal lazer mikroskop ile fotoğrafları alınmıştır.

Yüklemesi yapılan BSA'nın ve 5-FU'nun salım davranışları in-vitro koşullarda incelenmiş ve kantitatif salım BSA için floresan spektrofotometresi, 5-FU için UV spektrofotometre kullanılarak hesaplanmıştır. Bu aşamadan sonra gerçekleştirilen in-vivo salım çalışmaları için hayvan deneyleri gerçekleştirilmiş ve uygulanan deney protokolüne göre sonuçlandırılmış doku örneklerinin histolojik analizleri yapılmıştır. In-vivo çalışmalarda 5-FU'nun salımı HPLC ile incelenmiştir.

Çalışmadan elde edilen tüm bulguların ışığında kitosan/GP bazlı hidrojellerin enjekte edilebilir, kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanım açısından uygun olduğu ve geniş molekül ağırlığı aralığındaki ilaçların etkin biçimde salımında kullanılabileceği söylenebilir.

2. TEMEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi özetlenmiştir. İlk olarak hidrojeller, çeşitleri, sıcaklık duyarlı sol-jel geçiş özelliğine sahip hidrojeller ve sol-jel geçiş mekanizmaları hakkında bilgi verilmiş, daha sonra kontrollü ilaç salım sistemleri, özellikle enjekte edilebilir kontrollü ilaç salım sistemleri, protein ilaçların kontrollü salımı ve şişme ve salım kinetiğinin matematiksel analizi konularına ayrıntılı olarak değinilmiştir.

2.1. Hidrojeller

Hidrojeller çok miktarda su ve biyolojik sıvıları absorplayabilen, polimerlerin kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanmasıyla oluşan, üç-boyutlu, hidrofilik, ağ şeklindeki özel polimerlerdir. Polimer suda hızla şişer ve üç boyutlu yapı kazanır. Bu üç boyutlu yapı polimer zincirleri arasında oluşan çapraz bağlanmadan kaynaklanmaktadır. Hidrojel zincirleri arasındaki çapraz bağlanma; kovalent bağlar, hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri veya fiziksel geçişler şeklinde olabilir (Yong Q., Kinam P., 2001).

Hidrojeller fizyolojik koşullarda, istenilen sürede belirlenen şekillerine hızla ulaşip bu şekilleri korudukları için pek çok alanda kullanılabilmektedirler. Ayrıca biyouyumlu oluşları, çözücü taşınımının kolaylığı ve biyobozunurluk özelliklerinden dolayı kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve tıbbi malzeme üretiminde kullanımları artmıştır. Hidrojeller, özellikle büyük ve karmaşık molekül yapısına sahip, yavaş salınan tedavi edici ajanların kontrollü salım çalışmaları, doku bariyerleri ve doku mühendisliği için uygundur (Chenite A. 2000).

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde hidrojellerin en büyük yararı, ilacı vücut içerisinde karşılaşılabileceği ortam değişikliklerinden koruyabilmesidir. Bunlara örnek olarak ilacı inhibe edebilecek enzimler, ortam pH'ı veya bakteriyel inhibisyonlar sayılabilir (Yong Q., Kinam P., 2001).

Hidrojeller yapılarında “sensor” (algılayıcı) olarak tanımlanabilecek çeşitli gruplar taşıyabilirler. Böylece hidrojel, çevrede meydana gelen çeşitli değişikliklere hacimsel değişimlerle çok kısa sürelerde cevap verir. Bu özelliklerinden dolayı bu tür polimerlere “akıllı polimerler” denir (Park K., Park H., 1999).

Hidrojellerde hacimsel değişimleri meydana getiren uyarıcılar fiziksel ve kimyasal olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Fiziksel uyarıcılar; sıcaklık, elektrik alan, çözücü bileşimi, ışık, basınç, ses ve manyetik alandır. Kimyasal veya biyokimyasal uyarıcılar ise pH, iyonlar ve spesifik moleküler etkileşimlerdir (Hoffman, A.S., 1997).

Son yıllarda hidrojeller üzerine yapılan çalışmalar, hidrojellerin fotopolimerizasyon ile sentezleri ve faz geçiş özellikleri üzerine yoğunlaşmıştır.

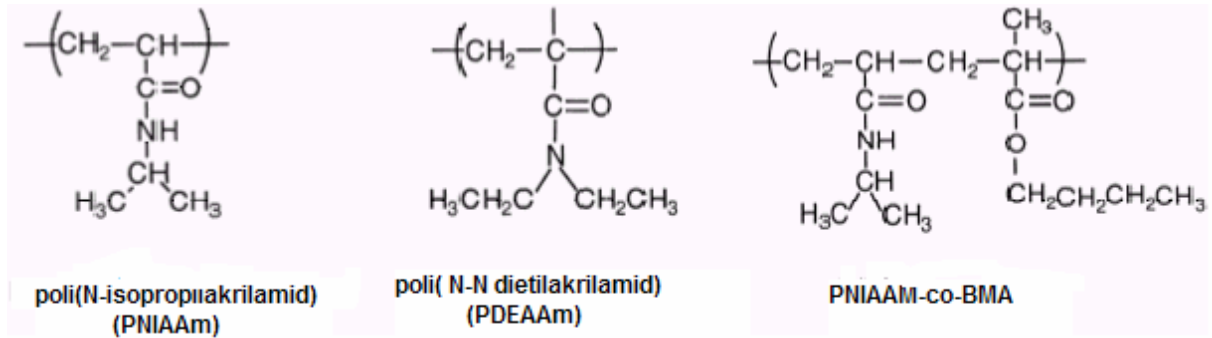
2.1.1. Sıcaklık Duyarlı Sol-Jel Geçiş Özelliğine Sahip Hidrojeller

Hidrojellerin, in-vivo ortamlarda oldukça yaygın olarak kullanımlarındaki en önemli etkenlerden biri, daha önce de bahsedildiği gibi faz değişim özellikleridir (Kinam P., 2001).

Hidrojeller çevreden gelen çeşitli uyarılara karşı şişerek veya büzüşerek, yani hacimsel değişikliklerle tepki verirler. Hidrojeller bu tepkilerle kontrollü ilaç salım sistemlerinde ilacın salım periyodunu belirlerler. Eğer polimer tam ve düzgün olarak çapraz bağlanmamışsa, bu etkilere karşı verdikleri tepkiler “sol-jel faz geçiş” şeklinde olmaktadır (Bromberg, L.E., 1998).

Faz geçişli polimerik sistemlerde “sol faz” akışkan faz, “jel faz” ise hidrojel şeklini tamamladığında, belirlenen zaman aralığında akmayan faz olarak tanımlanmaktadır. Kritik jel derişiminin, (CGC, Critical Gel Concentration), üzerinde jel faz ortaya çıkar. CGC genellikle polimerin moleköl ağırlığıyla ters orantılıdır (Yong Q., Kinam P., 2001).

Pek çok hidrojel sıcaklığa duyarlıdır. Bunlardan en yaygın kullanılanları poli(N-iso-propilakrilamid) (PNIPAAm), Poli(N,N-dietilakrilamid) (PDEAAm), P(NIPAAm-co-BMA)'dır. Şekil 2.1'de bu polimerlerin kimyasal yapıları verilmiştir.



Şekil 2.1. Bazı sıcaklık duyarlı hidrojenlerin kimyasal yapıları

Sıcaklık arttıkça pek çok polimerin suda çözünürlüğü artmaktadır. Bununla birlikte düşük kritik çözelti sıcaklığına (LCST, Low Critical Solution Temperature) sahip polimerlerde sıcaklık arttıkça polimerin suda çözünürlüğü azalır. LCST'nin üzerindeki sıcaklıklarda bu polimerler jelleşirler. Genel anlamıyla jelleşmelerinde polimerin hidrofilik ve hidrofobik gruplarının etkisi vardır. Düşük sıcaklıklarda hidrofilik gruplar arasındaki hidrojen bağları su molekülleriyle yoğun etkileşimdedir ve böylelikle polimer suda çözünüp çözelti halinde bulunur. Sıcaklık arttırıldıkça hidrofobik gruplar arasındaki etkileşim artar, hidrojen bağlarının etkisi azalır ve polimer jel haline geçer. Genel olarak polimer molekülleri arasındaki hidrofobik etkileşimler arttığında polimerin LCST 'si düşer. LCST değeri polimerin hidrofilik ve hidrofobik gruplarının sayısı ile değiştirilebilir (Schild, H.G.,1992).

Sol ve jel arasındaki geçiş sınırı deneysel yöntemlerle belirlenebilmektedir. En basit yöntem "test tüp" yöntemidir. Bu yöntemde test tüpünün içine doldurulan polimer çözeltisinin çalkalanma sonrasında akışkanlığına bakılır. Burada akışkanlık; zamana, çalkalanma hızına, çözelti miktarına ve test tüpünün çapına bağlıdır. Bir diğer yöntem ise bilye kullanarak tayin metodudur. Bu yöntemde test tüpüne doldurulan polimer çözeltisine küçük ve ağır bir bilye atılır ve bilyenin belirlenen zamanda batma hızı tespit edilir. Bilyenin batma hızı, bilyenin yoğunluğuna ve polimer çözeltisinin yüzey gerilimine bağlıdır.

Bazı polimerlerin LCST Değerleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Çeşitli polimerlerin su içerisindeki LCST değerleri

Polimer	LCST (°C)
Poli(N-isopropilakrilamid), PNIPAM	32
Poli(etilenglikol), PEG	~120
Poli(vinil metil eter), PVME	40
Poli(propilenglikol), PPG	50
Poli(metakrilik asit), PMAA	~75
Poli(vinilalkol), PVA	~125
Poli(vinil metil oksazolidon), PVMO	~65
Poli(vinil pirolidon), PVP	~160
Poli(silamin)	~37
Metilselüloz, MS	~80
Hidroksipropilselüloz, HPC	~55
Polifosfazen türevleri	33-100
Poli(N-vinil kaprolaktam)	30

Sıcaklık duyarlı, sol-jel geçiş özelliğine sahip hidrojel, sentezlendikleri polimerin doğal veya sentetik oluşuna göre ikiye ayrılmaktadır.

2.1.1.1. Doğal polimerlerden sentezlenen hidrojel

Günümüze kadar doğal biyopolimer jeller, genellikle gıda teknolojilerinde ve gıda yan ürün proseslerinde kullanılırken son yıllarda yapılan araştırmalar ışığında kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve doku mühendisliğinin pek çok alanında kullanılmaya başlanmıştır (Jeong B., 2002).

Isıl geçiş özelliğine sahip doğal polimerler, jelatin (kollojenin kısmi hidrolizinden ve glisinden oluşur) ve polisakkarit türevleridir. Polisakkaritlere örnek olarak agaroz, amiloz, amilopektin, selüloz türevleri, Gellan® ve kitosan verilebilir (Higgs P.G., 1990).

Doğal polimerlerin en önemli özellikleri, su içerisinde jelleşirken, organik çözücülerde jelleşmemeleridir. Pek çok doğal polimer çözelti formundan jel fazına düşük sıcaklıklarda geçmektedir. Ancak bazı selüloz türevlerinde ve kitosan doğal polimerinde ters jelleşme görülür. Bu doğal polimerler yüksek sıcaklıklarda jelleşirler (Peppas N.A., 1986). Sunulan tez çalışması kapsamında kitosan hidrojel ile çalışıldığından aşağıda bu yapılarla ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir

2.1.1.1.a. Kitosan

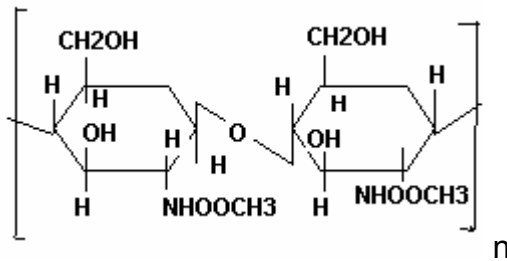
Kitosan, karides ve yengeç kabuklarının doğal bir bileşeni olan kitinin alkil deasetilasyon işleminden elde edilen bir polisakkarittir (Chenite A., 2000).

Kitin, mukopolisakkaritlerden olup, 2-asetamid-2-deoksi-β-D-glukoz tekrarlanan gruplarından oluşan bir polimerdir (Şekil 2.2). Kitinaz enzimiyle bozunabilen polimerin yapısında azot bulunmasına rağmen immünojenitesi son derece düşüktür. Çözünürlüğü ve kimyasal reaktivitesi düşük olan kitin, beyaz, sert, inelastik bir polimerdir (Majeti N. V., 2000).

Kitosan ürününe dönüşen kitinin alkil deasetilasyon derecesi tam olarak tesbit edilememektedir. Ancak minimum % 85 deasetilasyon derecesine sahip kitosanlar elde edilebilmektedir. Deasetilasyon işleminde kabuklulardan elde edilen kitinden fermantasyon prosesleri ile kitosan-glukan kompleksleri üretilir. Ardından bu komplekslerden alkaliler uzaklaştırılır, aynı anda da deasetilasyon gerçekleşir (Kumar R., 2000), (Şekil 2.3).

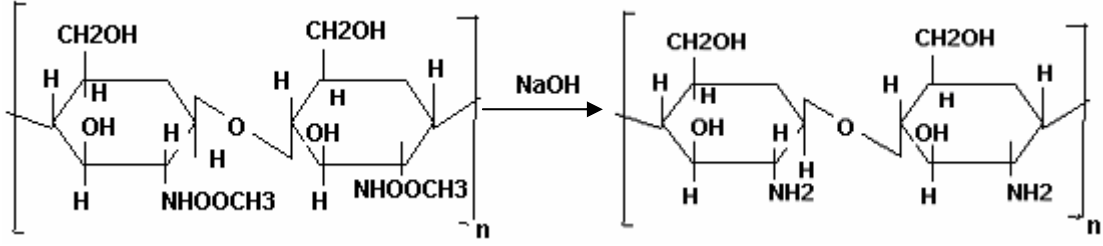
Selüloz, dekstran, pektin, agar ve agaroz gibi polisakkaritlerin çoğu doğada ya asidik halde ya da nötr halde bulunurlar. Ancak kitin ve kitosan bazik halde bulunurlar. Polioksi tuz oluşumu, film oluşturma kabiliyeti, metal şelat iyonları ve optik karakterleri gibi özellikler hem kitin, hem de kitosanda ortak olarak bulunmaktadır (Kumar R., 2000).

Selüloz gibi kitosanın fonksiyonları da polisakkaritlerle benzer, ancak kitosan farklı olarak hidrofobiktir, suda ve birçok organik çözücüde çözünmez, asetik asit ve formik asit gibi seyreltik asit çözeltileri içerisinde çözünür. Oda sıcaklığında kitosan, aldehit ve ketonlarla aldiminaz ve ketominaz oluşturur (Kumar R., 2000).

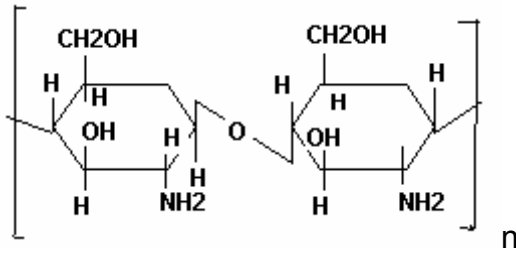


Şekil 2.2. Kitin doğal polimerinin kimyasal yapısı

pH bağımlı, katyonik bir polisakkarit olan kitosan $\beta(1-4)$ 2-amino-2-deoksi-D-glukoz (D-glukozamin) tekrarlanan gruplarından oluşur (Şekil 2.4). Yüksek biyoyumumluluğu ve biyobozunurluğu nedeniyle tıbbi uygulamalarda ön plana çıkmaktadır. Kitosan aynı zamanda vücut içerisinde jel oluştururken herhangi bir modifikasyona ve çapraz bağlanmaya uğramamaktadır. Kitosan türevleri ılımlı şartlarda kolaylıkla elde edilebilirler ve substitute gluklanlar olarak kabul edilirler (Sakai K., 1991).



Şekil 2.3. Kitin'in deasetilasyon işlemi.



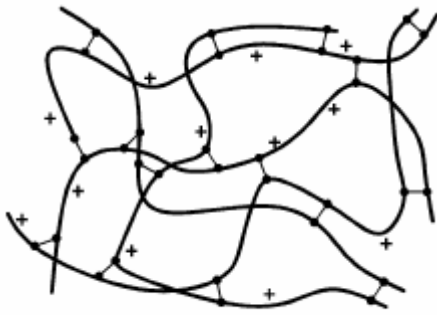
Şekil 2.4. Kitosan doğal polimerinin kimyasal yapısı

Polikasyonik bir polimer olan kitosan polimerindeki yapı, etkileşimler ve etkileşim çeşidine göre kullanım alanları farklılık göstermektedir. Kitosan hidrojellerin oluşumunda sıklıkla kullanılan yöntem, değişik çapraz bağlayıcılar eklenerek oluşturulan kovalent ve iyonik olarak çapraz bağlama yöntemidir. Ancak yapılan in-vivo çalışmalarda özellikle kovalent bağlanmada eklenen çapraz bağlayıcıların toksik etkileri olduğu saptanmıştır. Ayrıca çapraz bağlanmanın tam oluşabilmesi için ek maddelere veya katalizörlere ihtiyaç duyulmaktadır, bu da çapraz bağlanma sonrasında saflaştırma ve çeşitlendirme işlemlerini beraberinde getirmektedir. Bu olumsuz etkileri elimine etmek amacıyla kitosana herhangi bir çapraz bağlayıcı eklenmeden, kitosan zincirleri arasındaki kompleksleşme ile oluşturulan polimerler üzerine çalışmalar başlamıştır (Berger J., Reist M., Gurny R., 2004).

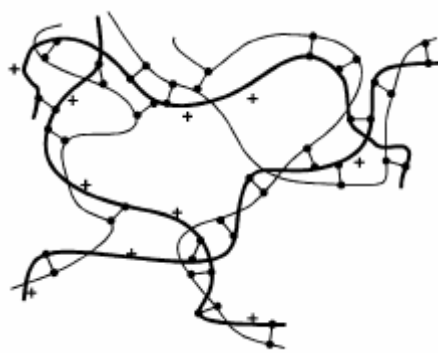
Çapraz bağlanmış hidrojellerde; yapıdaki iç bağlanmalar bir çapraz bağlayıcı ile sağlanır. Çapraz bağlayıcılar, çapraz bağlama amacıyla eklendikleri polimere göre molekül ağırlığı düşük olan yapılardır. Hidrojinin özellikleri çapraz bağlanma yoğunluğuna ve çapraz bağlayıcı türüne göre değişir. Çapraz bağlanma yoğunluğu, çapraz bağlayıcı ajanın mol sayısının polimerin tekrarlanan gruplarının mol sayısına oranıdır. Çapraz bağlayıcı türüne göre bağlanma kovalent veya iyonik olarak sınıflandırılır.

Kovalent bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojelleri

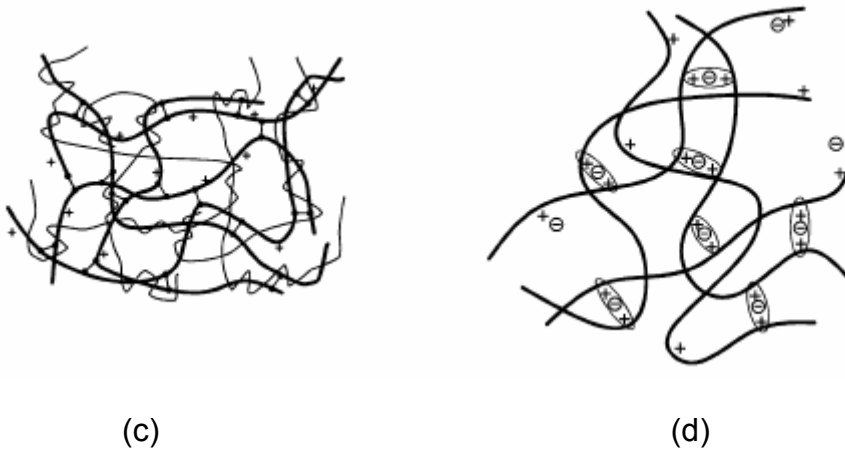
Kovalent bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojelleri üç grupta toplanırlar. Şekil 2.5'de bu gruplar gösterilmektedir. İlk şekilde (Şekil 2.5a) kitosan zincirleri kendi içinde intermoleküler etkileşimlerle çapraz bağ oluştururlar. Bu en basit oluşumlu hidrojel olarak tanımlanmaktadır. İkinci şekilde (Şekil 2.5b) hibrit polimer ağ yapısı (HPN) gösterilmiştir. Burada çapraz bağlanma reaksiyonu kitosan yapısal birimleriyle, başka bir polimerin yapısal birimleri arasında gerçekleşmektedir. Üçüncü şekilde (Şekil 2.5c) yarı IPN (interpenetrating network) yapı verilmiştir. Bu oluşumda çapraz bağlanma öncesinde kitosan çözeltisine, kitosanla reaksiyon vermeyen bir polimer eklenir ve polimer, kitosan zincirleri arasına düz zincir halinde hapsolür. Ortama kitosanla birlikte çapraz bağlanan reaktif polimer eklenirse IPN yapı oluşur (Berger J.,2004).



(a)



(b)



Şekil 2.5. Çapraz bağlanma ile oluşan kitosan zincirlerinin yapıları

- a) kendi arasında çapraz bağlanan kitosan zincirleri b) Hibrit polimer ağ yapısı
c) yarı-IPN yapısı d) iyonik olarak çapraz bağlanmış kitosan zincirleri

Şekilde kalın çizgiler kitosan zincirlerini, ince çizgiler eklenen polimeri, noktalı kalın kısa çizgiler kovalent çapraz bağları, '+' lar kitosanın pozitif yükü, gösterirler.

Şekil 2.5a,b,c'de gösterilen yapılarda ana etkileşim kovalent bağlanmadır. Ancak hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler gibi ikincil kuvvetler de göz ardı edilemezler. İkincil kuvvetler kitosanın asetillenmiş birimlerinde olur ve katı benzeri hidrojellerin oluşumunu sağlarlar.

Çapraz bağlayıcılar polimer zincirleri arasında köprüler meydana getirecek en az iki reaktif fonksiyonel gruba sahip moleküllerdir. Günümüze kadar kitosan için kullanılan çapraz bağlayıcılar glutraldehit gibi dialdehitlerdir. Dietilsquarat, okzalikasit, genipin gibi çapraz bağlayıcıların üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Genipin genellikle bitkisel ilaçlarda ve gıda boyalarında kullanılan doğal bir maddedir.

Çapraz bağlayıcılara bir diğer yaklaşım ise HPN lere benzer kovalent bağlar oluşturan, fonksiyonel gruplara sahip, suda çözünebilir, biyoyumlu polimerlerdir. Aslında bu polimerler yüksek molekül ağırlığına sahip oldukları için çapraz bağlayıcı olarak adlandırılmamaktadır. PEG, PVA bu gruba örnek verilebilir.

Kovalent bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojelleri suyun difüzyonla geçişini sağlayabilirler. Kuvvetli mekanik özelliklere sahiptirler, bu nedenle yaygın olarak destek malzemesi olarak kullanılırlar. Biyoyumlulukları tam olarak

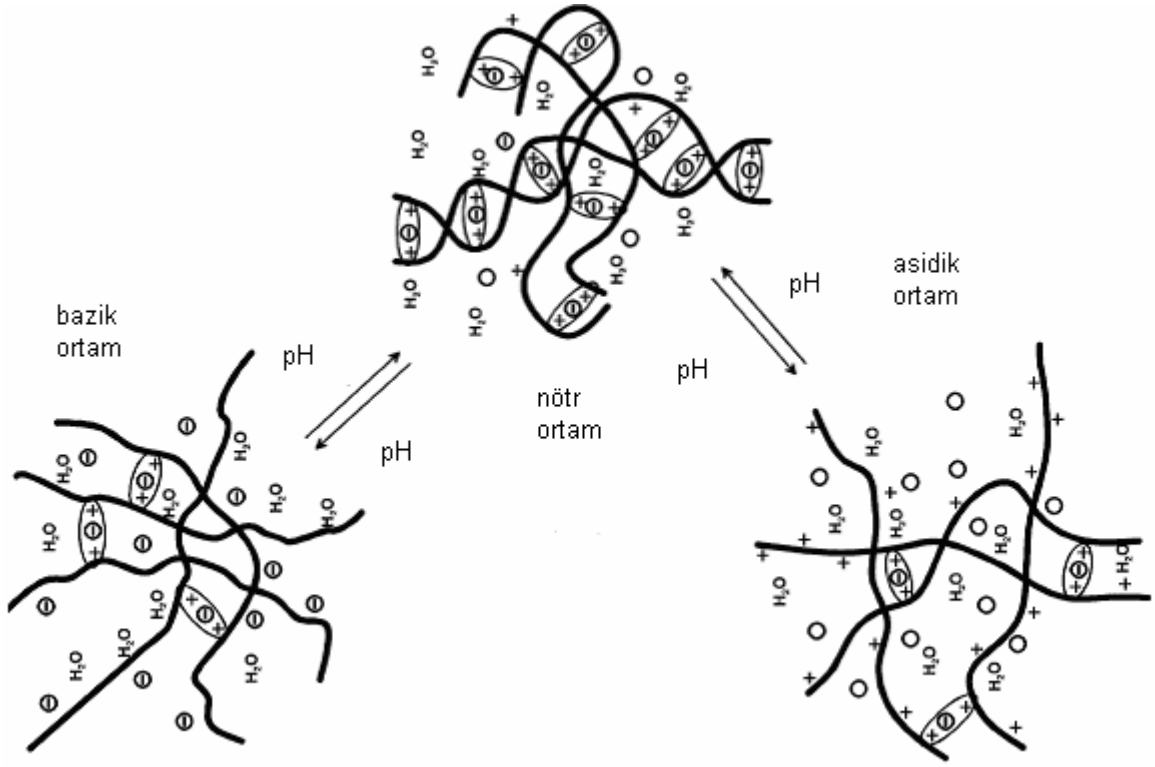
açıklanamamıştır. Eklenen çapraz bağlayıcıların toksik veya mutajenik etkileri görülmüştür. İlaç salım sistemlerinde bazik ortamlarda pH kontrolleri ve şişme özellikleri düşüktür. Çapraz bağlanma sırasında yapının kararlılığını arttırmak için ek bazı maddeler katılır, bu da çapraz bağlanma sonrasında ekstra saflaştırmaya ve modifikasyona ihtiyaç duyulmasına neden olur (Berger J.,2004).

İyonik bağlarla çapraz bağlanmış kitosan hidrojelleri

Polikatyonik bir polimer olan kitosan iyi bir şelat oluşturucu ajandır. Böylece negatif iyonlar ve moleküllerle tepkime verip iyonik köprüler oluşturur. Genel olarak etkileşim çapraz bağlayıcının negatif yükü ile kitosanın pozitif yükü arasında oluşur.

İyonik çapraz bağlanmış kitosan hidrojeller oluşturmak için kitosanın bir çözücü içerisinde dağılması sağlanır ve yüklü bir çapraz bağlayıcı ajan kullanılır. Fe (III), Mo(VI), Pt(II) iyonları bu gruba örnek verilebilir. Oluşum prosesi oldukça basittir, herhangi bir ek madde veya katalizöre gerek duyulmaz. Çapraz bağlayıcı ajan kitosan çözeltisine doğrudan eklenerek çapraz bağlanma gerçekleştirilir. Bu tip çapraz bağlanma çapraz bağlanma yoğunluğuna, molekül boyutuna, yük miktarına, kitosan için molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesine bağlıdır.

İyonik çapraz bağlanmış kitosan hidrojellerin en önemli kullanım alanları pH duyarlı şişme ve ilaç salımıdır. Bu hidrojeller hem asidik, hem de bazik ortamda şişebilmektedirler. Bu da uygulama alanlarını arttırmaktadır. pH düştüğünde çapraz bağlayıcının yük yoğunluğu düşer ve şişme görülür. pH daha da fazla düşerse kitosan zincirlerinde açılma görülür ve hızlı bir ilaç salımı gerçekleşir. Şekil 2.6' da pH duyarlı şişme ve ilaç salımı gösterilmiştir.



Şekil 2.6. pH duyarlı şişme ve ilaç salımı

Polielektrolitlerle komplekslenmiş kitosan hidrojeller

Polielektrolit kompleksler, (PEC), iki zıt yüklü elektrolitin sulu çözeltilerinin reaksiyonu ile oluşur ve IR ile izlenir. Bu yapılar iyonik etkileşimlere ve yüksek su içeriği ile hidrofilik mikroçevreye sahiptirler.

Polielektrolit kompleksler ile hazırlanan kitosan hidrojellerinde oluşum, kitosan üzerindeki katyonik amino grupları ve diğer polielektrolitteki anyonik grupların etkileşimleri sonucu gerçekleşir. Bu etkileşimin iyonik çapraz bağlanmadan farkı; iyonik çapraz bağlanmada kitosan ile reaksiyona giren maddenin molekül ağırlığı tam olarak bilinmekteyken PEC'lerde molekül ağırlığı geniş bir dağılıma sahiptir. PEC'lere xylan, hidrojen ve amid gruplu polimerler, poliakrilik asit, kollojen, akeratoz ve genel olarak polianyonlar örnek verilebilir.

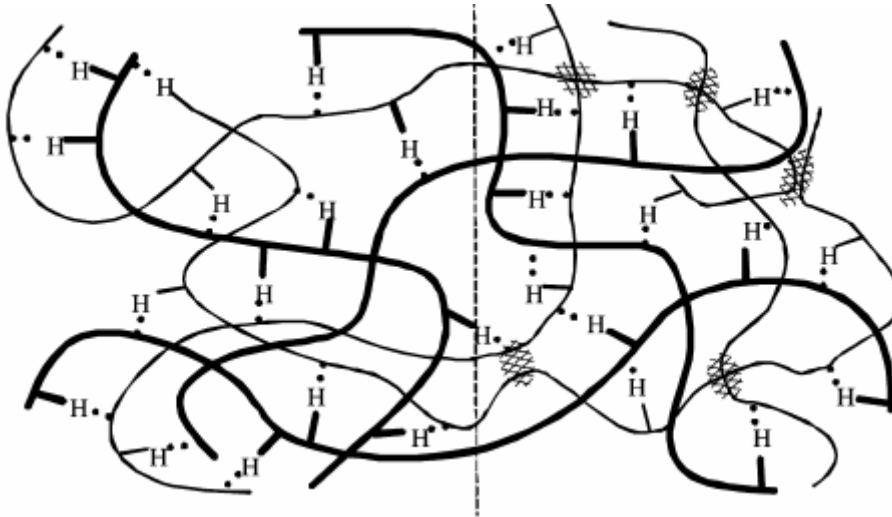
PEC oluşumunda her iki polimer de zıt yükler oluşturacak şekilde iyonlaşır. Bu da her iki polimerin pKa değerleri arasına denk gelecek bir pH'da olayın gerçekleşmesini gerektirir (Berger J.,2004).

PEC'lerin oluşum özellikleri iki polimer arasındaki etkileşimin derecesine göre

çeşitlilik gösterir. Ayrıca pH, T, iyonik kuvvetler, polimerin esnekliği, çözücünün doğası da yapıyı etkiler. Oluşturulan hidrojel yapıların farklı özelliklerine göre kullanım alanları da farklılık göstermektedir.

Kitosan/Poli(vinilalkol) kompleks hidrojelleri

Kitosan/PVA kompleks hidrojelleri yapısı, özellikleri ve uygulama alanlarıyla PEC'lere benzer özellikler gösterirken, yapısal etkileşimleri açısından farklılık göstermektedir. Burada eklenen polimer PVA, kitosan ile doğrudan etkileşime girer. Bu kompleks iki şekilde hazırlanır. Şekil 2.7'de bu metodlarla hazırlanan komplekslerin yapısı görülmektedir. İlk yöntemde hidrojeller otoklav metodu ile hazırlanmaktadır. Bu yöntemde PVA ve Kitosan polimerlerinin çözeltileri birbirleriyle karıştırılıp otoklava yerleştirilmektedir. Zincirler arasındaki temel bağlanmayı hidrojen bağları sağlamaktadır. Diğer yöntem "soğuk dövme" (freeze-thaw) yöntemidir. Burada hidrojen bağlarına ek olarak kristallenmiş bağlanma bölgeleri oluşur. İlk metodla elde edilen kompleksler asidik ortamlarda kolayca çözünmekte ve hücre kültüründe destek malzemesi olarak kullanılmakta iken, ikinci kompleks zor çözünmekte ve ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır.



Şekil 2.7 Kitosan/Poli(vinilalkol) kompleks hidrojellerin yapısı

Bu kompleks yapıların hücre kültüründe kullanımlarında PVA'nın kitosana göre daha hidrofilik olma özelliği ön plandadır. Bu yüzden kompleks oluştuğunda kitosan yüzeyde uniform şekilde dağılır. Böylece kitosanın amin gruplarıyla hücreler arasında etkileşimler oluşur ve hücrelerin yapışması sağlanır.

İlaç salım sistemleri için ise oluşan kompleksin düzensiz yapısından yararlanılır. Böylece yüksek oranda şişme gözlenir.

Aşılanmış kitosan hidrojeller

Aşılama ile kitosan hidrojellerin oluşumunda kitosan üzerindeki aşılabilir iki reaktif grup kullanılır. Bunlar;

-Asetillenmeyen birimlerdeki amino grupları

-Hem asetillenen, hem de asetillenmeyen birimlerdeki hidroksil gruplarıdır. Hidrojel içerisindeki etkileşim kitosan zincirlerinin birbirleriyle ve aşılanmış yapılarla olan etkileşimidir. Aşılama yapıya göre ek ikincil kuvvetler de ortaya çıkabilir. Aşılanmış hidrojellerin oluşumu için kitosan, aşılacak bir polimer ve genellikle katalizör gereklidir. Bu yüzden işlem sonrasında ekstra saflaştırmaya gerek duyulur.

Aşılanmış hidrojeller kovalent bağlı hidrojellere net bir üstünlük gösterememiştir. Genellikle toksik ek maddelere ihtiyaç duyarlar. İyonik etkileşimlere sahip olmadığı için ilaç salım sistemlerinde kullanımları güçtür. Hazırlanışları ve yönetimleri zordur. Ancak özel tıbbi uygulamalar için modifiye edilebilirler (Berger J., Peppas N.A., 2004).

2.1.1.2. Sentetik polimerlerden sentezlenen hidrojeller

İlaç salım sistemlerinde son 30 yıldır yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak sentetik polimerler, yani doğada polimerik halde bulunmayıp, monomerlerden sentezlenen polimerler üzerinde yapılmaktadır.

Sentetik polimerler içerisinde sol-jel geçiş özelliğine sahip olanlar ağırlıklı olarak düşük kritik çözelti sıcaklığına sahip olan polimerlerdir. Bunlar; N-isopropil akrilamid kopolimerleri, PEG/PPO blok kopolimerleri ve bunların türevleri, PEG/PLGA blok kopolimerleri'dir.

2.1.1.2.a. N-isopropil akrilamid kopolimerleri

Sulu sistemlerde sıcaklık artışıyla oluşan polimer çökeltisi, polimer-çözücü arasındaki intermoleküler kuvvetler ile polimer-polimer arasındaki kuvvetlerin

dengeinden kaynaklanmaktadır.

N-isopropil akrilamid homopolimerleri (poli-NIPAAAM) ve kopolimerleri yapısal özellik ilişkileri, ilaç salım sistemleri, doku mühendisliği ve enzim veya protein modifikasyonu konularında oldukça yaygın olarak araştırılmaktadırlar (Jeong B., 2002).

Poli-NIPAAAM sulu çözeltileri düşük kritik çözelti sıcaklıkları olan 32°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda jelleşmektedirler. Bu sıcaklığın altında polimer molekülleri ile su arasındaki hidrojen bağları (entalpi) polimerin suda çözünmesini sağlamaktadır. Bu sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda hidrofobik etkileşimler (entropi) baskın duruma geçer ve polimerin su içerisinde çökmesini yani jelleşmesini sağlar. Polimerin yapısındaki isopropil grup hidrofobik etkileşimleri sağlarken, karbonil grup hidrofilik etkileşimleri sağlamaktadır. Jelleşmeden sonra da % 83 oranında karbonil grubu su ile hala hidrojen bağı yapmaktadır (Maeda Y., Higuchi T., 2000).

Poli-NIPAAAM için LCST değeri, polimerin hidrofobisiteleri farklı monomerlerle kopolimerizasyonu ile ayarlanabilmektedir. Komonomerin hidrofobikliği arttıkça LCST değeri düşer. Ayrıca polimer topolojisinin değiştirilmesiyle sol-jel kinetiği değiştirilebilir. Poli-NIPAAAM kopolimerlerine oligo-NIPAAAM'lar veya PEG eklendiğinde sıcaklık değişimlerine karşı daha hızlı sonuçlar alınmaktadır. Burada oligo-NIPAAAM dehidrasyonu sağlarken, PEG su kanalları içerisinde hızlı rehidrasyonu sağlamaktadır (Yoshida R, Uchida Y., 1995).

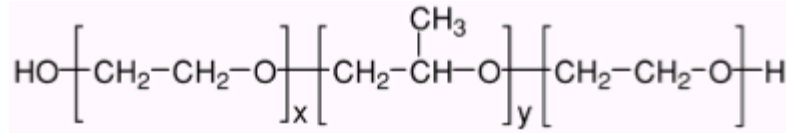
Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, yüksek molekül ağırlıklı NIPAAAM-akrilik asit (%2-5 mol) kopolimerleri benzen içerisinde sentezlendiğinde 32°C civarında herhangi bir histeriye neden olmadan ters jelleşme göstermektedir. Burada elde edilen jel opak, zayıf bir jeldir. Bu jeller hibrit yapay pankreasta islet hücrelerinin depolanmasında kullanılmaktadır. Ayrıca sistem sıcaklığı 25°C'den 37°C'ye çıkarıldığında herhangi bir sitotoksikite görülmemektedir. Bu jelin bir diğer avantajı da, jelin heterojen karakterinden dolayı insüline karşı yüksek geçirgenlik göstermesidir (Lee J. W., ve ark., 2004).

Halen poli-NIPAAAM/poli(etilenglikol) kopolimerleri üzerine çalışmalar sürdürülmektedir. Elde edilen verilere göre bu kopolimer 33°C'de jel fazına

geçmekte ve jelleşmede herhangi bir histeri görülmemektedir (Hennink W.E., 2002).

2.1.1.2.b. PEG/PPO blok kopolimerleri ve bunların türevleri

Günümüzde poli(etilenoksit-b-propilenoksit-b-etilenoksit) (PEO-PPO-PEO), (Şekil 2.8), Pluronic (BASF) veya Poloxamer (ICI) adı altında değişik molekül ağırlıklıklarında ticari olarak bulunmaktadır. Kopolimer konsantrasyonu kritik değerin üzerine çıkarıldığında sol-jel (düşük sıcaklık sol-jel sınırı) faz değişimi ve jel-sol (yüksek sıcaklık jel-sol sınırı) faz değişimi görülmektedir. Bunların yanısıra non-iyonik yüzey aktif madde olarak da kullanılmaktadır.



Şekil 2.8. Poli(etilenoksit-b-propilenoksit-b-etilenoksit) kopolimerinin kimyasal yapısı

Polimer iki geçiş sıcaklığı arasında jel halinde bulunmakta, bu sıcaklıklar dışında çözelti fazına geçmektedir. İki geçiş sıcaklığı polimer bileşimine ve konsantrasyonuna göre değişebilmektedir. Bu sıcaklık aralığı dışında yüksek sıcaklıklarda çözelti, opak bir görünüm kazanır (Hatton T.A., Alexandridis P., 1995).

Sistemin sol-jel geçişinde gösterdiği kararlı davranış, özellikle kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve ilaç yüklemede polimeri çekici hale getirmiştir. Pek çok uygulamada özellikle insülin, üreaz, interleukin-2, epidermal büyüme faktörü (EGF), kemik morfojenik proteini (BMP), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve endotel hücreleri büyüme faktörü (ECGF) gibi protein/peptid ilaçların salımında Poloxamer PF-127 kullanılmaktadır. Salım profilleri uzun saatler boyunca devamlılık göstermektedir. Poloxamer, interleukin-2, epidermal büyüme faktörü ve üreaz için sekiz saat boyunca sıfırıncı dereceden salım profili gösterirken, Trid-sapeptid melantan-I ve mitomycin-C için 4-6 saat salım gözlenmiştir (Johnston T.P., 1992, Fults K.A., 1989, Bhardvaj R., 1996, Miyazaki S., 1992). Poloxamer jellerde polimer konsantrasyonu arttıkça salım hızı azalmaktadır. Salım hızı polimere çeşitli yan maddeler katarak değiştirilebilmektedir.

Poloxamerler üzerinde yapılan hayvan toksisite deneyleri sonucunda sıçanların ağırlıkça % 7.5 oranında Poloxameri kabul edebildikleri, ancak üstü değerleri tolere edemedikleri görülmüştür. Poloxamer 188 ile yapılan deri altı enjeksiyonlarda, fareler için LD₅₀ değeri 5.5 g/kg olarak tesbit edilmiştir.

Mevcut misellerin aşırı su içerisinde dağılmaları yüzünden Poloxamer jel bileşimi bir kaç günden fazla korunamamaktadır. In-vitro deneylerde ağırlıkça % 25'lik Poloxamer 407 jeli 4 saat bileşimini koruyabilirken, % 35'lik ve % 50'lik jeller daha kısa sürede dağılmaktadırlar. Bu yüzden Poloxamer formülasyonları sadece kısa süreli tedaviler için uygundur (Lin H.R., 2000).

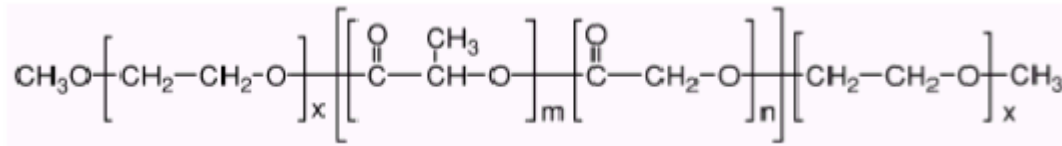
Çizelge 2.2. İlaç salım sistemlerinde Poloxamer'in kullanımı

İlaç	Uygulamalar
Pilokarpin	Poloxamer (PF-127)/ PEG, PVP, PVA, MC,
İnsülin	Poloxamer (PF-127)/ yağ asitleri
Pilokarpin	Karbopol/ Poloxamer, oftalmik ilaç salımı
İnsülin	Poloxamer (PF-127); deri altı enjeksiyon
C-myb antisens oligonükleotid	Poloxamer; başlangıç hiperplesayı önleme
Triphostin-47	Düz kas hücrelerinin proliferasyon
Üreaz	Sıçanlarda intraperitoneal enjeksiyon
İnterleukin-2,	farelerde intraperitoneal enjeksiyon
EGF	Poloxamer (PF-127)
Gen salımı, antibiyotik salımı	Fusojenik peptioloxamer (PF-127)
Lidokain/Ibuprofen	Uzun süreli sistemli absorpsiyon için epidural enjeksiyon (PF-127)
Sulfadiazin	Yara tedavilerinde antibakteriyel ajan
BFGF, BCGF	Poloxamer (PF-127)
Lidokain	Lokal anestezi ile sıçan deneyleri (PF-127)Karbopol/ Poloxamer

2.1.1.2.c. PEG/PLGA blok kopolimerleri

Enjekte edilebilir ilaç salım sistemlerinde sol-jel geçişli hidrojeller için yeni yaklaşımlar, termojelleşme ile birlikte biyobozunurluk ve daha güvenli ve uzun tedaviler için sıfır toksisite değerleri üzerine yoğunlaşmaktadır. PEG/PLGA blok kopolimerleri de bu amaçla araştırılan yeni polimerler arasındadır (Jeong B.,1997).

Poli(etilen glikol-b-L-laktik asit-b-etilen glikol), (PEG-PLLA-PEG), (Şekil 2.9), (5000-2000-5000) sentezinde önce monometoksi PEG üzerinde L-laktid kullanılarak, zincir açılması polimerizasyon tekniği ile PEG-PLLA diblokkopolimeri üretilir, ardından hekzametilen di-izosiyanat çapraz bağlayıcısı kullanılarak triblok kopolimere geçilir (Jeong B., 2002).



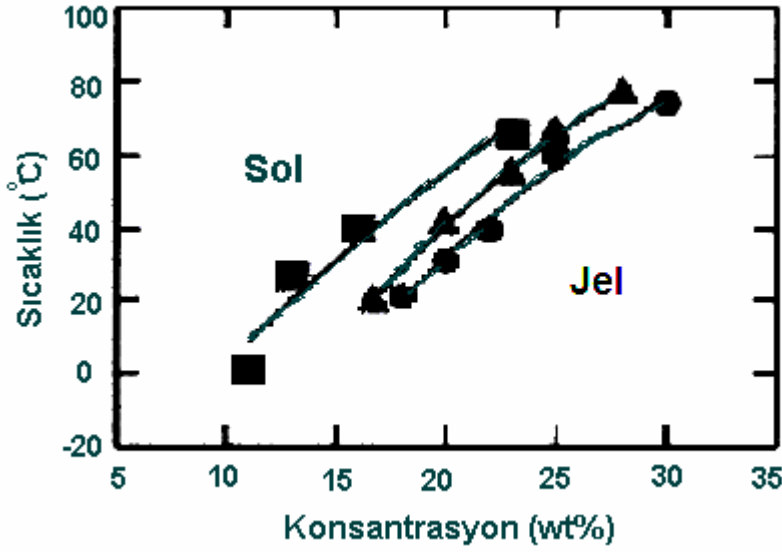
PEG Blok

PLGA Blok

PEG Blok

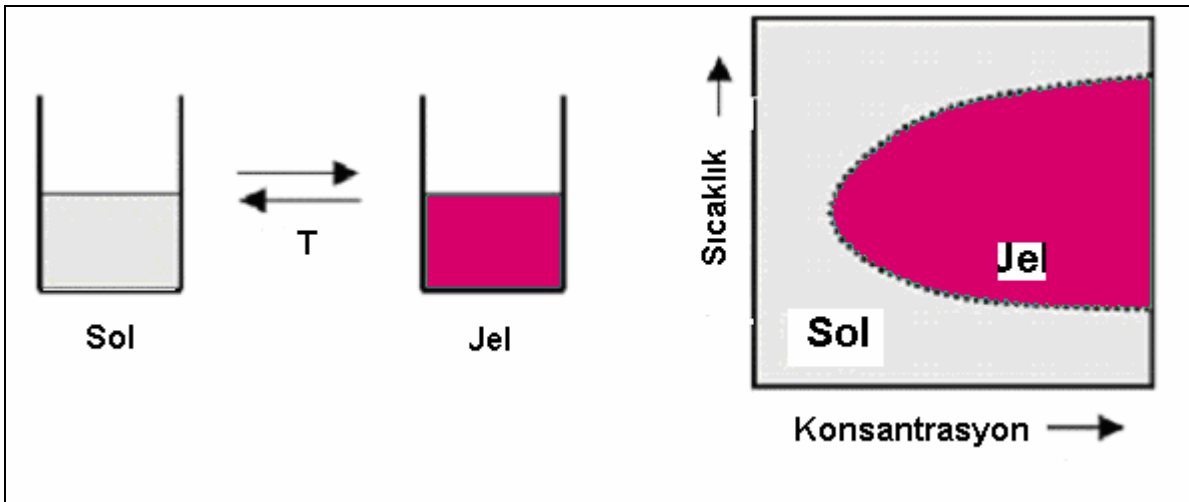
Şekil 2.9. PEG-PLLA-PEG triblok kopolimerinin kimyasal yapısı

Kopolimer sadece düşük sıcaklıklarda sol-jel geçişi göstermektedir. Burada PEG zincir uzunluğu sabit tutulduğunda sadece PLLA zincir boyu jelleşme sıcaklığını ve jelleşme konsantrasyonunu etkilemektedir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. PEG-PLLA-PEG Triblokkopolimeri için sol-jel geçişi.(●) 5000–2040–5000;(■) 5000–3000–5000; (▼) 5000-5000-5000

Yapılan çalışmalarda belirlenen polimer konsantrasyonunda (ağırlıkça %30) ve jelleşme sıcaklığının üzerinde sıcaklıklarda (45°C) hidrojele dekstran yüklenmiş ve sıcaklık vücut sıcaklığına düşürülüp sistemin jelleşmesi sağlanmıştır. Jelleşmeden sonra in-vitro ortamda dekstran 10 gün süreyle sabit salım hızında salınmıştır. Şekil 2.11’de PEG-PLGA-PEG triblokkopolimer çözeltisi için jelleşme faz diyagramı verilmiştir.



Şekil 2.11. PEG-PLGA-PEG triblok kopolimer çözeltisi için jelleşme faz diyagramı

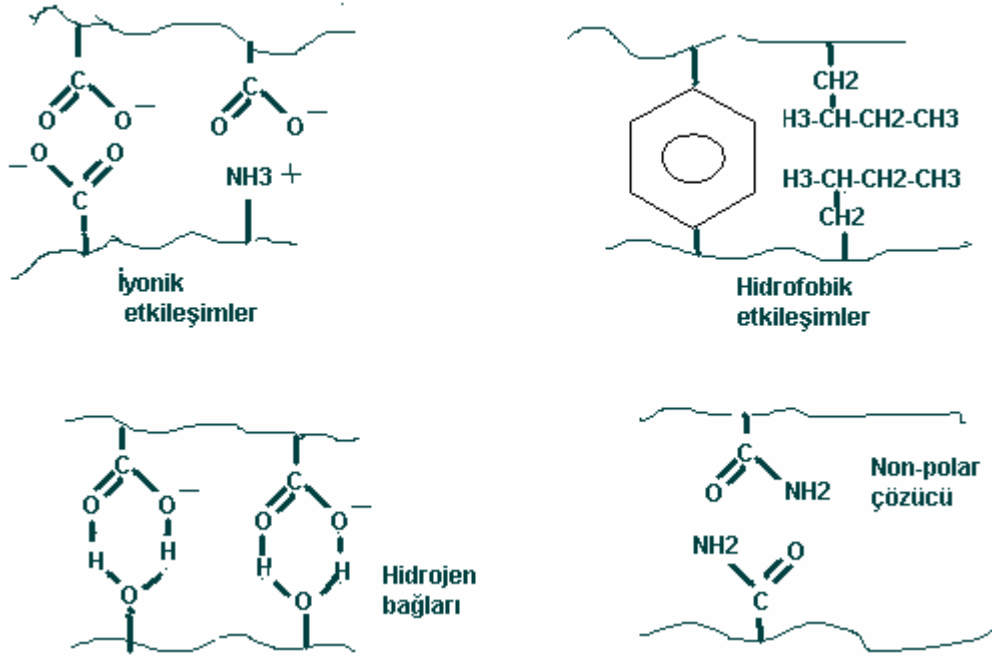
Sistemin jelleşmesi sonucunda şeffaf ve üç boyutlu yapısını koruyan, mekanik dayanımı yüksek jeller elde edilmiştir. Oluşturulan jellerle in-vivo ortamda fareler

üzerinde yapılan deneylerde yapının 1 ay boyunca kararlılığını koruduğu görülmüştür. Daha uzun sürelerde jelin şeffaflığını kaybedip opak bir görünüm kazandığı, ardından PEG zincirlerinin kütle kaybından dolayı bozunmaya uğradığı gözlenmiştir (Jeong B.,2002)

PEG-PLGA-PEG triblok kopolimerleri kullanılarak Ketoprofen ve Spironolactone ilaçları ile de çalışmalar yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda ilacın hidrofobisitesinin de salım profilini etkilediği anlaşılmıştır. Daha hidrofilik olan Ketoprofen ile salım 2 hafta sürerken, hidrofobik olan Spironolactone ile salım 2 ay zarfında gerçekleşmektedir. Salım periyotlarında meydana gelen bu farklılığın hidrojelin morfolojisinden kaynaklandığı tesbit edilmiştir. Buna göre hidrofobik ilaç yapının daha derinlerinde (hidrofobik PLGA kabuğunda) depolanmakta ve uç kısımlarda hidrofilik PEG grubu bulunmasından dolayı salımı uzun sürmektedir. Her iki ilaç için de salım profilini başlangıçta yüklenen ilaç miktarı, polimer konsantrasyonu ve jelin kimyasal yapısı belirlemektedir.

2.2. Sol-Jel Faz Değişim Mekanizmaları

Sol-jel faz değişim özelliği, genel olarak polimer-polimer moleküller arası bağların polimer-çözelti arası bağlara baskın gelmesiyle, viskozite artışından doğan akmama durumuna geçiş olarak tanımlanabilir. Polimer-polimer arası etkileşimler daha çok hidrofobik kuvvetlerin çekimi şeklinde olurken, polimer-çözelti arasındaki etkileşimler ağırlıklı olarak, hidrojen bağları, iyonik kuvvetler ve van der Waals etkileşimleri şeklinde olmaktadır. Şekil 2.12’de bu çekim kuvvetlerinin örnekleri görülmektedir.



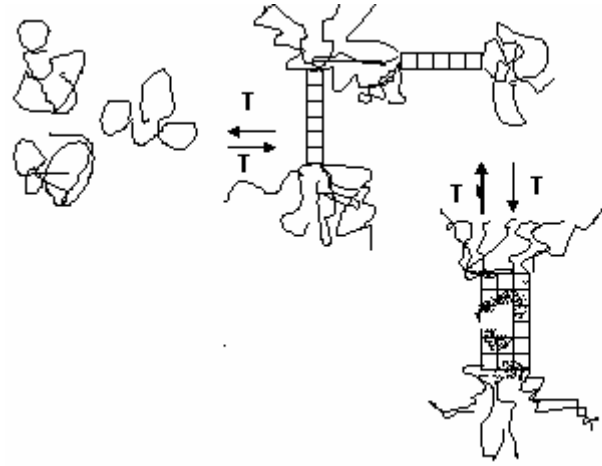
Şekil 2.12. Jelleşmede etkili olan kuvvetlerin gösterimi

Jelleşme mekanizmalarını dört ana başlık altında toplamak mümkündür. Bunlar;

- i) yumak-heliks konformasyonu
- ii) yüksek sıcaklıklarda suyun az çözücülüğü
- iii) entalpi-entropi değişimi
- iv) unimer-misel konsantrasyonu'dur.

2.2.1. Yumak-Heliks Konformasyonu

Özellikle doğal hidrojellerin jelleşme mekanizmaları bu yöntemle açıklanmaktadır. Buna göre jelatindeki üçlü heliks konformasyonu ile polisakkaritlerdeki ikili heliks konformasyonu çekirdek gibi davranır ve jel oluşumu sırasında kristalin bölgeler oluşturmaya yarar. Heliks oluşumunu helisler arasındaki bağlanma noktalarının oluşumu izler. Yüksek sıcaklıklarda düzensiz konformasyonlar oluşur, bu da polimerin çözelti fazında bulunmasını sağlar. Sıcaklık azaltıldığında ikili heliksler birleşip üçlü hale geçer ve çökmeye başlarlar. Bu birleşme işlemiyle beraber polimer de jelleşmeye başlar (Park K, 1993), (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Yumak-heliks konformasyonu için jelleşme mekanizması

2.2.2. Yüksek Sıcaklıklarda Suyun Az Çözücülüğü

Pek çok doğal polimer düşük sıcaklıklarda jelleşmeye uğrarken polisakkaritler ve özellikle selüloz türevlerinde yüksek sıcaklıklarda faz geçişi görülür. Selüloz, yapısı gereği suda çözünmez fakat bazı hidrofilik grupların polimer yapıya bağlanmasıyla suda çözünür hale gelir. Sıcaklık arttırıldığında selüloz için kötü bir çözücü olan su uzaklaştırılır ve selüloz türevlerinde hidrofilik/hidrofobik gruplar arasında denge sağlanır ve polimer-polimer etkileşimi artar, sol-jel faz değişimi gözlenir. Sol-jel geçiş sıcaklığı selüloz içindeki hidroksil gruplarıyla modifiye edilebilmektedir (Peppas N.A., 1986).

Nano bazda N-İsopropilakrilamid polimeri üzerine, özellikle AFM, (Atomik güç mikroskopu), ile yapılan çalışmalarda jelleşme sırasında polimer yapısında bulunan C-H bağında sıkışma görülmüştür. Bunun nedeninin hidrofobik isopropil gruplarının dehidrasyonu olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte jelleşme sonrasında halen %83 oranında karbonil grubunun çözücü ile hidrojen bağı yaptığı görülmüştür (Zareie H.M., Hofmann A.S., 2000).

2.2.3. Unimer- Misel Konsantrasyonu

Özellikle Poloxamer ticari polimerinin jelleşme mekanizması bu yöntemle açıklanmaktadır. Poloxamer sulu çözeltilerinin jelleşme mekanizması son yıllara kadar tam olarak açıklanamamış ve üzerinde değişik fikirler ortaya atılmıştır. 1980'lerin başında agregasyon sayısı ve misel simetrisi gibi misellere has

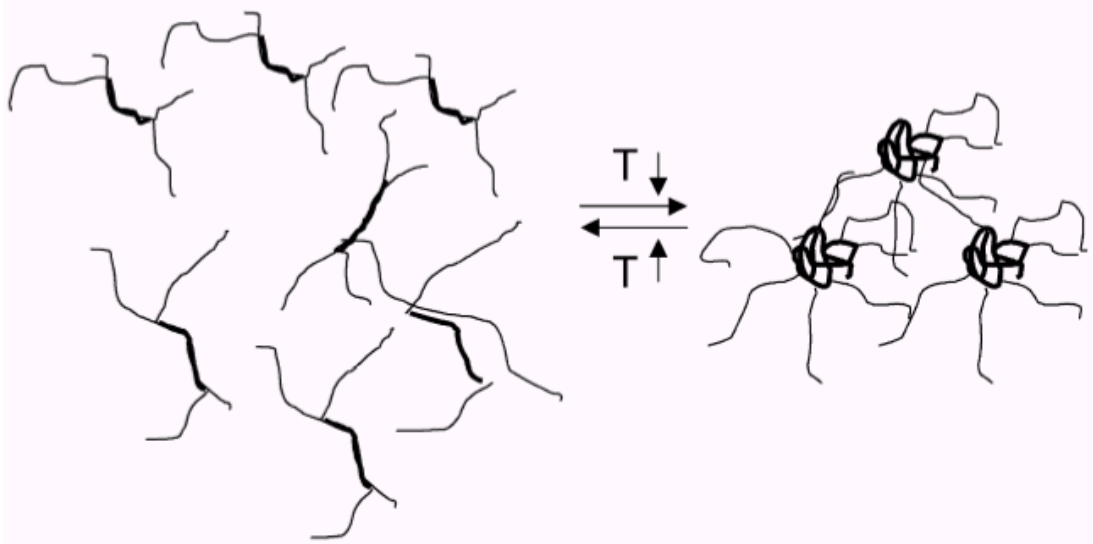
değişikliklerin Poloxamer çözeltisinin jelleşmesine etkisi olduğu düşünülmekteydi. Buna sebep olarak sıcaklık arttıkça misel konsantrasyonundaki azalma gösterilmekteydi. Daha sonra ^{13}C -NMR spektrometresinde yapılan analizlerde PPO'nin dehidrasyonunun jelleşmeye neden olduğu anlaşılmıştır. PPO'nin dehidrasyonu polimer zincirleri arasında sürtünmeyle birlikte, viskozite artışıyla beraber jelleşmeye neden olmaktadır (Jeong B.,2002).

Entropide meydana gelen değişimler, su moleküllerinin PPO gruplarının çevresine toplanmasına neden olmakta bu da sol-jel geçişini sağlamaktadır. Ayrıca O-C-C-O çevresinde polar ve apolar gruplar bulunmaktadır. Sıcaklığın artışıyla apolar gruplar artmakta ve jelleşme meydana gelmektedir. Zhou ve Chu tarafından yapılan araştırmalarda sıcaklık artışının PEO bloklarının dehidrasyonuna neden olduğu ortaya çıkmıştır ve jelleşmeye bu dehidrasyonun neden olduğu düşünülmüştür (Jeong B.,2002).

Son yıllarda Poloxamer üzerinde yapılan ultrasound hızı, dinamik ve statik ışık saçılması, küçük açı nötron saçılması (SANS, small angle neutron scattering), reometre, dielektik sabiti ve mikrokalerimetre gibi enstrümental analizlerde unimerler ve miseller arası kaymaların jelleşmeye neden olduğu düşünülmektedir (Wanka G., 1990, Yu G. E., 1992).

Kritik misel konsantrasyonunun üzerinde (1 mg/ml) Poloxamer unimerleri ile miseller denge halindedir. Sıcaklık arttıkça denge, unimerler yönünden küresel misellere kayar bununla birlikte çözeltideki serbest unimer sayısı düşer, misellerin hacimsel kesri (ϕ_m) artar. $\phi_m > 0.53$ olduğunda sistem jelleşmeye başlar. Aynı zamanda oluşan misellerin çapları da artar (Alexandrisdis P., 1995).

Jel halindeki Poloxamerde sıcaklık daha da arttırıldığında jelin neden tekrar çözelti haline geçtiği henüz tam olarak açıklanamamış olup dengenin unimerler yönüne kaydığı düşünülmektedir. Şekil 2.14'de PEO-PPO-PEO (Poloxamer) hidrojelinin jelleşme mekanizması şematik olarak görülmektedir.



Şekil 2.14. PEO-PPO-PEO (Poloxamer) hidrojelinin jelleşme mekanizması

2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Polimerlerin ilaç alımını kontrol etme aracı olarak kullanıldığı salım sistemlerini içeren teknoloji dalına “Kontrollü Salım Teknolojisi” adı verilmiştir. Sürekli etkili sistemlerde ilaç bir polimer yapıdan belli bir süre serbestleşirken, kontrollü sistemlerde polimer taşıyıcı, ilacın salım mekanizmasını ve hızını uzun süre kontrol eder. Polimerin yapısı değiştirilerek salım mekanizması ve hızı ayarlanabilir.

Kontrollü ilaç salım çalışmalarına 1950’lerde tarım ilaçları ile başlanmıştır.1960’larda denemeler tıp alanına da girmiştir. İlk çalışmalarda etken madde diyaliz tüpü veya silikon kauçuk içine konmuştur. 1970’lerde çalışmalar büyük moleküllü ilaçların ($M.A > 600$) katı polimerlerden sürekli salımı yönünde olmuştur (Langer R., Folkman J. 1976).

Kontrollü ilaç salımında doğal veya sentetik polimerlerin, ilaç veya aktif bir ajanla birleştirilip, bu ilaç veya aktif ajanın önceden tasarlanan formlara uygun olarak salınması söz konusudur. Tasarlanan formlar salımın uzun zaman diliminde sabit olması veya uzun periyotlarda dönemsel biçimde gerçekleşmesi veya çevreden gelen uyarıcıların etkisine göre biçim değiştirmesi şeklinde olabilir. Kontrollü ilaç salımında ana amaç yüksek veya alçak doz ayırımı olmaksızın ilacın etkin biçimde salınmasıdır.

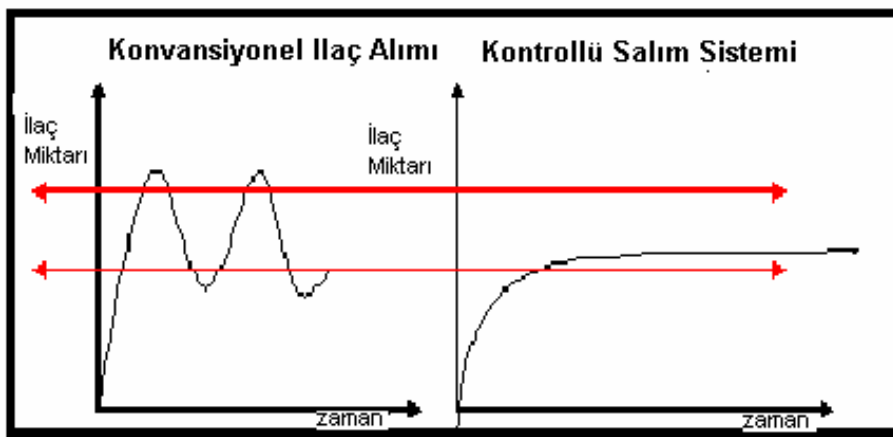
Kontrollü ilaç salımın diğer avantajları; ilaç düzeyinin istenilen oran dahilinde

kontrollü, daha az ilaç yönetimine ihtiyaç duyulması, tedavilerde optimum düzeyde ilaç kullanımı, yüksek hasta uyumluluğu olarak sıralanabilir.

Tüm bu önemli avantajlarının yanı sıra çeşitli dezavantajları da ihmal etmemek gerekir. Bunlar, olası toksisite veya biyouyumsuzluk, bozunma sonrasında oluşabilecek istenmeyen yan ürünler, sistemde implantasyon varsa cerrahi operasyonlar, hasta rahatsızlığı ve diğer tedavi yöntemlerine göre yüksek maliyetdir (Brannon-Peppas L.,1997).

Yeni biyolojik etkilere sahip ilaçların sentezi ve keşfedilmesi uzun yıllar ilaç ile ilgili araştırmaların odak noktası olmuştur. Bu araştırma alanı önemini korumaya devam etmesine karşın, dikkatler giderek daha fazla bu ilaçların veriliş şekline yönelmiştir. İlaçların veriliş şeklini değiştirmek için geliştirilen sistemlerin başında genellikle polimerlerin kullanıldığı kontrollü ilaç serbestleştiren sistemler gelir (Kim S.W. ve ark 1992).

Orjinal kontrollü salım sistemlerindeki amaç, kanda yüksek ve kararlı ilaç düzeyi ile uzun süreli salımlardır. Klasik salım sistemleri veya enjekte edilebilir sistemlerde Şekil 2.15’de görüldüğü gibi ilaç düzeyi maksimum ile minimum değerler arasında dalgalanmalara sebep olmaktadır. Kontrollü ilaç salımında istenen, optimum değerde, kararlı bir şekilde uzun periyotlarla ilacın salınmasıdır. Uzun periyotlar tedavilere göre 24 saat , 1 ay ya da 5 yıl olabilir (Brannon-Peppas L.,1997).



Şekil 2.15. İlaç plazma konsantrasyonunun zamanla değişimi

2.3.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler

Bu sistemlerde hem taşıyıcı olarak, hem de sistemden salım hızını kontrol etmek üzere en yaygın olarak kullanılan maddeler doğal ve sentetik polimerlerdir. Kontrollü salım formüllerinde başarılı bir şekilde kullanılacak olan madde, kimyasal olarak inert ve tamamen saf olmalıdır. Aynı zamanda en az düzeyde aşınma göstermeli ve kolayca işlenebilir olmalıdır.

Kontrollü salımda kullanılan polimerik sistemler önceleri biyolojik olmayıp sadece fiziksel özelliklerine göre belirlenen sistemlerdi. Son yıllarda ise seçilen sistemlerde biyoyumluluğa ve hasta rahatlığına önem verilmeye başlandı. Kontrollü ilaç salımda kullanılan bazı polimerler; poli(2-hidroksi etil metakrilat), poli(N-vinil pirolidon), poli(metil metakrilat), poli(vinil alkol), poli(akrilik asit), poliakrilamid, poli(etilen-co-vinil asetat), poli(etilen glikol), poli(metakrilik asit), polilaktidler, poliglikolidler, poliortoesterler, polianhidritler'dir.

2.3.2. Enjekte Edilebilir Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

İlaç salım sistemleri sıvı, katı ve yarı katı olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar. Enjekte edilebilir, sol-jel geçiş özelliğine sahip sistemlerde ana hedef polimerik yapının oda sıcaklığında çözelti halinde -sıvı halde- bulunması, vücuda enjekte edildiğinde çok kısa sürelerde yarı katı -jel-hale dönüşmesidir. İlaç, polimer çözücüsü dışında başka bir çözücüye ihtiyaç duymadan oda sıcaklığında polimerik sisteme basit bir fiziksel karıştırma ile eklenir. Bu sistemlerde vücut içerisinde herhangi bir yan maddeye gerek duyulmaz. Ancak oda sıcaklığında sistemin kararlılığının sağlanması en önemli parametredir, bu yüzden çeşitli maddelerle kararlılık artırılmaya çalışılır. İlaç salım oranını polimerin bozunma hızı belirler.

Enjekte edilebilir sistemlerde karşılaşılan en büyük zorluk, tedavilerde ilaç yeterli düzeyde salınmadan polimerin vücut içerisinde modifikasyona uğraması veya hızlı biyobozunma sürecine girmesidir. Ayrıca özellikle deri altı enjeksiyonlarda ilacın belli bir bölgeyi hedef alarak hareket etmesi kısıtlanabilmektedir (Agi, P., 2003).

Sol-jel geçişli, kontrollü ilaç salım sistemlerinde bir diğer önemli unsur polimer yapısında zincirlerin yeterli düzeyde esnek olması böylece de camsı geçiş sıcaklığının oda sıcaklığının altında tutulabilmesidir (Heller J., 2000).

2.3.3. Protein İlaçların Kontrollü Salımı

Son yıllarda peptid ve protein bazlı ilaçların, özellikle DNA teknolojisindeki son gelişmelerle beraber, tedavi edici ajanlar arasında önemleri ve sayıları hızla artmıştır (Patil ve ark., 1996). Protein bazlı ilaçların hızla artması ve gelişmesiyle birlikte ilaçların kontrollü salım metodları da gelişmiştir. Proteinler yüksek molekül ağırlığına ve düşük kararlılığa sahiplerdir. Bu yüzden geliştirilen salım metodlarının proteinlerin bu dezavantajlarını elimine edecek davranışları sergilemesi beklenmektedir. Bu amaçla geliştirilen metodlardan en elverişli olanı önceden proteinle yüklenmiş hidrojellerden protein salımıdır. Protein salımı için hidrojel kullanımının avantajları Çizelge 2.3’de verilmiştir (Antonsen ve ark., 1993).

Çizelge 2.3 Protein ilaçların salımları için hidrojel kullanımlarının avantajları

-
- Sulu gözenekleri içinde denatüresyona neden olmayan ortam varlığı
 - Geniş bileşim aralığı
 - Biribiri içerisine giren ağ yapısı (IPN), ve hidrofobik jeller
 - Kontrol edilebilir gözenek büyüklüğü dağılımı
 - Şişme kontrollü salım mekanizması
 - İyonik jellerle iyon-değişim salım mekanizması
 - Afinite jellerle desorpsiyon salım mekanizması
 - Uyarı cevap polimerleri, biyoaşınma, biyobozunma, biyoyapışma
 - Vücutla temasta biyouyumluluk
-

Protein salımı için önerilen yöntemlerden biri makrogözenekli hidrojel implantlardır. Örneğin, poli(vinilpirolidon) ve poli(akrilik asit) bazlı hidrojellerin yararlı olacağı görülmüştür. Poli(vinil alkol) ve poli(hidroksietil metakrilat) bazlı makrogözenekli hidrojellerde proteinlerin uzun dönemli salımları için uygun görülmektedir. Bu hidrojeller “freeze-thaw” tekniği ile hazırlanmış ve bu teknikte hidrojel gözenek büyüklüğü, buz kristalleri etrafında monomerin fotopolimerizasyonu ile artırılmıştır (Ficek ve Peppas, 1993).

Protein salımında diğer bir sistem poli(etilen glikol), PEG, yıldız polimerleridir. Bu hidrojeller gamma radyasyonu ile hazırlanmakta ve moleküler baskılama yapılarak veya yapılmayarak proteinlerin salımında kullanılmaktadırlar. Şişme özelliklerinin

incelenmesiyle karakterize edilen bu hidrojeller, küçük bir hacim içerisinde bulunan fazla sayıdaki fonksiyonel gruplarıyla, kontrollü protein salımında önemli yer teşkil etmektedirler (Peppas N. A., 1999).

Bu konuda yapılan çalışmaların bir diğeri biyoyapışma özelliğine sahip taşıyıcı sistemlerin kullanımlarıdır. Bu sistemlerde amaç protein bazlı ilaçların, hastalığın bulunduğu bölgeye doğrudan ulaşması ve böylece yüksek aktivitede tedavi elde edilmesidir. Bu amaçla poli(metil metakrilat)-poli(etilen glikol) aşı kopolimerleri sentezlenmektedir (Peppas N.A., 2004).

Protein bazlı ilaçların kontrollü salımında en yaygın araştırılan yöntem oral yolla salımdır (İmren, D., Kesgin, D., 2002). Ancak bu yöntemde çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Oral yolla salımın en önemli engellerinden biri, proteinlerin mide ve ince bağırsakta bulunan gastrik ve pankreatik enzimler tarafından bozunmaya uğramasıdır. Uygun çözüm olarak oral yolla salımda pH duyarlı hidrojeller veya sıcaklık duyarlı, enjekte edilebilir sistemler verilebilir. Sıcaklık duyarlı, enjekte edilebilir polimerik sistemlerde kontrollü salım mekanizmaları ile polimerin istenilen sürede ve istenilen miktarda ilaç salması amaç edilmiştir. Ayrıca bu sistemlerde hasta rahatlığı için sürekli tablet kullanımı ve sürekli enjeksiyon engellenmiş olmaktadır.

Hidrojelden protein salımı, çevresel durumlara bağlı olarak karmaşık özellikler göstermektedir. Kontrollü salım uygulamalarında kullanılan hidrofilik polimerler 3 ana sınıfta toplanmaktadır. Bunlar; gözeneksiz, mikrogözenekli ve makrogözenekli hidrojellerdir (Peppas N.A., 1983).

Gözeneksiz hidrojeller 3-boyutlu, ağ şeklinde, kovalent ya da iyonik çapraz bağlı makromoleküler zincirler içerirler ve gözenek boyutu ile karakterize edilirler. Mikro gözenekli hidrojeller, makromoleküler bağlantı uzunluğundan daha büyük gözenekler içerirler. Gözenekler genellikle su ile doludur. Protein salımı, suyun gözeneklerden geçerek beraberinde çözünenin de taşındığı difüzyon ve konveksiyonun birleşimiyle gerçekleşir. Makrogözenekli jeller denge değerinden fazla miktardaki çözücü ile sentezlenebilir. Bu durumda faz ayrımı çözücü havuzlarını yaratır ve dolayısıyla büyük gözenekler ve kanallar oluşur. Büyük gözenekler elde etmek için kullanılan bir diğer yol ise polimerizasyonu çözücüsüz

gerçekleştirmektedir.

2.3.4. Şişme ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

Kontrollü salım sistemlerinde, çözücünün polimerik matrise difüzyonunu takiben ilaç salımının gerçekleşmesi prosesi ve bu prosenin arkasındaki mekanizmayı açıklayabilmek için pek çok matematiksel model geliştirilmiştir (Kesgin D., 2002). Modellerin büyük çoğunluğu, sistem parametrelerinin (polimer, ilaç, çözücü) özelliklerinden faydalanarak, kompleks diferansiyel denklemler yardımıyla türetilmiştir (Lustig ve Peppas, 1987).

2.3.4.1. Şişme kinetiği

Polimerlerin dinamik şişme özellikleri; çözücü absorpsiyon hızını, denge şişmesine yaklaşım hızını ve çözücü ilerleme hızını kontrol eden transport mekanizmasını içerir. Çözücü absorpsiyon hızı, birim zamanda alınan çözücüyü gösterir ve doğrudan polimerin denge şişme derecesiyle bağlantılıdır. Şişebilen sistemlerde transport, difüzyonun konsantrasyon gradiyentine bağlı olduğu Fick kanunu ile tanımlanır. Dıştaki şişmiş kauçuğumsu kısmı, içteki şişmemiş camsı kısımdan ayıran çözücü ilerleme hızı, ilaç salım uygulamalarında ve transport mekanizmasının karakterizasyonunda önemlidir (Peppas N. A., 1983).

Bir polimerin şişmesinin zamana bağlılığı en basit anlamda, “güç kanunu modeli” (power law model) ile tanımlanabilir (Ritger ve Peppas, 1987). Difüzyon ve gevşemenin birbirine göre önemini belirten transport mekanizması, absorpsiyon verilerinin ($M_t/M_\infty \leq 0.6$ durumunda veya çok kısa bir süre için) güç kanunu modeline uydurulmasıyla saptanabilir.

$$F=M_t/M_\infty = kt^n \quad (2.1)$$

Bu denklemde, M_t/M_∞ polimer içine hareket eden çözücünün dengedeki koşullara göre normalleştirilmiş halini ifade eder. M_t ve M_∞ sırayla t anında ve dengede ($t=\infty$) absorplanan veya desorplanan kütledir, n ve k ise difüzyon katsayıları ve transport mekanizması ile ilişkilendirilebilen sabitler olup sırasıyla difüzyon üsteli ve orantı sabiti olarak adlandırılır (Brazel ve Peppas, 2000).

Film halindeki bir malzeme için;

$n=0.5$ değeri Fickian difüzyonu, $n=1.0$ değeri Case II (gevşeme kontrollü) transportu, bu değerler arasındaki değerler ise Non-Fickian (anomalous) transportu gösterir. $n>1$ ise Süper Case II transportu tanımlar. Farklı maddelerin absorpsiyon ve desorpsiyon hızlarını karşılaştırmada kullanılan bu eşitliğin kullanımındaki zorluk; k değerinin n değerine bağlı olmasıdır. Bundan dolayı, yalnızca aynı n değerine sahip maddeler için direkt olarak k değerlerinin karşılaştırılması mümkündür.

Silindirik şekilde bir malzeme için;

$n=0.45-0.50$ değerleri Fickian difüzyonu, $0.50 < n < 1.00$ non-Fickian difüzyonu gösterir.

Bazı araştırmacılar; jelin denge kütlesi veya hacminin belirli yüzdesine ulaşmak için gerekli olan süre üzerinde dururlar. Ancak bu yanıltıcı olabilir, çünkü bazı örnekler başlangıçta hızlı bir hacim değişimi ve denge değerine giderken yavaş bir ilerleme gösterir ve bazıları uniform bir hızda ilerler. Ayrıca, denge süresi, kalınlığa çok bağlıdır. Gerçekte difüzyon kontrollü bir proses için denge süresi, karakteristik difüzyonel uzaklığın karesiyle değişir.

Kauçuğumsu polimerik jellerin ve uyarı-cevap polimerik jellerinin şişmesi veya büzülmesi genelde basit difüzyon kontrollü prosesle olur. Bu durumda sistemin kinetiği tek bir parametre (difüzyon katsayısı) ile karakterize edilebilir. Difüzyon katsayısı D , uygun sınır koşulları Fick yasasına uygulanarak, düzlemsel geometri için hesaplanabilir (Kabra ve ark., 1992).

$$M_t / M_\infty = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} \left[\frac{8}{(2n+1)^2 \pi^2} \right] \times \exp[-(2n+1)^2 \pi^2 (Dt/L^2)] \quad (2.2)$$

Burada; L , tabakanın başlangıçtaki kalınlığıdır. Difüzyon katsayısının, jel içindeki pozisyondan ve konsantrasyondan bağımsız olduğu, yüzey konsantrasyonunun anlık olarak denge değerine ulaştığı ve difüzyif olmayan akışların (konveksiyon gibi) ve hız sınırlayıcı basamakların (ısı transferi gibi) olmadığı kabul edilir. Bu formülün geliştirilmesinde kullanılan kabullerin geçersizliği durumunda eşitlikten sapmalar olabilir. Bununla birlikte; özellikle sapmalar çok büyük değilse, en iyi yaklaşımla bulunmuş D , çok farklı jel örneklerin hacim değişim kinetiğinin karşılaştırılmasında

kullanılabilir. Net karşılaştırma yapabilmek için en iyi yöntem kinetik veri elde etmektir, ancak pratikte bu mümkün olmaz. Kısa zaman yaklaşımı yapılarak 2.2 nolu eşitlik düzlemsel geometri için aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 2.3) ile gösterilebilir.

$$M_t / M_\infty = 4[Dt/\pi L^2]^{1/2} \quad (2.3)$$

Difüzyon katsayısı D, uygun sınır koşulları Fick yasasına uygulanarak, silindirik geometri için de hesaplanabilir (Polishchuk ve ark., 1993).

$$M_t / M_\infty = 4[Dt/\pi r^2]^{1/2} - \pi[Dt/\pi r^2] - \pi/3[Dt/\pi r^2]^{3/2} + \dots \quad (2.4)$$

Bu denklemde, D difüzyon katsayısı (cm²/dak.), t zaman (dak.) ve r silindirik polimer örneğinin yarıçapıdır (cm). (2.1) ve (2.4) eşitliği grafiksel olarak karşılaştırıldığında, n = 0.50 ve k = 4[Dt / πr^2]^{1/2} olduğu 2.1 numaralı yarı ampirik eşitliğini gösterir.

M_t/M_∞ değerleri t^{1/2} değerlerine karşı grafiğe geçirilerek, eğim'den (k) D hesaplanabilir.

Bazı araştırmacılar, verileri ampirik veya herhangi bir başka modele uydurarak yeni modeller geliştirmişlerdir. Ritger ve Peppas (1987), camsı-kauçuğumsu ara yüzeyde çözücü difüzyon hızında zamana ve pozisyona bağlı değişiklikleri göz önüne alarak Non-Fickian davranışı incelemişlerdir. Wu ve Peppas (1993), polimerlerin viskoelastik özelliklerini tanımlamak için, lineer tersinmez ve Maxwell modeli kullanarak Non-Fickian transportun matematiksel modelini geliştirmişlerdir.

Hidrojellerin şişme karakteristikleri

Denge su içeriği (EWC) (Equilibrium water content) hidrojellerin denge şişme değerine ulaştığı anda kuru ya da ıslak jel temel alınarak gravimetrik olarak ölçülen şişme deneylerinden hesaplanabilir.

Çalışma kapsamında hazırlanan hidrojellerin EWC değerleri, kuru hidrojel temel alınarak (2.5) numaralı eşitliğe göre hesaplanmıştır (Darwis ve ark., 1993).

$$EWC = [(M_d - M_0) / M_0] \times 100 \quad (2.5)$$

Bu denklemde, M_d hidrojin dengeye ulaştığındaki ağırlığı, M₀ hidrojin şişme deneyi öncesi kuru ağırlığıdır.

2.4. Salım Kinetiği

Şişme kontrollü salım sistemlerinde, ilaç başlangıçta camsı polimerde çözünür veya dağıtılır. Biyolojik akışkanla temas haline geldiğinde ise, polimer matris şişmeye başlar. Polimerde, içteki camsı faz ve şişen kauçuğumsu faz olmak üzere iki ayrı faz gözlenir. İlaç molekülleri polimerin kauçuğumsu fazından dışarı difüzlenebilir, polimerin camsı kısmından ise dışarı ilaç difüzlensemez. Bundan dolayı; ilaç salımı, camsı-kauçuğumsu ara yüzeyin hızı ve pozisyonuyla kontrol edilir. Camsı-kauçuğumsu ara yüzeyde ilaç salımını önemli ölçüde etkileyen makromoleküler gevşeme olayı meydana gelir. Deneysel verilerin ($M_t/M_\infty \leq 0.6$ durumunda veya çok kısa bir süre için) (2.1) nolu güç kanunu eşitliğine uydurulmasıyla, makromoleküler gevşemenin ilaç salım mekanizması üzerindeki etkisi incelenebilir (Peppas ve ark., 2000). Bu eşitlikte; M_t ve M_∞ , sırayla t anında ve dengede salınan ilaç miktarı, n difüzyon üsteli ve k ise orantı sabitidir. Güç kanunu modeli, viskoelastik gevşeme ve Fickian difüzyon davranışının polimer sistemlerde etkisini incelemek için kullanılmıştır. Ritger ve Peppas, (1987), n difüzyonel üsteline dayanarak, Fickian ve non-Fickian difüzyon davranışını incelemişler ve farklı geometrik yapıdaki polimer sistemlerden ilaç salımı için modeller geliştirmişlerdir

Serbest hacim modelinden türetilen denklemler yardımıyla, çözücü ve ilaç difüzyonunun mekanik gevşeme ile ilişkisi modellenmiştir (Korsmeyer, Lustig, 1986).

Polimer/çözücü sistemlerinin çoğunu tanımlamak için kullanılan Difüzyonel Deborah Sayısı (D_e) ve Şişme Arayüzey Sayısı (S_w) gibi boyutsuz gruplar, çözücü difüzyonu ve ilaç salımının zamana bağlılığını incelemek amacıyla kullanılmıştır (Wu ve Peppas, 1993). Bu model, Peppas ve Brazel (2000) tarafından polimerik taşıyıcının şişme kontrollü salım sistemi için uygunluğunu incelemek amacıyla modifiye edilmiştir. Difüzyonel Deborah Sayısı (D_e), suyun polimer içine hareketi ve polimerin gevşeme hızı ile ilişkilidir. D_e , hem polimerin, hem de ilacın özelliklerine duyarlıdır.

$$D_e = \lambda / \theta = \lambda D_{1,2} / (\delta(t))^2 \quad (2.6)$$

λ : Polimerin, sulu ortamdaki karakteristik gevşeme zamanı

θ : Suyun, şişen polimer içine doğru karakteristik difüzyon zamanı. Bu değer, difüzyonel uzaklığın karesinin suyun polimere difüzyon katsayısına ($D_{1,2}$) oranıdır ($\delta^2/D_{1,2}$).

Şişme kontrollü salım sisteminde, gevşeme zamanı baskınsa ($D_e \gg 1$) ya da suyun difüzyonu baskınsa ($D_e \ll 1$) zamana bağıllık Fick kanununa uyar. $D_e = 1$ olduğu durumda, aynı zaman zarfında iki prosesin gerçekleşeceği non-Fickian (anomalous) transport davranışı gözlenir.

Şişme Arayüzey Sayısı (S_w) suyun polimer içine hareketi ile ilaç salımı arasındaki dengeyi tanımlayan oldukça önemli bir parametredir. (S_w) hem polimerin özelliklerine (polimer içine su girişini etkilediği için) hem de ilacın difüzyon katsayısından dolayı ilacın özelliklerine duyarlıdır.

$$S_w = v\delta_r / D_{3,21} \quad (2.7)$$

v : Camsı-kauçuğumsu ara yüzeyin hızı

δ_r : Şişmiş jel tabakasının kalınlığı

$D_{3,21}$: Polimer içindeki ilacın difüzyon katsayısı

S_w belirgin bir şekilde 1'den çok büyük ya da çok küçük olduğunda, hem ilaç difüzyonu, hem de suyun polimerik yapıya hareketinin salım profilini etkilediği, zamana bağlı Fickian davranış gözlenmektedir. D_e ve S_w değerleri şişme boyunca değişebileceğinden, başlangıç ($t=0$) ve denge ($t=\infty$) şişme deneysel verilerinden hesaplanabilmektedir.

Şişme kontrollü ilaç salım sistemlerinde çözünenin salım davranışı, Case I (Fickian difüzyon) ve Case II transport için sırayla “difüzyon katsayısı” ve “karakteristik gevşeme sabiti” gibi tek bir parametre ile tanımlanabilir. Non-Fickian davranışı tanımlamak için ise difüzyon ve gevşeme olaylarını içeren bir veya daha fazla parametre gerekebilir.

İnce polimerik filminden Fickian ilaç salımı: Orta derecede şişen ince polimerik filmlerden salım için daha önce de bahsedilen Eşitlik (2.2) ve kısa zaman yaklaşımı uygulanmış Eşitlik (2.3) kullanılabilir. Burada, M_t/M_∞ salınan ilaç kesrini, D difüzyon katsayısını, L başlangıçtaki film kalınlığını ve t ise salım zamanını gösterir

İnce polimerik filmden Case II ilaç salımı: Case II transportunun analizini yapmak için A kesit alanına sahip ve L kalınlığında bir filmden Case II transport salım olduğunu düşünelim. İlerleyen kısmın (advancing front) pozisyonu X olduğunda, $X \leq x \leq L/2$ ile tanımlanan şişmiş bölgede, ilaç konsantrasyonunda doğrusal bir değişim vardır. $0 \leq x \leq X$ ile tanımlanan camsı bölgede ise ilaç difüzyonu olmaz. Salım kinetiğinin, ilerleyen kısımda gerçekleşen hız sınırlayıcı gevşeme olayıyla kontrol edildiği kabul edilir. k_0 , Case II gevşeme sabiti olarak düşünülürse, salımı tanımlayan birinci derece kinetik ifadesi (2.8) eşitliğiyle tanımlanır.

$$dM_t / dt = k_0 A \quad (2.8)$$

herhangi bir t anında, V hacmindeki ($V=A(L/2 -X)$) şişmiş bölgeden salınan ilaç miktarı (M_t) (2.9) eşitliğinden bulunur.

$$M_t = C_0 A [L/2 -X] \quad (2.9)$$

M_t eşitliği kinetik ifadede yerine konulursa, Eşitlik (2.10) elde edilir.

$$dX / dt = -k_0 / C_0 \quad (2.10)$$

Eşitlik (2.10) X için çözülüp, Eşitlik (2.9)'da yerine konulursa, (2.11) eşitliği elde edilir.

$$M_t = 4k_0 A t / L \quad (2.11)$$

(2.11) Eşitliği aşağıdaki gibi de yazılabilir:

$$M_t = [2C_0 A / L] [2k_0 t / C_0 L] \quad (2.12)$$

$2C_0 A / L$, uzun sürede salımı gösterir. Eşitlik (2.12) sadece $t = C_0 L / 2k_0$ değerinin üstündeki değerlere uygulanır; bu sürede M_∞ değerinde keskin bir değişim gözlenir. Bu yüzden (2.12) no'lu eşitlik aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$M_t / M_\infty = 2k_0 t / C_0 L \quad (2.13)$$

(2.13) no'lu eşitlikten de anlaşılacağı gibi, ince bir polimerik filmden Case II ilaç salımı, ilaç salımının zamana doğrusal bağımlılığıyla karakterize edilebilir. Düzlemsel geometri için Case II çözümü, M_t / M_∞ 'un boyutsuz zaman, τ 'ya ($\tau = 2k_0 t / C_0 L$) karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Bu model diğer geometriler için

genelleştirilirse Eşitlik (2.14) ifadesi elde edilir.

$$M_t / M_\infty = 1 - [1 - (k_0 t / C_0 a')]^N \quad (2.14)$$

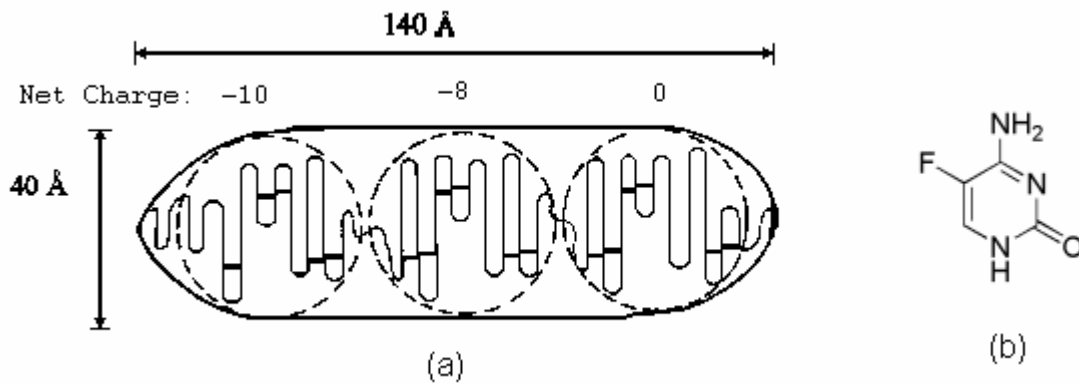
Burada; a' , örneğin difüzyonel uzunluğu olup, küresel ve silindirik örnekler için yarıçapa (r), düzlemsel geometriler için filmin yarı kalınlığına (L) eşittir. N üsteli, örnek geometrisine göre belirlenir. Film, silindirik ve küresel örnekler için sırayla 1, 2 ve 3 değerini alır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışma ile ilgili açıklamalara yer verilmiştir. Deneysel çalışmalarda, öncelikle sıcaklıkla sol-jel geçişi yapabilen, enjekte edilebilir formdaki kitosan hidrojeller hazırlanmış, hazırlanan hidrojellerin karakterizasyon çalışmaları (DSC, FTIR, SEM, CLSM ve viskozimetrik çalışmalar) yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda, hazırlanan jeller arasından seçilen membran formundaki polimere BSA ve 5-FU yüklenmiş ve yüklü jeller ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Deneysel çalışmanın son kısmında in-vitro ve in-vivo ortamlarda yürütülen salım çalışmalarına yer verilmiştir.

3.1. Kimyasal Maddeler

Tez çalışması sırasında sentezlenen hidrojellerin hazırlanmasında, monomer olarak kitosan (%85 deasetillenmiş, C3646, Sigma, Almanya), çözücü olarak hidroklorik asit ve çapraz bağlayıcı olarak gliserilfosfat disodyum tuzu (G6501, Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Yükleme ve salım çalışmalarında model protein olarak Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin, BSA, MA=65000 Da, Fraction V, Sigma, Almanya) ve etken madde 5-fluorourasil (5-FU, MA=130 Da, Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Yükleme ve salım çalışmalarında kullanılan maddelerin kimyasal yapıları Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Yükleme ve salım çalışmalarında kullanılan maddeler a) Model protein BSA b) Etken madde 5-FU

Hayvansal bir protein olan Sığır Serum Albumin (BSA), 65000 Da moleköl ağırlığına sahip olup açık yeşil liyofilize toz halde bulunur. -10/-40 °C sıcaklıklarda genellikle kararlı halde bulunur, saklanır ve beklenmeyen reaksiyonlar vermez. Suda çözünebilen BSA, non-polar amino asit zincirleri içermektedir.

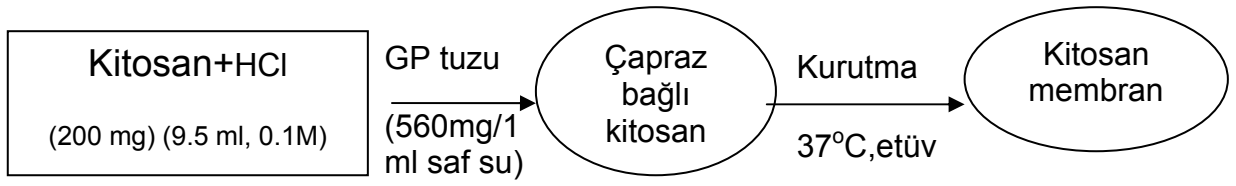
Kemoterapik ilaçların etken maddesi olarak kullanılan 5-FU, oda sıcaklığında beyaz toz halde bulunur. 130 Da moleköl ağırlığına sahip olan madde, suda iyi çözünürken, eter ve alkolde çözünmez. Genellikle yapısında bulunan amonyum grupları üzerinden tepkime veren madde, vücut dışı ortamda deri ve solunum yollarına zarar vermektedir.

3.2. Kitosan Hidrojellerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan sıcaklık duyarlı kitosan membranlar “çözücü buharlaştırma” (solvent evaporation) yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu yöntem aşağıda detaylı biçimde açıklanmış ve Şekil 3.2’de şematize edilmiştir.

Çözücü buharlaştırma yöntemi, membran hazırlamada kullanılacak polimerin, uygun çözücü içerisinde çözülerek istenilen formda kurutulması esasına dayanır. Sıcaklık duyarlı kitosan membranların hazırlanmasında, ilk olarak ticari olarak alınan 200 mg kitosan doğal polimeri, oda sıcaklığında (25°C), 9.0, 9.25, 9.50 ve 9.75 ml hacimlerinde 0.1 M’lık HCl içerisinde çözülmüştür. Yaklaşık iki saat süren bu işlemin ardından, daha önce 1 ml saf suda, 560 mg ağırlığında çözülerek hazırlanan gliserilfosfat disodyum tuzu (GP tuzu) 1.00, 0.75, 0.50, 0.25 ml hacimlerinde alınarak damla damla, kitosan çözeltisine katılmıştır. Tuzun, kitosan içerisinde tam çözünebilmesi için bu işlem manyetik karıştırıcıda yapılmıştır. Daha sonra, hazırlanan düşük viskoziteye sahip çözelti 6 cm çapında, Sigmacote (H6203, Sigma, Almanya) ile kaplanan, cam Petri kaplarına dökülmüştür. Ardından Petri kapları, sıcaklığı 37°C’de sabit tutulan etüvde kurumaya bırakılmıştır.

Etüvde (EN 500, Nüve), çözeltisi uzaklaştırılan ve membran formuna gelen polimer, Petri kabından ayrılarak, saf su ile 1 gün süreyle yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra membranlar 1 gün süreyle oda sıcaklığında (25°C), kurutulmuştur. Ardından membranların sabit tartıma gelmesi için, cam Petri kaplarında, oda sıcaklığında, 740 mmHg basınç altında vakum etüvüne (Nüve EV 018), konulmuştur.



Şekil 3.2. Kitosan-bazlı membranların hazırlanması

3.3. Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan membranlar arasından, yükleme ve salım çalışmalarında kullanılacak olanı seçmek için, membranların yapısal karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Bu bölümde yapısal karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir.

3.3.1. Şişme deneyleri

Membranların şişme karakterlerinin belirlenebilmesi amacıyla, vücut sıcaklığında (37°C), fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) içerisinde, her bir örnek için üçer tekrar yapılarak şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Dinamik şişme deneylerinde gravimetrik tayin yöntemi kullanılmıştır. Vakum etüvünde sabit tartıma gelen kuru örnekler, 25 ml PBS içeren beherler içerisine daldırılmış ve sabit sıcaklık ortamında şişme deneyleri yürütülmüştür. Uygun aralıklarla ortamdan uzaklaştırılan örneğin nemi alınmış ve analitik terazide (Precisa 205 A SCS, duyarlılığı $\pm 0,0001$ g) tartıldıktan sonra PBS içerisine konulmuştur. Örneklerin su içeriği (water content, wc) % olarak Eş. 3.1 ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Su içeriği} = \frac{\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Kuru ağırlık}} \times 100 \quad (3.1)$$

Herbir membran için zamana karşı şişme değerleri grafiğe geçirilmiş ve sonuçlar % şişme ve denge şişme, ECW, (equilibrium water content) olarak değerlendirilmiştir. Şişme kinetik çalışmaları ile ilgili veriler EK.1’de verilmiştir.

3.3.2. FT-IR analizleri

Hazırlanan membranların yükleme öncesi ve sonrası kimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla FT-IR (Fourier Transform Infrared) spektrofotometresi (Schimadzu 8100) ile analizler yapılmıştır. Çalışmada ilk olarak, ticari olarak alınan

kitosan polimeri bir gece vakum etüvünde kurutulmuş, toz haline getirilmiş, potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak disk formunda hazırlanmış ve FT-IR spektrumu alınmıştır. Daha sonra, değişik çapraz bağlayıcı miktarlarına sahip membranlara da aynı işlemler uygulanmıştır. Salım çalışmaları için hem BSA, hem de 5-FU yüklenen jellerin de FT-IR spektrumları alınmıştır. Bütün FT-IR spektrumları $400-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında incelenmiştir.

3.3.3. SEM analizleri

Hazırlanan membranların yükleme öncesi ve sonrası yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM), (JEOL JSM-840A) kullanılarak incelenmiştir. Membranlar vakum etüvünde kurutulduktan sonra yüzeyleri altınla kaplanarak iletken hale getirilmiş, vakum ortamında incelemeler yapılmıştır. SEM incelemeleri Çimento Müstahsilleri Birliği (Ankara) laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.3.4. DSC Analizleri

Ticari kitosanın ve hazırlanan membranların salım öncesi ve sonrası ısısal karakterizasyonu “Differential Scanning Calorimeter” (DSC. Perkin Elmer Diamond) ile gerçekleştirilmiştir. Bütün DSC analizleri $40/450^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında yapılmıştır. Sıcaklık doğruluğu $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$, sıcaklık çözünürlüğü $\pm 0.01^{\circ}\text{C}$ 'dir. DSC analizleri azot atmosferinde $10^{\circ}\text{C}/\text{dak}$ ısıtma hızı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. Mekanik Dayanım Testleri

Mekanik dayanım testleri, daha sonra salım çalışmalarında da kullanılacak olan ve en iyi jelleşme davranışını gösteren membran üzerinde, en az üç örnekle yapılmıştır. Analizde 20 mm uzunluğunda 5 mm eninde şeritler halinde kesilerek hazırlanan membrana oda sıcaklığında 500 N'luk yük (ASTM D882-97) uygulanmıştır. Çekme hızı 30 mm/dak olarak belirlenmiş ve işlem, örneklerde kopma meydana gelene kadar sürdürülmüştür. Mekanik dayanım testleri Llyod (LR 5K) cihazı kullanılarak yürütülmüştür. Testlerin sonucunda “çekme dayanımı” ve “% uzama” (elongation at break) değerleri belirlenmiştir.

3.3.6. CLSM Testleri

Hazırlanan membranların yükleme ve salım çalışmaları sonrasında, yüklenen maddelerin membran içindeki dağılımlarının belirlenebilmesi amacıyla “Confocal Laser Scanning Microscope” (CLSM, FW 4001 Leica Microsystems) analizleri yapılmıştır. Bu amaçla, öncelikle BSA, fluoresceinisothiocyanate (FITC, Sigma, F 46944) ile işaretlenmiştir.

İşaretleme için öncelikle 100 mg BSA, 10 ml NaHCO₃ tamponu içerisinde çözülür. Elde edilen çözelti için pH=9.0'dır. Hazırlanan BSA çözeltisine, 2.5 mg FITC/1 ml aseton çözeltisi eklenir ve 2 saat karıştırılır. Elde edilen homojen çözelti +4°C sıcaklıkta diyaliz membrana konulur. Çeşitli aralıklarla diyaliz yıkama suyu değiştirilir. Yıkama suyunun pH'ı, ilk BSA çözeltisinin pH'ına eşitlendiğinde diyaliz tamamlanmıştır. Ardından elde edilen çözelti 5 gün süreyle, -90°C'de freze-drier'da (Christ, Alpha 2-4 LD) liyofilize edilmiştir. Tüm işlemler ışıksız ortamda yürütülmüştür.

3.3.7. Viskozimetrik İncelemeler

Viskozimetrik çalışmalar kapsamında, oda sıcaklığında çözelti fazında bulunan ancak vücut sıcaklığında jel haline geçen kitosan polimerinin değişik sıcaklıklarda (25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5, 40, 45, 50, 100°C) viskoziteleri ölçülmüştür. Viskozite ölçümleri için I.C.I Cone & Plate Viscometer (London) cihazı kullanılmıştır. Değişik sıcaklıklar için elde edilen viskozite değerleri grafiğe geçirilerek değerlendirilmiştir.

3.4 Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları kapsamında yürütülen deneyler, in-vitro ortamda hem model protein BSA, hem de etken madde 5-FU için, in-vivo ortamda ise yalnızca etken madde 5-FU için yapılmıştır.

3.4.1. Jellere Protein Yüklenmesi

Değişik çapraz bağlayıcı miktarları ile hazırlanan membranlar ile yapılan yapısal karakterizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen jelle, model protein BSA ve etken madde 5-FU yüklenmiştir.

Jellere yükleme iki farklı yöntemle yapılmıştır. “Emdirme” (embedding) yöntemi olarak adlandırılan ilk yöntemde, yükleme ortamlarının oluşturulması amacıyla model protein BSA, 1 mg/ml ve 3 mg/ml çözelti konsantrasyonlarını oluşturacak şekilde, PBS içerisinde çözülmüştür. Vakum ortamında kurutulup sabit tartıma getirilmiş membranlar 15 ml hacmindeki BSA çözeltisine daldırılmış ve oda sıcaklığında (25°C), üç gün boyunca yükleme yapılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar sonucunda 3 günlük sürenin yükleme için yeterli olduğu görülmüştür.

İkinci yöntem olan “çapraz bağlama” (crosslinking) yönteminde, model protein için emdirme yönteminde belirlenen yükleme miktarı (0.0136 g) kadar, toz halde bulunan BSA alınmış ve kitosan çözeltisinde çözülüp, ardından çapraz bağlayıcı tuz konmuştur. Aynı yöntemin bir diğer uygulamasında ise 5 mg/ml konsantrasyona sahip PBS ortamında, çözülerek hazırlanmış BSA çözeltisinden, aynı miktara eş değer olacak hacimde BSA, çapraz bağlayıcı tuzdan önce kitosan çözeltisine katılıp ardından polimer, tuz ile çapraz bağlanmıştır. Toz formunda bulunan etken madde 5-FU’nun in-vitro çalışmaları için “emdirme”, in-vivo çalışmaları için “çapraz bağlama” yöntemi uygulanmıştır. Yöntem için 1.2 mg 5-FU kullanılmıştır.

Her iki yöntem için de yükleme sonunda membranlar sabit tartıma gelinceye kadar oda sıcaklığında, vakum etüvünde kurutulmuş ve salım çalışmalarında kullanıma hazır hale gelmişlerdir.

3.4.2. In-vitro Salım Çalışmaları

İlaç salım kinetiğinin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalar termostatlı çalkalayıcı da (Nüve S 400), 50 rpm hızda, 37°C sabit sıcaklık ortamında yürütülmüştür. Salım çalışmalarından önce PBS (pH=7.4) ortamında değişik konsantrasyonlarda bir dizi BSA çözeltisi hazırlanmış ve floresans spektrofotometresi (CaryEclipse, Varian) ile kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Aynı şekilde 5-FU için de değişik konsantrasyonlarda, PBS ortamında çözeltiler hazırlanmış ve UV spektrofotometresinde (Labomed INC) kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. BSA ve 5-FU için kalibrasyon grafikleri EK.2’de verilmiştir.

Hazırlanan protein ve etken madde yüklü kuru membranlar 25 ml hacminde PBS çözeltisine konmuşlardır. Salınan protein miktarı; floresans spektrofotometresi ile

280 nm uyarılma ve 342 nm emisyon dalga boylarında izlenmiş ve kümülatif salım değerleri hesaplanmıştır. 5-FU için salınan madde miktarı UV spektrofotometresinde 281 nm dalga boyunda gözlenmiş ve kümülatif salım değerleri hesaplanmıştır. Kümülatif salımla ilgili örnek hesaplama EK.3'de verilmiştir. Salım sırasında belirli aralıklarla ortama taze tampon eklenerek sürücü güç (sink conditions) sabit tutulmaya çalışılmıştır.

Salım çalışmaları her bir örnek için üçer defa tekrarlanmış ve zamana karşı % salım eğrileri çizilerek değerlendirilmiştir.

3.4.3. In-vivo Salım Çalışmaları

Etken madde 5-FU'nun in-vivo ortamda salım çalışmalarında, öncelikle araştırma amacıyla, canlı vertebralı deney hayvanı kullanmak için Hacettepe Üniversitesi etik kurulundan izin alınmıştır. Etik kurul izin belgesi EK.4'de verilmiştir. Deney protokolüne göre dişi, Wistar Albino sıçan kan plazması kullanılarak, in-vivo salım deneyleri yürütülmüştür.

Çalışma kapsamında, in-vitro deneylerde 0.5 ml GP tuzu içeren kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Ön denemeler ışığında belirlenen, 1.2 mg 5-FU, 1 ml kitosan çözeltisine çapraz bağlanmıştır. Ardından, kitosan/5-FU kombinasyonu (1 ml), hayvanın kas içine enjekte edilmiş ve enjeksiyon sonrasında hayvanın kalbinden çeşitli aralıklarla 0.5 ml kan alınmıştır. Alınan örneklerin plazması, santrifüj (Biofuge, Heraeus) yardımıyla kandan ayrılmış ve -20°C sıcaklıkta dondurulmuştur.

In-vivo çalışmalarda kontrol olarak saf 5-FU çözeltisi kullanılmıştır. 1.2 mg/ml'lik 5-FU çözeltisinden, 1 ml kas içi enjeksiyon yapılmış ve enjeksiyon sonrasında hayvanın kalbinden çeşitli aralıklarla 0.5 ml kan alınmıştır. Alınan örneklerin plazması santrifüj yardımıyla kandan ayrılmış ve -20°C sıcaklıkta dondurulmuştur

Yapılan literatür taraması ışığında; 5-FU'nun, kanda bulunan plazma proteinleri tarafından hapsedildiği ve ölçümlerde gözlenemediği görülmüştür. Bu amaçla öncelikle, plazma proteinleri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Bu işlem için, 500 µl kan plazmasına 500 µl doymuş amonyumsülfat eklenmiş ve 1.5 dakika vorteks karıştırma yapılmıştır. Ardından çözeltiye, 4 ml n-propanol:dietileter (80:20 v/v)

katılıp, 3 dakika vorteks karıştırma yapılmıştır. Son olarak, hazırlanan çözelti 10 dakika 2400 rpm'de santrifüjlenip, ortaya çıkan organik faz ayrılmıştır. Başka bir tüpe alınan organik faz, 37°C sıcaklıkta bulunan su banyosu içerisine daldırılıp, çözeltinin tamamı kuruyana kadar, azot atmosferi altında buharlaştırılmıştır. Tüp içerisinde kalan beyaz tortular 500 µl mobil faz ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{.Na}_2\text{HPO}_4$ tamponu/%5 asetronitril, pH=5.0) ile çözülmüştür (Casale F. ve ark., 2002).

Plazma örneklerindeki 5-FU miktarının bulunması amacıyla, "High Performance Liquid Chromatography" (HPLC, HP Series 1050) analizleri yapılmıştır. In-vivo koşullar için kalibrasyon grafiği yine aynı cihazla hazırlanmıştır (EK.5). Yapılan çalışmada; 5 mikron partikül çapına, 250mm x 25cm boyutlarına sahip (HP, C18) kolon kullanılmıştır. Enjeksiyonlar 20 µl hacme sahip enjektör ile (Agilent, P5192, Australia) yapılmıştır. In-vitro ve in-vivo salım çalışmalarına dair örnek hesaplamalar EK.3'de verilmiştir.

3.4.4. Histolojik Çalışmalar

Enjeksiyondan hafta sonra, sıçanlara solunum yoluyla dietil eter verilerek ötenazi uygulanmıştır. Ardından deri ve kas dokusu açılarak makroskobik gözlem yapılmıştır. Enjeksiyonun uygulandığı kas dokusu çıkartılarak çevre dokulardan temizlenmiş ve %90 alkol içinde bir gece süreyle bekletilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası doku, alkol ve ksilen serisileri aşağıda verilmiştir. Daha sonra doku parafin blok içine gömülmüştür. Hazırlanan parafin bloklarından mikrotom (REICHERT, Austria) ile 1.5µm kalınlığında boyuna kesitler alınmış ve kesitler hematoksilin-eozin yöntemiyle boyanarak mikroskobik olarak incelenmiştir.

Fiksasyon sonrasında kullanılan alkol ve ksilen serileri

%95 etil alkol 1 saat

%95 etil alkol 1 saat

%100 etil alkol 1 saat

%100 etil alkol 1 saat

Ksilen 15 dakika

Ksilen 15 dakika

Ksilen/parafin (%50/%50) 1 saat

Parafin 3 saat

Hematoksilen-eozin boyama yöntemi

Ksilen 30 dakika

Ksilen 30 dakika

Absol alkol 5 dakika

%95'lik alkol 5 dakika(akar su ile yıkama)

Hematoksilen 10 dakika(akar su ile yıkama)

Asit alkol 30 saniye(akar su ile yıkama)

Scott solüsyonu 10 dakika(akar su ile yıkama)

Eozin 5 dakika(akar su ile yıkama)

%95'lik alkol 5 dakika

Absol alkol 5 dakika

Ksilen 30 dakika

Ksilen 30 dakika

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

Sunulan tez çalışmasında, enjekte edilebilir, sol-jel geçiş özelliğine sahip, kitosan membranların üretimi, bu membranlardan in-vitro ve in-vivo ortamlarda, büyük molekül ağırlığına sahip sığır serum albumin (BSA) proteininin ve küçük molekül ağırlığına sahip 5-fluorourasil (5-FU) etken maddesinin salım kinetiği incelenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, öncelikle değişik çapraz bağlayıcı miktarlarına sahip kitosan jeller hazırlanmıştır. Ardından salım çalışmaları için en uygun çapraz bağlayıcı/kitosan oranına sahip jel seçilmiştir. Seçilen jel çeşitli yöntemlerle karakterize edilmiştir. Tez çalışmasının ikinci kısmında, model olarak seçilen BSA ve 5-FU maddelerinin, seçilen jele yükleme kapasitesi ve salım kinetiği incelenmiştir. Salınan BSA miktarı floresan spektrofotometresi ile, 5-FU miktarı ise in-vitro ortamda UV-spektrofotometresi, in-vivo ortamda HPLC ile tayin edilmiştir. Tüm bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

4.1.Kitosan Jellerin Seçimi ve Üretimi

4.1.1. Kitosan Jellerin Seçimi

Enjekte edilebilir biyopolimerlerin tedavi edici implant ve araç olarak kullanımları son yıllarda oldukça yaygınlaşmıştır. Poli(etilenoksit)-poli(propilenoksit), (Poloxamer) kopolimerinin sulu çözeltileri; en çok bilinen, ilaç salım sistemlerinde en çok kullanılan, termoset, jel oluşturucu maddelerdir. Ancak bu yapının farelere deri altı enjeksiyonlarında eksik fizyolojik bozunma, beklenmeyen plazma kolesterol düşüşü ve trigliserid artışı gözlenmiştir (Chenite A., 2000).

Poloxamerin dezavantajlarından dolayı ilaç salım sistemlerinde alternatif olarak yüksek biyobozunurluğa sahip poli(etilenoksit)-poli(laktik asit) kopolimerleri önerilmektedir. Ancak bu polimerik yapı da, in-vivo ortamda yeterli ilaç salımı için, yüksek polimer derişimine (%25) ve yüksek enjeksiyon sıcaklığına (45°C) ihtiyaç duymaktadır. Bu özellikler ise yaşayan hücreler ve duyarlı proteinler için sınırlayıcı etki oluşturmaktadır (Jeong B., 1997).

Bu sistemlere alternatif olarak yüksek biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu ile kitosan önerilmektedir. Kitosanın çözünürlüğü, yapısında bulunan amin gruplarının asidik ortamda dağılmasıyla meydana gelmektedir. Çözünen kitosan, pH 6.2

civarında çözelti içerisinde kalmaktadır. pH=6.2'nin üzerinde nötürleşip, sistemli olarak hidrat jel oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında katyonik bir polisakkarit olan, sıcaklık duyarlı kitosan polimer çözeltisinin, herhangi bir kimyasal modifikasyona ve kimyasal çapraz bağlanmaya uğramadan, jel oluşturması incelenecektir.

Çalışma, kitosan polimerine, tek bir anyonik uç taşıyan poliol tuzu (gliseril fosfat disodyum tuzu, GP) eklendiğinde oluşan değişiklikler üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu tuzlar, sıcaklık kontrollü, pH bağımlı kitosan çözeltilerinin, hidrat jel oluşturması için ideal ajanlar olarak tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, kitosan/poliol fosfat tuz kombinasyonlarının en belirgin özelliği, çözeltinin faz ayrımı olmadan nötrleşmesi ve sabit pH'ta kalmasıdır. Sistem, nötr pH'ta sıcaklık duyarlı hale gelir ve vücut sıcaklığında jel oluşturur (Crompton ve ark., 2005). Jel fizyolojik pH'ta biyoyapışma özelliği de göstermektedir. Bu özellik in-vivo çalışmalarda istenilen bölgede kitosan jellerin uzun süre kararlı kalmasını sağlamaktadır (Berger J., 2004). Poliol fosfat tuzlarının bir diğer yararı ise kimyasal çapraz bağlayıcılar gibi toksik etkiler göstermemesidir. Tuz, kitosan amin gruplarının nötralizasyonu sonucunda faz ayrımı oluştururken aynı zamanda, zincirler arası elektrostatik çekimi elimine edip, hidrojen bağlarını ve hidrofobik etkileşimleri arttırır. Bu da kitosanın oda sıcaklığında sıvı, vücut sıcaklığında jel olması için tek düze davranış sergilemesini sağlamaktadır. Ayrıca bu tek düze davranış biçimi, pH değişimlerinden kaynaklanan zorlukları elimine etmektedir. Kitosanın deasetilasyon derecesi düştükçe, çözeltinin oda sıcaklığında kararlılığı ve jelleşme süresi artar. Diğer polisakkarit sistemler gibi, bu sistemde de polimer konsantrasyonu düşüktür (ağırlıkça~%2) (Chenite A., 2000, Ruel E., Garie'py, J., Leroux C., 2004).

Kitosan polimerinin sol-jel faz değişiminde etkili olan en önemli parametreler şöyle sıralanabilir;

- i) bazik özellikteki tuzun katılımıyla elektrostatik çekimlerin azalması ve kitosan zincirleri arasında hidrojen bağlarının artışı
- ii) kitosan/GP etkileşiminde hem amonyum, hem de fosfat gruplarının etkisi
- iii) kitosan-kitosan hidrofobik etkileşimlerinin artmasıdır.

Kitosan-tuz etkileşimi tam olarak açıklanamamakla beraber, tuzun kitosan için

iyonik bir çapraz bağlayıcı görevi gördüğü düşünülmektedir. Katyonik bir polimer olan kitosan için, fosfat içeren gliseril fosfat tuzlarının anyonik molekül işlevi göz önüne alınmaktadır. Bununla birlikte, tuzun kimyasal yapısı diğer anyonik çapraz bağlayıcılara benzemektedir (Berger J., 2004).

Düşük sıcaklıklarda kuvvetli kitosan-su etkileşimi, kitosan zincirlerinin birleşmesine karşı koyarken, yüksek sıcaklıklarda su molekülleri gliserolün etkisiyle ayrılmakta, kitosan molekülleri birleşmektedir (Chenite A., 2000).

4.1.2. Kitosan Jellerin Üretimi

Jellerin üretimi “çözücü buharlaştırma” yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kitosan için iyi bir çözücü olan hidroklorik asit’in seyreltik çözeltisi (0.1M) ve çapraz bağlayıcı ajan olarak gliseril fosfat disodyum tuzu kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle çapraz bağlayıcı ajan miktarının hidrojel karakteristiğine ve jelleşme süresine etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda çapraz bağlayıcı miktarının hidrojel sentezi üzerine etkisi ve ilgili yorumlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Tüm örneklerde çözeltiler hazırlandıktan sonra kararlı membran formuna gelmesi 37°C’de incelenmiştir.

Jel üretiminin ikinci kısmında belirlenen çapraz bağlayıcı miktarı sabit tutulmuş, kitosan miktarı değiştirilmiştir. Kitosan miktarının hidrojel sentezine etkisi Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Çapraz bağlayıcı miktarının hidrojel sentezine etkisi

Hidrojel*	GP Miktarı** (ml)	Yorum
D1	0.25	Yaklaşık 20-22 saat sonra membran oluşmuştur. Oluşan membran şeffaftır ve mekanik dayanımı düşüktür.
D2	0.50	Yaklaşık 20 saat sonra membran oluşmuştur. Oluşan membran şeffaftır ve mekanik dayanımı yüksektir.
D3	0.75	Yaklaşık 18 saat sonra membran oluşmuştur. Kurutma sırasında kristallenme gözlenmiştir. Oluşan membran kırılgan yapıdadır.
D4	1.00	12-18 saat arasında membran oluşmuştur. Kurutma sırasında kristallenme görülmüştür. Kırılgan yapıda membran elde edilmiştir

* D1:200 mg kitosan/9.75 ml HCl, D2: 200 mg kitosan/9.50 ml HCl, D3: 200 mg kitosan/9.25 ml HCl, D4: 200 mg kitosan/9.00 ml HCl

** 560 mg gliseril fosfat disodyum tuzu/1 ml su

Çizelge 4.2. Kitosan miktarının hidrojel sentezine etkisi

Çapraz Bağ. Hacmi (ml)*	Kitosan Miktarı (mg)	Yorum
0.50	100	İlk 24 saatte jelleşme gözlenmedi.
	150	İlk 24 saatte jelleşme gözlenmedi.
	200	İlk 20 saatte şeffaf ve mekanik olarak dayanıklı membranlar elde edildi.
	300	İlk 1 saatte kristallenme gözlemlendi.

* 560 mg gliseril fosfat disodyum tuzu/1 ml saf su

Çalışmanın bu kısmından sonra sentezlenen kararlı membran formları jel olarak adlandırılacaktır. Kitosan konsantrasyonu sabit tutularak (200 mg) çapraz bağlayıcı hacminde yapılan değişikliklerde, çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça, jelleşme süresinin azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.1). Ayrıca düşük hacimde tuz kullanılarak hazırlanan jellerde (D1), jelin mekanik dayanımının düştüğü gözlenmiştir. Bu da daha sonra yapılan yükleme ve salım çalışmaları için sorun oluşturmaktadır. Yüksek hacimlerde tuz kullanıldığında ise jellerin (D3, D4) mekanik dayanımı artmış, ancak kurutma işlemi sonrasında jellerde tuz varlığına bağlı olarak kristallenmeler gözlenmiştir. Kristalin bölgeler jeli kırılgan bir özellik verirken jelin homojenitesini de azaltmaktadır.

Bir diğer çalışmada, belirlenen tuz ve çözücü (HCl) hacmi sabit tutulmuş, kitosan miktarı değiştirilmiştir (Çizelge 4.2). Kitosan miktarı arttıkça jelleşme süresinin azaldığı gözlenmiştir. Ancak yüksek miktarda kitosan kullanılarak hazırlanan jellerde jelin homojenitesini bozan kristallenmeler oluşmuştur. Bu nedenlerden dolayı, yükleme ve salım çalışmaları için optimum jelleşme süresine ve iyi yapısal özelliklere sahip olan D2 jeli seçilmiş ve sonraki tüm çalışmalar bu bileşimdeki jeller ile sürdürülmüştür.

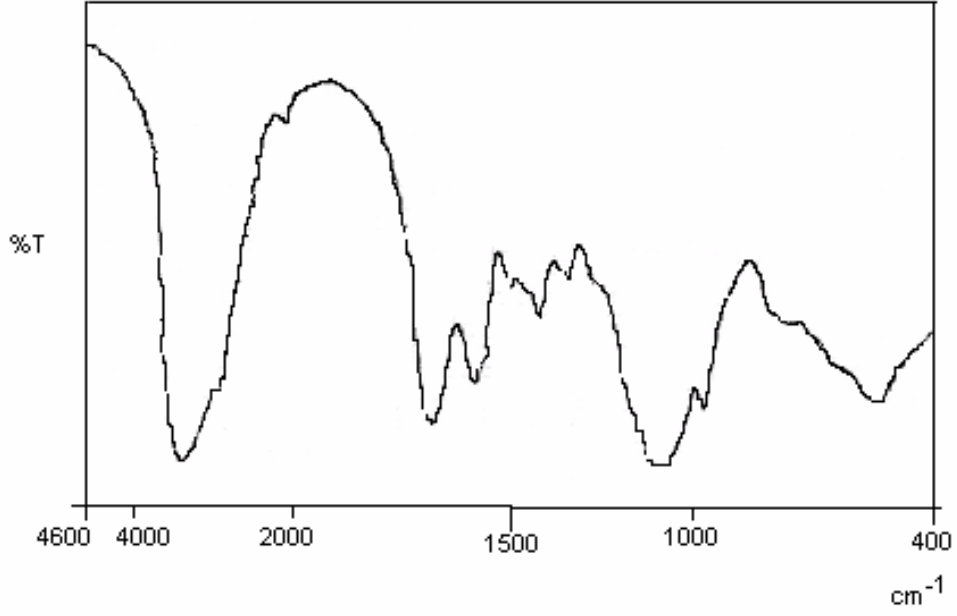
4.2. Jellerin Karakterizasyonu

4.2.1. FT-IR Analiz Sonuçları

FT-IR çalışmasında; saf kitosan (kitosan pellet, deasetilasyon derecesi minimum %85), değişik miktarlarda çapraz bağlayıcı katılarak hazırlanmış kitosan

membranlar (0.25 ml, 0.50 ml, 0.75 ml 1.00 ml GP tuzu ile), emdirme yöntemiyle farklı BSA derişimleriyle yüklenen kitosan membranlar, çapraz bağlanma yöntemiyle farklı BSA miktarlarıyla yüklenen kitosan membranlar, saf 5-FU ve çapraz bağlanma yöntemiyle 5-FU yüklenen kitosan membranların spektrumları alınmıştır. Şekil 4.1’de saf kitosana ait spektrum verilmiştir. Çizelge 4.3’de ise bu spektrum değerlendirilmiş ve mevcut piklerin literatür değerleriyle uyumlu olduğu görülmüştür (Tharanathan, 2002).

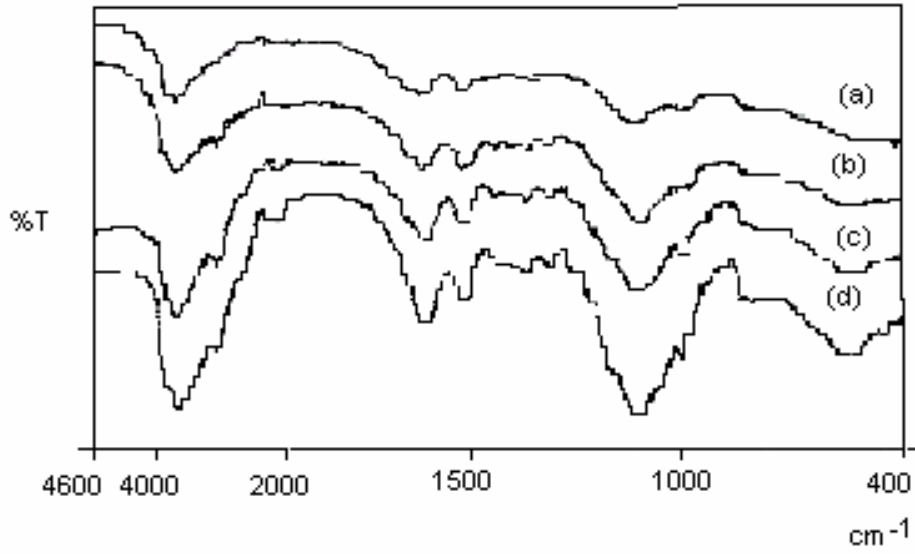
Şekil 4.2’de çapraz bağlayıcı miktarı değiştirilerek hazırlanmış kitosan membranlara ait spektrumlar görülmektedir. Spektrumlarda 0.75 ml ve 1.00 ml GP tuzu ile hazırlanan kitosana ait spektrumlar dışındaki tüm spektrumlar saf kitosan pellet spektrumundaki piklere sahiptirler. Bunun sebebi yüksek miktarda çapraz bağlayıcı kullanılarak hazırlanan jellerin, jelleşme sırasında kristallenmesi ve kuruduktan sonra sert bir yapı oluşturarak tamamen toz haline gelememesidir. 0.25 ml GP tuzu kullanılarak hazırlanan membranlar ise benzer pikler vermişlerdir ancak, jelleşme süreleri oldukça fazla ve jelin mekanik dayanımı düşüktür. Saf kitosan spektrumuna en benzer pikler 0.50 ml GP tuzu kullanılarak elde edilmiştir. Fakat bazı piklerin şiddetinde meydana gelen değişiklikler dikkati çekmektedir. Örneğin 2850 cm^{-1} ’de görülen CH gerilmesi, 1650 cm^{-1} ’de COO gerilmesi ve 890 cm^{-1} ’de görülen NH gerilmesinin şiddetleri çapraz bağlı membranda azalmıştır. Çapraz bağlanma reaksiyonu —OH grupları üzerinden gerçekleştiği için bu beklenen bir sonuçtur.



Şekil 4.1. Kitosan pelletten alınan FTIR spektrumu

Çizelge 4.3. Kitosana ait FTIR spektrumunun değerlendirilmesi

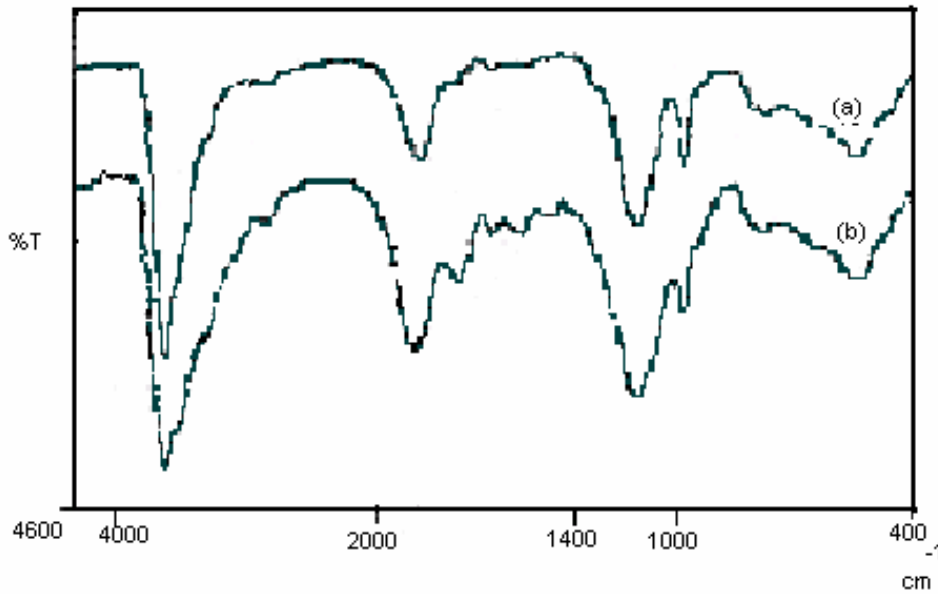
Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Titreşim Türü
3125-3550	OH gerilme
2850	CH gerilme
1650	COO gerilme
1425-1375	CH ₂ eğilme
1266	CH eğilme
1150	CO veya CN
1125-1000	CN gerilme
890	NH eğilme



Şekil 4.2. Değişik çapraz bağlayıcı miktarları ile hazırlanmış kitosan membranlar

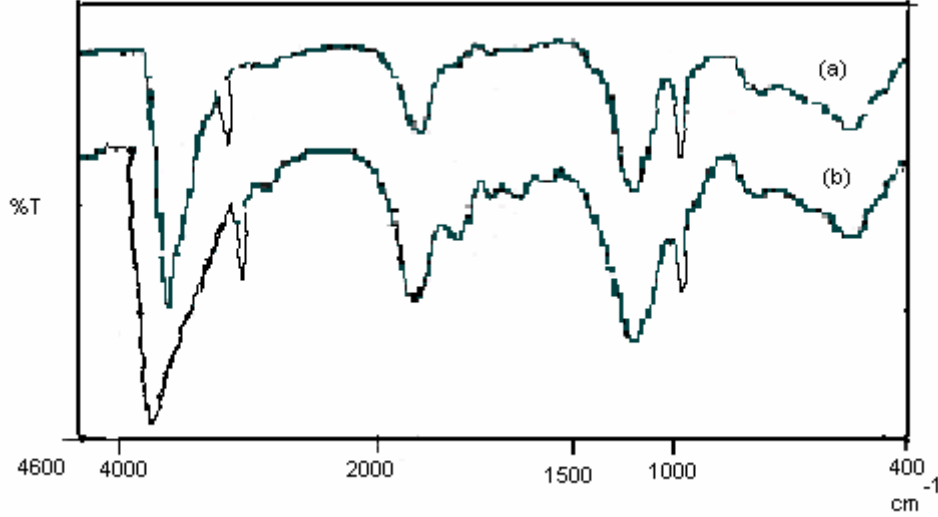
(a) 1.00 ml GP tuzu, (b) 0.75 ml GP tuzu, (c) 0.50 ml GP tuzu, (d) 0.25 ml GP tuzu

Şekil 4.3'de emdirme, Şekil 4.4'de ise çapraz bağlanma yöntemiyle BSA yüklenen membranlara ait spektrumlar verilmiştir. Tüm yüklü kitosan membran spektrumlarının saf kitosan pelletlere ait piklerle benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Ancak jellerin her birine farklı miktarlarda BSA yüklendiği için piklerin şiddetleri değişmektedir ki bu da beklenen bir sonuçtur.



Şekil 4.3. Emdirme yöntemi ile BSA yüklenmiş kitosan membrandan alınan FTIR spektrumları (a) 1 mg/ml BSA çözeltisi, (b) 3 mg/ml BSA çözeltisi

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi emdirme yöntemi kullanılarak BSA yüklenmiş jellerde eş dalga sayılarında saf kitosan pelletdeki titreşim türleri bulunmaktadır. Bu verilerle emdirme yöntemi ile yüklenmiş jellerde herhangi bir kimyasal değişimin oluşmadığı söylenebilir. Eğilme ve gerilme şiddetlerinde görülen farklılıklar ise kurutma sonrasında oluşan fiziksel değişimlerden kaynaklanabilir.



Şekil 4.4. Çapraz bağlanma yöntemi ile BSA yüklenmiş kitosan membrandan alınan FTIR spektrumları (a) 5 mg/ml BSA çözeltisi, (b) 0.0136 g katı BSA

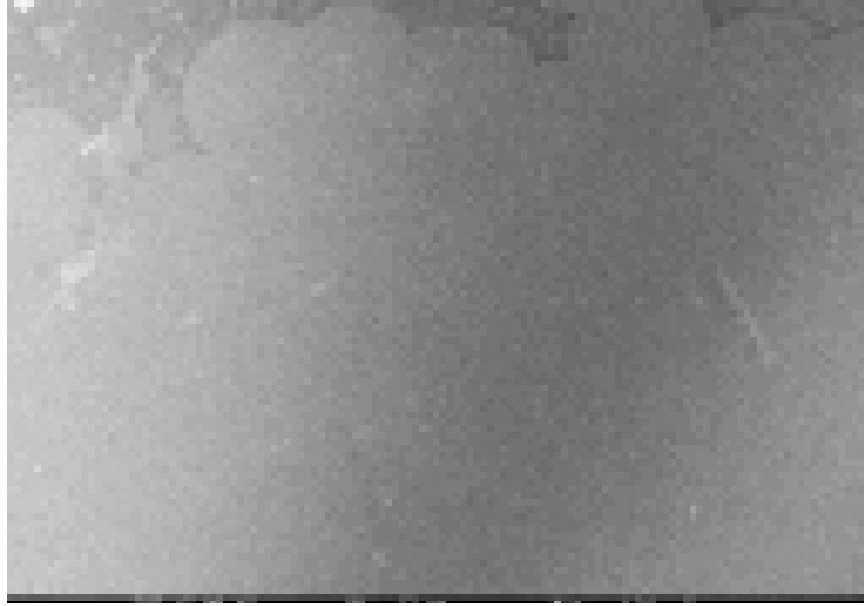
Çapraz bağlanma yöntemi ile BSA yüklenmiş jellerde saf kitosana ait temel titreşim türleri, eş dalga sayılarında gözlenmiştir. Ancak çapraz bağlanma yöntemi, saf kitosan pellette düşük şiddette (2850 cm^{-1} dalga sayısında) bulunan -CH gerilmesini belirginleştirmiştir (Şekil 4.4).

4.2.2. SEM Analiz Sonuçları

Membranların yüzey ve kesit yapılarının morfolojik olarak incelenmesi ve şişme mekanizmasının açıklanabilmesi amacıyla SEM fotoğrafları çekilmiştir.

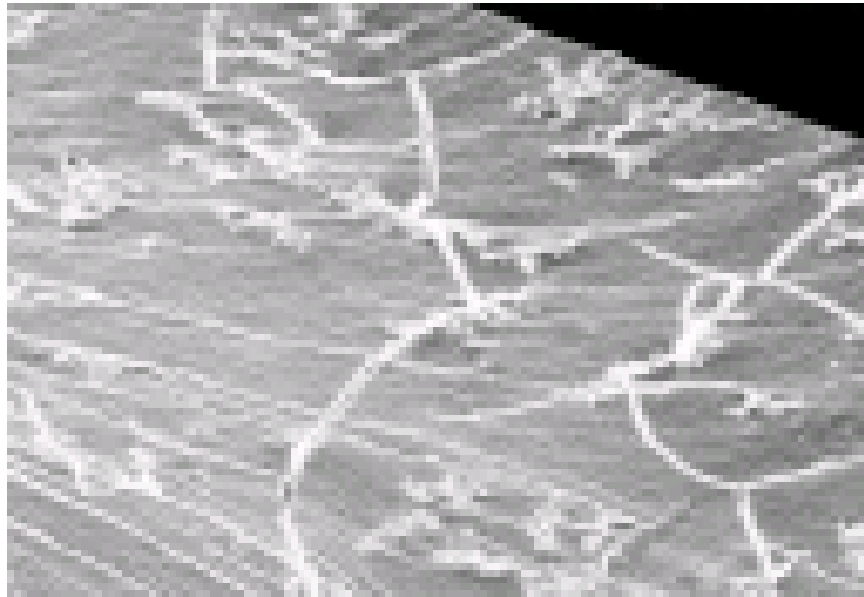
Şekil 4.5.’de kitosana emdirme yöntemiyle BSA yüklendikten sonra jelin SEM fotoğrafları verilmiştir. Yüzey ve kesit fotoğraflarında kitosan üzerinde bulunan, kurutma sırasında oluşan çatlaklar açıkça görülmektedir. Çatlama sonucu ortaya çıkan kanallar protein difüzyonu için önemlidir. Şekil 4.5.b ve 4.5.c ‘de verilen kesit fotoğraflarında jelin iç bölgelerine kadar uzanan gözenekler görülebilmektedir.

Ayrıca yükleme sırasında BSA'nın jelin iç bölgelerinde toplandığı ve homojen yayılmadığı söylenebilir.



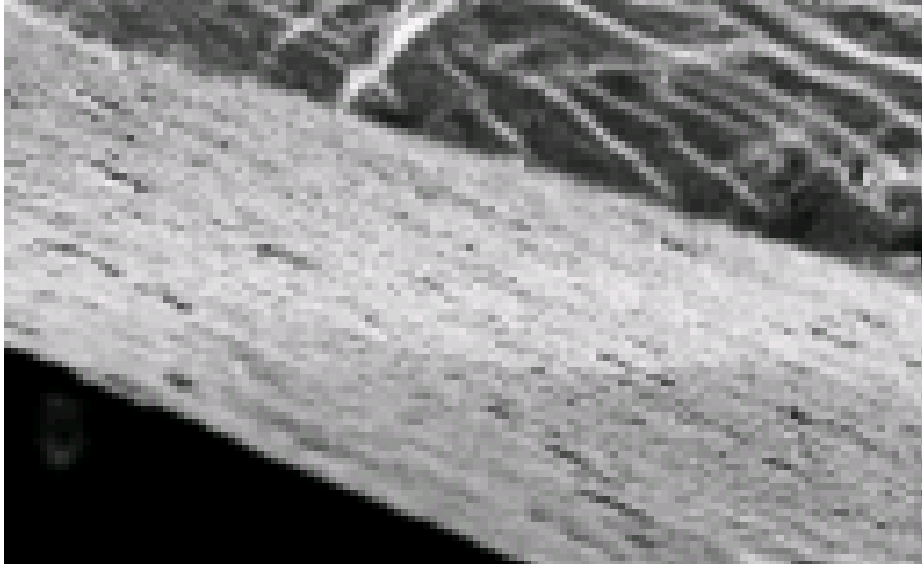
EHT=15.00 kV WD=37 nm Mag_120 X
— 10 μ m

(a)



EHT=15.00 kV WD=37 nm Mag_670 X
— 10 μ m

(b)



EHT=15.00 kV WD=37 nm Mag_1.11 KX
— 10 μ m

(c)

Şekil 4.5. BSA yüklü kitosan membranlar

a) Membran yüzeyi (büyütme x 120)

b) Membran kesiti (büyütme x 670)

c) Membran kesiti (büyütme x 1100)

Şekil 4.6.'da kitosana çapraz bağlanma sırasında yüklenen 5-FU'nun jel içerisindeki morfolojisi gösterilmiştir. Çapraz bağlama sırasında jelin içerisine hapsedilen etken maddenin, homojen bir dağılım sergilediği gözlenmiştir. Bu jellerde, diğer fotoğraflardan daha net bir şekilde kurutma sonrası oluşan çatlakları ve jel yüzeyine dağılan gözenekleri görmek mümkündür.

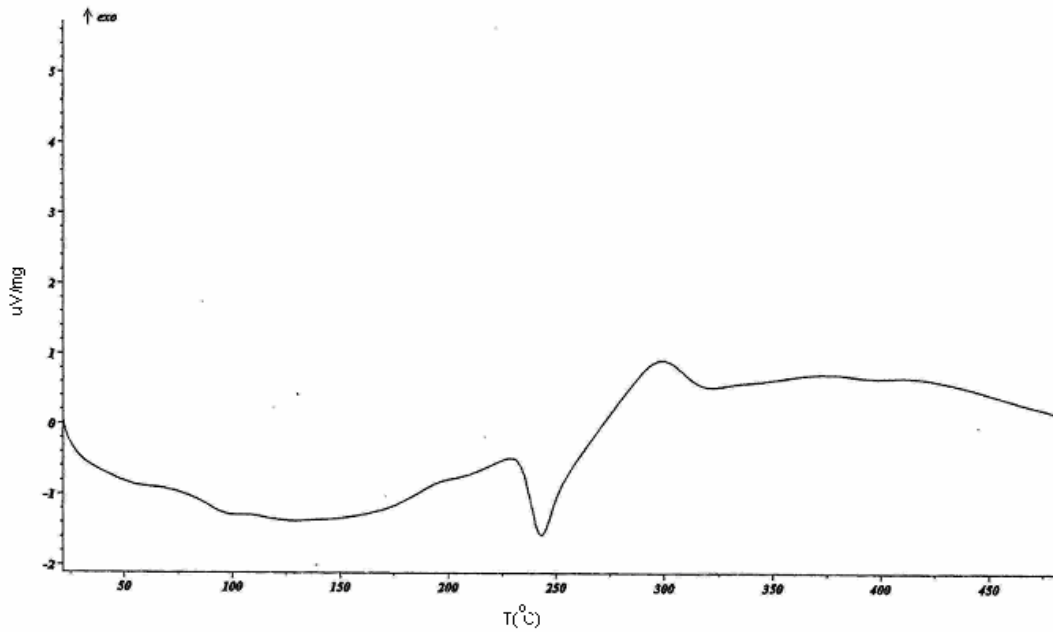


EHT=15.00 kV WD=37 nm Mag_650 KX
— 10 μm

Şekil 4.6. 5-FU yüklü kitosan membranların yüzey fotoğrafı (büyütme x 650)

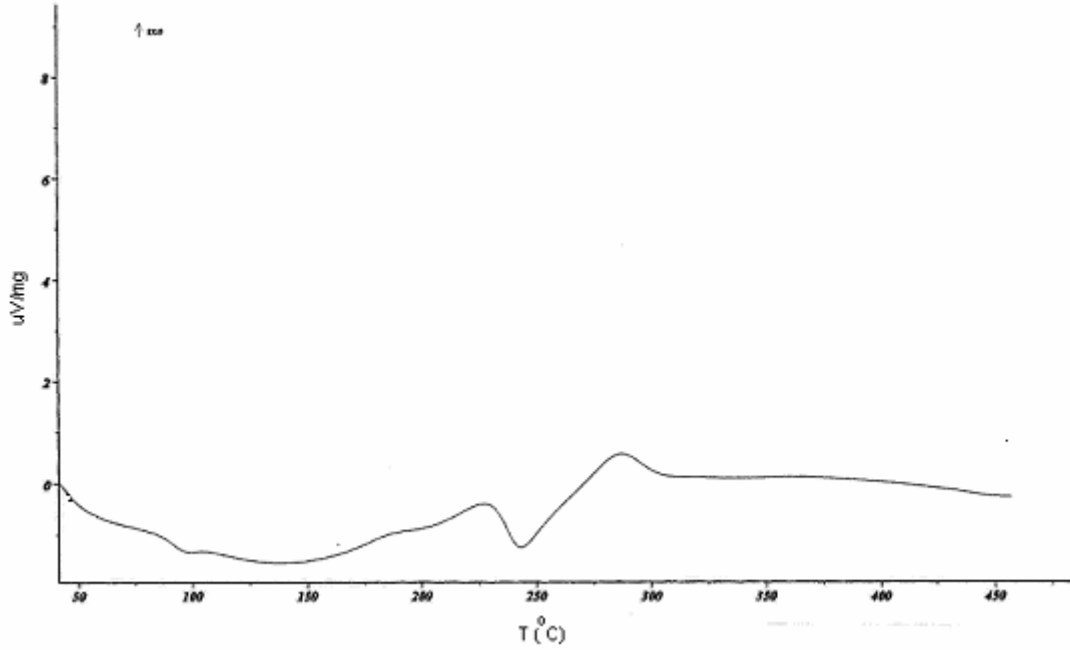
4.2.3. DSC Analiz Sonuçları

Sıcaklıkla sol-jel geçiş özelliğine sahip kitosan jellerin ısı özelliklerinin belirlenmesi amacıyla DSC analizleri yapılmıştır. Şekil 4.7’de ticari kitosana ait ekzotermik ısı grafiği görülmektedir. Bu grafiğe göre saf kitosan yaklaşık 250°C’de erime noktasını (T_m) gösteren erime piki vermiştir. 300°C’nin üzerinde ise bozunmanın gerçekleştiği gözlenmiştir.

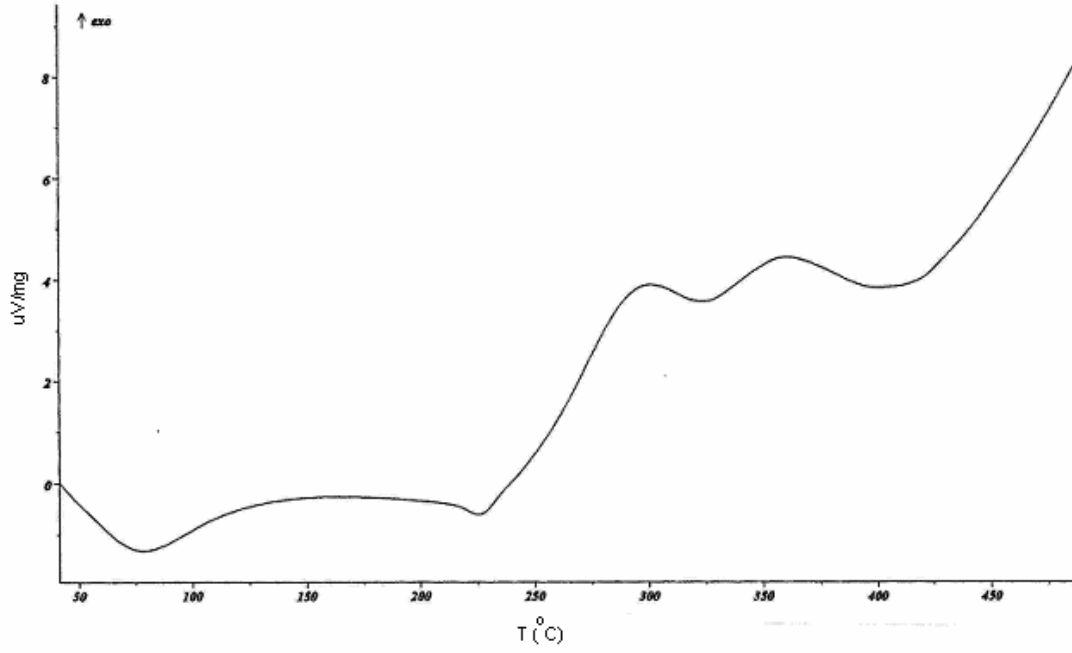


Şekil 4.7. Ticari kitosana için DSC diagramı

Tuz ile çapraz bağlanmış kitosan jelde (D2 jeli) aynı sıcaklıkta kitosana ait T_m bulunurken, yaklaşık 80-100°C civarında tuzun çözücüsü olan suya ait buharlaşma piki yer almaktadır (Şekil 4.8). Burada serbest, zayıf su molekül içi bağları, sıcaklığın artışıyla öncelikli olarak ortamdan uzaklaşmaktadır. Sıcaklık arttırıldıkça daha güçlü etkileşimler parçalanırlar. Benzer ısı özellikler emdirme yöntemiyle BSA yüklenmiş kitosan jelde de gözlenir (Şekil 4.9). Bu eğride suyun buharlaşma piki daha belirgin gözlenmektedir. Bununla birlikte kitosanın T_m 'si 225°C'ye düşmektedir. Erime sıcaklığındaki bu azalma, literatürle orantılı olarak, BSA moleküllerinin kitosan zincirleri arasında dağılımıyla açıklanabilmektedir. Yaklaşık 325°C'de BSA için bozunma piki gözlenmektedir. Her üç eğride de 400°C'nin üzerine çıkıldığında yapıların bozunduğu düşünülmektedir (Pawlak, A., Mucha M., 2005).



Şekil 4.8. D2 jeli için DSC diagramı



Şekil 4.9. Emdirme yöntemi ile yüklenmiş Kitosan/BSA jeli için DSC diagramı

4.2.4. Mekanik Dayanım Testlerinin Sonuçları

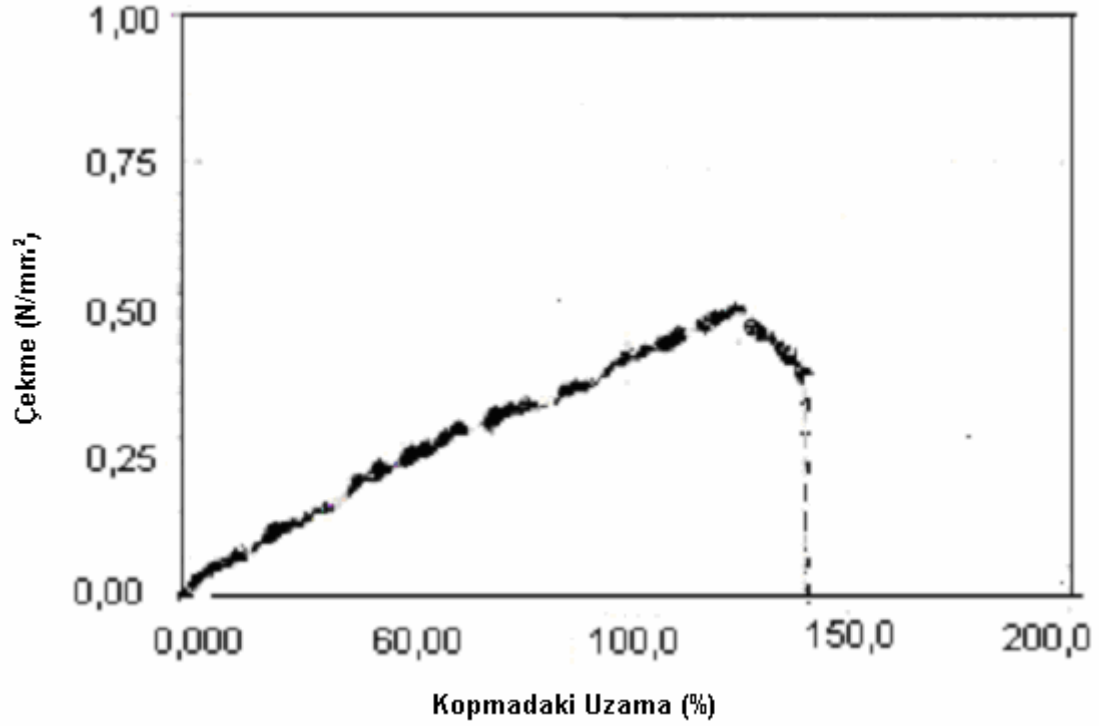
0.5 ml GP tuzu ile çapraz bağlanan kitosan membranının mekanik dayanımının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çekme testi sonucunda elde edilen çekme dayanımı ve uzama değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Mekanik dayanım test sonuçları

Membran tipi	Kopmadaki uzama (%)	Çekme dayanımı (kN/m)	Normalize çekme dayanımı (MPa)
0.5 ml GP tuzu ile çapraz bağlı kitosan membran	139.99	0.2285	40.95

Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere çapraz bağlı kitosan membran, oldukça yüksek bir çekme dayanımına sahiptir. Kitosan doğal polimerinin doğası gereği bu beklenen bir sonuçtur. Ayrıca tuz ile çapraz bağlanmanın mekanik dayanımı artırıcı etkisi vardır. Örneklerde kalan nemin mekanik dayanıma olumsuz etkileri

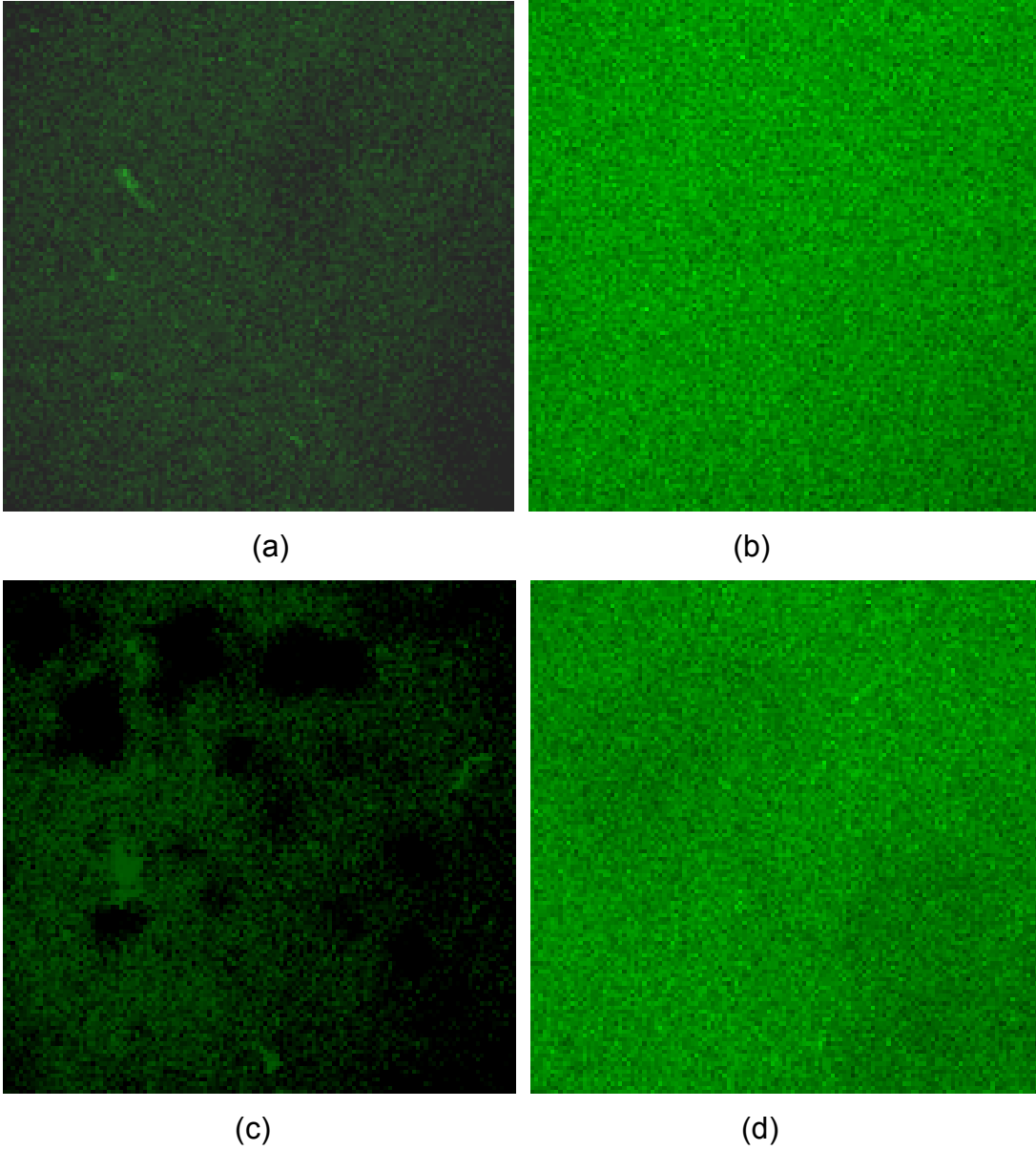
mevcut olabilir. Şekil 4.10'de 0.5 ml GP tuzu ile çapraz bağlanmış kitosan membrana ait çekme eğrisi verilmiştir.



Şekil 4.10. 0.5 ml GP tuzu ile çapraz bağlanmış kitosan membrana ait çekme eğrisi

4.2.5. CLSM Analiz Sonuçları

Kitosan jellere hem emdirme, hem de çapraz bağlama yöntemi ile yüklenen BSA'nın jel içindeki üç boyutlu dağılımının gözlenebilmesi amacıyla CLSM analizleri yapılmıştır. FITC ile işaretlenmiş BSA ile yüklenen örneklerin Confocal mikroskop görüntüleri Şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. BSA yüklü kitosan jellerin CLSM görüntüleri

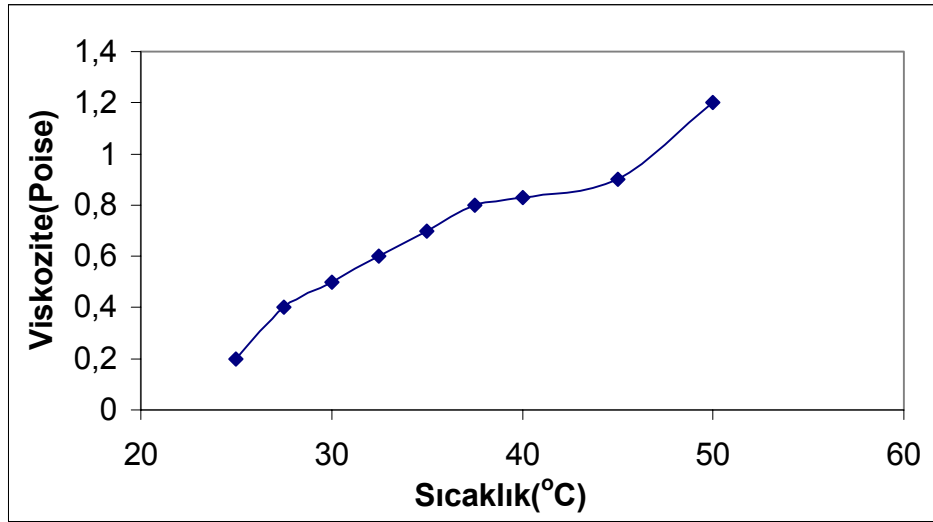
- a) Emdirme yöntemi ile BSA yüklü jel (x 40 büyütme)
- b) Emdirme yöntemi ile BSA yüklü jel (x 63 büyütme)
- c) Çapraz bağlama yöntemi ile BSA yüklü jel (x 40 büyütme)
- d) Çapraz bağlama yöntemi ile BSA yüklü jel (x 63 büyütme)

Fotoğraflarda görüleceği üzere, çapraz bağlama yöntemi ile yüklenmiş BSA, jel içerisinde daha homojen biçimde yayılmıştır. Bu da SEM görüntülerini desteklemektedir. Ayrıca, emdirme ile yükleme işleminde yeterli miktarda BSA jele girememiştir.

4.2.6. Viskozimetrik Analiz Sonuçları

Oda sıcaklığında çözelti halinde bulunan, vücut sıcaklığında jel haline geçen kitosan jellerin, sıcaklık artışıyla birlikte viskozitesinde oluşan değişiklikleri gözlemek amacıyla yapılan analizlerin sonuçları Şekil 4.12’de grafik olarak ifade edilmiştir.

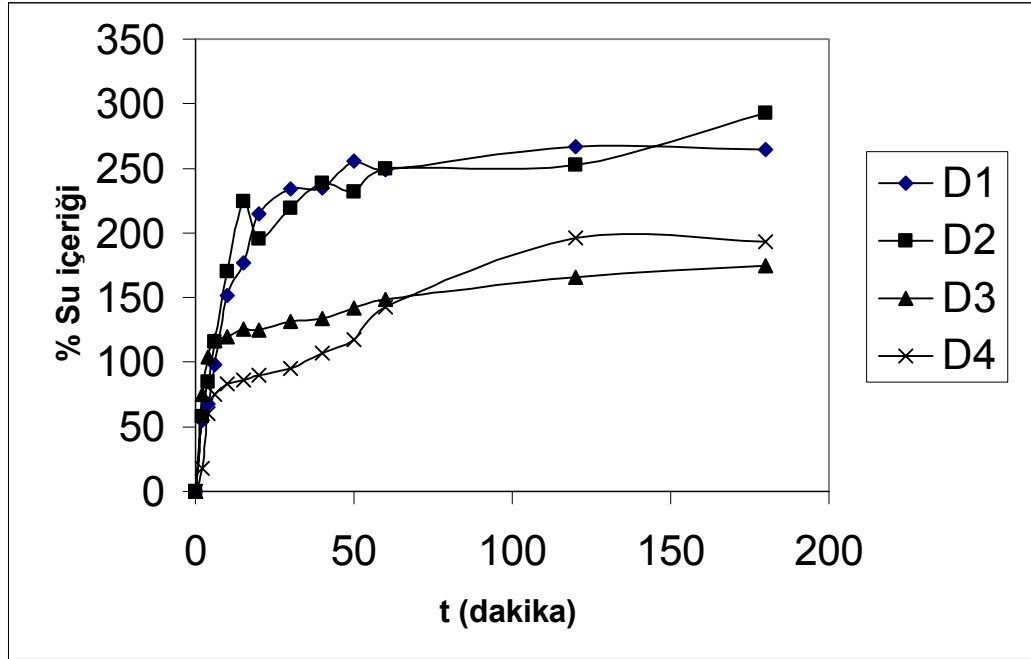
Bu grafiğe göre viskozite artışı yaklaşık 40°C’ye kadar doğrusal devam ederken, daha yüksek sıcaklıklara çıkıldığında doğrusallıktan sapmalar görülmüştür. 100°C sıcaklıkta ise veri alınamadan jelin bozunduğu saptanmıştır.



Şekil 4.12. Kitosan çözeltisinde sıcaklıkla viskozite değişimi

4.3. Şişme Deneyleri

Sunulan çalışma, membranların şişme davranışlarının incelenmesi amacıyla değişik çapraz bağlayıcı tuz oranlarına sahip (0.25 ml, 0.50 ml, 0.75 ml, 1.00 ml GP tuzu) kitosan jellerle yürütülmüştür. Şişme deneyleri, 37°C’de, fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7.4) gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında ortamdan uzaklaştırılan örneklerin şişme değerleri (% su içeriği) Eş. 3.1 kullanılarak kuru temelde hesaplanmıştır. Elde edilen veriler zamana karşı grafiğe geçirilerek membranlara ait şişme eğrileri elde edilmiştir. Şekil 4.13 ‘de verilen zamana bağlı bu şişme eğrileri ile tüm membranların 180inci dakikaya kadar olan şişme kinetikleri karşılaştırılmaktadır. D1, D2, D3, D4 sırasıyla 0.25 ml, 0.50 ml, 0.75 ml, 1.00 ml GP tuzu ile hazırlanmış kitosan membranları ifade etmektedir.



Şekil 4.13. Değişik çapraz bağlayıcı oranlarıyla hazırlanan kitosan membranlara ait şişme sonuçları

Şekil 4.13’de görüldüğü gibi bütün membranlarda ilk 20 dakikada ani bir şişme görülmüş ve membranlar yaklaşık 50 dakikanın sonunda denge şişme değerlerine ulaşmışlardır. Fakat denge şişme değerleri karşılaştırıldığında (Çizelge 4.5) görülmektedir ki 0.75 ml ve 1.00 ml miktarlarında çapraz bağlayıcı kullanılarak hazırlanan jeller diğer (0.25 ml ve 0.50 ml) jellere oranla daha düşük denge şişme değerlerine sahiptirler. Yapılarda oluşan bu fark çapraz bağlanma ile açıklanabilmektedir. Çapraz bağların varlığı çözünmeyi engelleyip yapıya su difüzyonunu zorlaştırmaktadır. Bu nedenle çapraz bağlayıcı miktarının artışıyla gerçekleşen düşük denge şişme değerleri beklenen bir davranıştır. Ancak 0.75 ml ve 1.00 ml GP tuzlarıyla hazırlanan membranlarda beklenen davranış gözlenememiştir. Bunun nedenini jelleşme ve kurutma sırasında yapılarda görülen ve homojen olmayan kristallenme olarak açıklamak mümkündür. Tüm bu açıklamalar SEM fotoğrafları ile de desteklenmektedir.

Çizelge 4.5. Çapraz bağlayıcı miktarına göre jellerin denge şişme değerleri

Kitosan membran	EWC (%)
D1	267±5
D2	293±5
D3	165±5
D4	193±5

4.3.1. Şişme Kinetiğinin Matematiksel Analizi

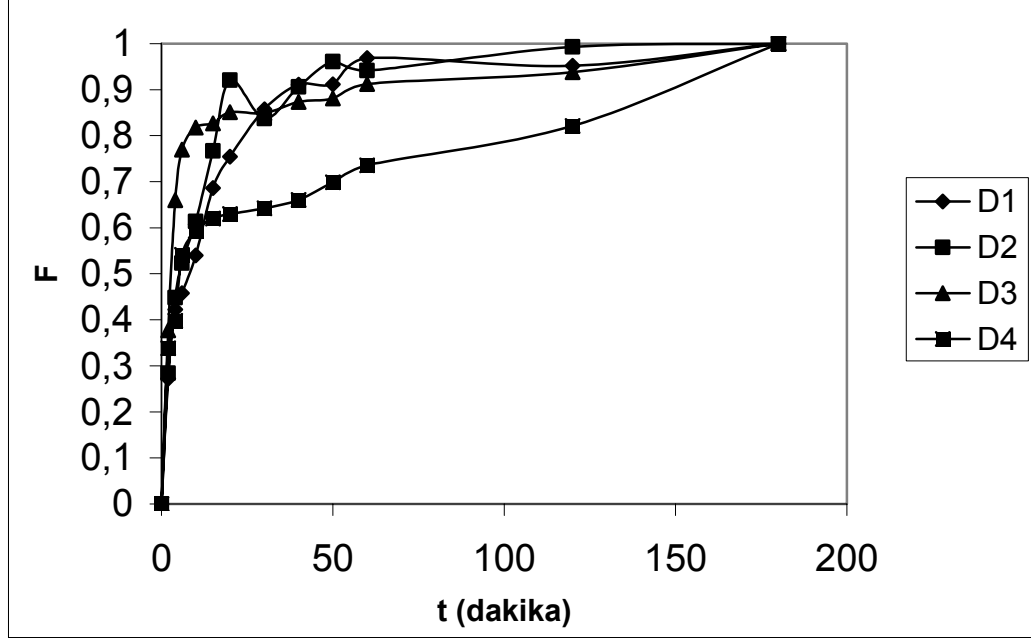
İlaç salım uygulamalarında ve taşınım mekanizmalarının karakterizasyonunda daha önce de belirtildiği üzere “güç kanunu yasası” (Eş.2.1) önem kazanmaktadır. Bu eşitlik, çözücünün polimerdeki genel (sadece Fickian difüzyon değil) taşınım davranışını tanımlamak için kullanılır ve n değerine bağlı olarak difüzyon mekanizmasının türünü açıklar. Farklı maddelerin absorpsiyon ve desorpsiyon hızlarını karşılaştırmada kullanılan bu eşitliğin kullanımındaki bu zorluk; k değerinin n değerine bağlı olmasıdır. Çünkü sadece aynı n değerine sahip maddeler için direkt olarak k değerlerinin karşılaştırılması mümkündür. n üsteli, Eş.2.1’in logaritması alınarak hesaplanabilir. Eş. 4.1’deki verilerin logaritmik eksenle grafiğe geçirilmesi ve lineer regresyon ile doğrunun eğiminin hesaplanması ve n değerinin bulunması mümkündür.

$$F=\log(M_t/M_\infty)=\log k + n \log t \quad (4.1)$$

Burada M_t ve M_∞ , sırasıyla t anında ve dengede salınan ilaç miktarını, k bir orantı sabitini ve n difüzyonel üsteli gösterir. Ritger ve Peppas n katsayısına dayanarak Fickian ve non-Fickian difüzyon davranışını incelemişler ve farklı geometrik şekillerdeki polimerik sistemlerden salım için modeller geliştirmişlerdir (Ritger ve Peppas, 1987).

D1, D2, D3, ve D4 örnekleri için kesirsel şişme değerleri, M_t/M_∞ , zamana karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.14’de yer alan eğriler elde edilmiştir. Bu grafikler,

örneklerin denge şişmesine ulaşma çabukluğunu göstermektedir. Örnekler denge şişmesine ulaşma zamanı açısından değerlendirildiğinde aralarındaki ilişkinin $D1>D2>D3>D4$ şeklinde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.14. Çalışma kapsamında hazırlanan membranların kesirsel şişme(F)-zaman eğrileri

$\log F$ değerleri $\log t$ değerlerine karşı grafiğe geçirilmiş ve lineer regresyon ile doğru eğimleri hesaplanarak bulunan n ve k değerleri, regresyon katsayıları (R^2) ile birlikte Çizelge 4.6.'da tüm örnekler için verilmiştir.

Çizelge 4.6. Tüm örnekler için n , k ve R^2 değerleri

Membran Örnekleri	n	k	R^2
D1	0.52	0.21	0.95
D2	0.58	0.22	0.97
D3	0.57	0.31	0.89
D4	0.37	0.26	0.93

Çizelgedeki değerlerden açıkça görüleceği gibi D1, D2, D3 örnekleri için n değerleri 0.50 civarındadır. İlgili literatürde de belirtildiği gibi film halindeki

malzemeler için $0.50 < n < 1.0$ aralığı difüzyon mekanizmasının non-Fickian olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla sıcaklık duyarlı, kitosan jellerden BSA difüzyonu non-Fickian mekanizması şeklinde gerçekleştiğinden protein salımını karakterize etmek üzere difüzyon katsayısı hesaplaması yapılamamıştır. D4 örneğinde ise n değeri 0.45'den düşüktür. Bunun sebebi yüksek çapraz bağlayıcı miktarı olarak açıklanabilir. Aynı çizelge de yer alan k değerleri ise, hidrojel özelliğine (monomer/çapraz bağlayıcı oranı) ve çözücü karakteristiğine bağlıdır. Çizelgede görüldüğü gibi k değerleri birbirlerine çok yakındır ki bu da beklenen bir sonuçtur.

4.4. Jellerden BSA Salımı ile İlgili Sonuçlar ve Tartışılması

Günümüzde peptid ve proteinler çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere yeterli miktarlarda üretilmelerine rağmen, sahip oldukları makromoleküler yapı ve yüksek molekül ağırlığı nedeniyle vücuda etkin bir biçimde verilebilmeleri halen sorun yaratmaktadır. Klinik uygulamalarda en çok kullanılan yöntem makro moleküler ilaçların oral yolla alımıdır. Ancak oral yolla ilacın vücuda verilisinde, membran-geçirgenliğinin düşüklüğü ve ilacın mide-bağırsak kanalındaki (GI kanal) enzim ve asitlerce hidrolize uğraması ve bozunmasına bağlı olarak çok düşük “biyoyararlanım” elde edilmektedir. Bu nedenle, hem protein ilacın kararlılığını arttırmak, hem de fizyolojik etkenlerden kaynaklı zararları önlemek amacıyla enjeksiyon yöntemi kullanılmaktadır.

Enjeksiyon yönteminde karşılan en büyük problem, ilacın enjekte edildiği bölgeye yüksek oranda etki etmesi, asıl istenilen bölgede etkisinin azalmasıdır. Bu nedenle ilacın istenilen bölgede salımını sağlamak büyük önem taşımaktadır. Sıcaklık duyarlı, sol-jel geçiş özelliğine sahip, gliseril fosfat disodyum tuzuyla bağlı kitosan hidrojel büyük avantaj sağlamaktadır. Daha öncede bahsedildiği gibi büyük moleküllü proteinler kitosan membranlara yüklenmekte, ardından oda sıcaklığında çözelti fazında bulunan polimer-etken madde bileşimi vücut sıcaklığında fizyolojik ortama verildiğinde, jelleşme görülmektedir. Böylece polimer istenilen bölgede jelleşerek etken maddeyi salmaktadır.

Sunulan çalışmada; sentez ve karakterizasyon aşamasında elde edilen sonuçlara göre 0.5 ml GP tuzu kullanılarak çapraz bağlanmış örneğin protein taşıyıcı sistem olarak seçilmesine karar verilmiştir.

Bu hidrojel en yüksek şişme kapasitesine sahiptir. Ayrıca hidrojel beklenen optimum jelleşme süresini verebilmiştir. Jelleşme, diğer jellere göre daha kısa sürede gerçekleşmekte ve kurutma sırasında yapının karakterizasyonunu etkileyecek kristallenmeler oluşmamaktadır. Yapı oda sıcaklığında (25°C) kararlılığını uzun süre koruyabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı 0.5 ml GP tuzu ile hazırlanan hidrojel protein ilaçların salımında taşıyıcı sistem olarak uygun görülmüş ve bu jele model protein olarak seçilen 65000 Dalton molekül ağırlığına sahip sığır serum albumin'i (BSA) yüklenerek, ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aşağıda jellere BSA yüklenmesi ve salımına yönelik sonuçlar verilerek, gerekli tartışmalar yapılmıştır.

4.4.1. Hidrojellere Protein Yüklenmesi

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen jele (D2), BSA yüklemesi iki farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemlerin ayrıntıları Bölüm 3.4.1'de verilmiştir. İlk yöntemde jelin şişme kapasitesinden faydalanılmıştır. Emdirerek yükleme, PBS tamponunda çözünen BSA'nın 2 farklı konsantrasyonunda (1 ve 3 mg/ml), oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Yüklemenin oda sıcaklığında yapılmasının nedeni klinik uygulamalar için oda sıcaklığının en uygun olması ve ayrıca kitosanın yapısı gereği bu sıcaklıkta maksimum yüklemenin yapılabilmesidir.

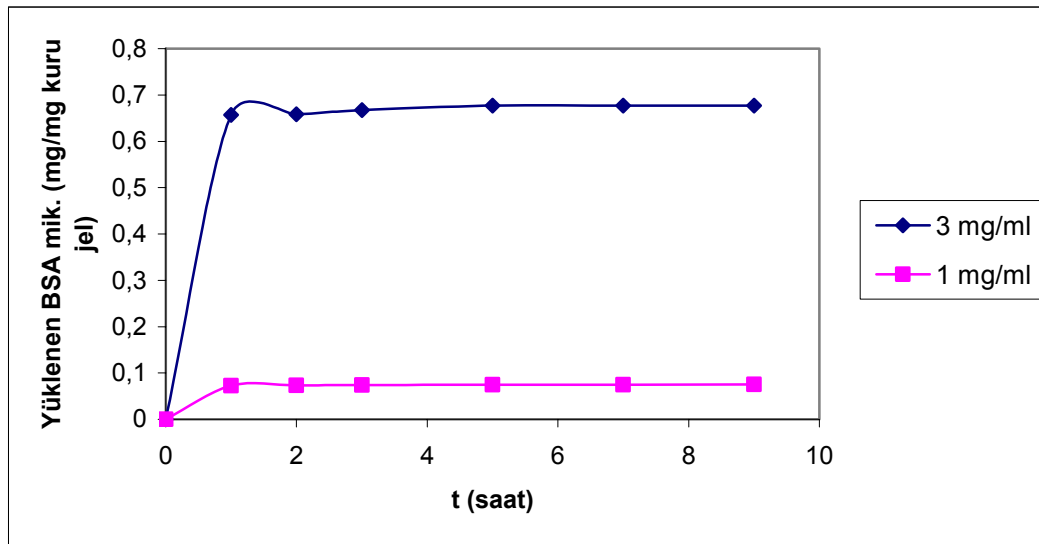
İkinci yöntem ise klinik uygulamalar için tercih edilen, çapraz bağlama sırasında yapıya ilacın hapsedilmesidir. Bu yöntemde yapıya hapsedilen BSA miktarı emdirme yönteminde jelin alabildiği maksimum protein miktarı ile aynı tutulmuştur (0.0136 g). İkinci olarak da yapıya, PBS ortamında çözündürülmüş BSA'dan (5mg/ml), aynı miktara karşılık gelecek kadar protein çözelti formunda hapsedilmiştir. Her iki yöntemde oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Emdirme işlemi ile yükleme miktarı, floresan spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Literatür taraması sonucunda floresan spektrofotometresinde uyarılma dalga boyu=280 nm, emisyon dalga boyu=342 nm olarak seçilmiştir. Çalışmada BSA'nın

tyroptophan grubu üzerinden yapılan analizlerde çalışılan sıcaklıkta protein yapısında denatürasyon olmadığı bilinmektedir. BSA model proteininin florimetrik yöntemde kullanılan kalibrasyon grafiği EK. 2’de verilmiştir.

Yüklenen BSA Miktarının Çözelti Konsantrasyonu ile Değişimi

Şekil 4.15’de verilen eğrilerden anlaşılacağı gibi ilk 1 saatte hızlı bir yükleme gerçekleşmektedir. Ayrıca 3 mg/ml’lik BSA çözeltisinden yüklenen miktar 1 mg/ml’lik çözeltiden yüklenen miktara göre oldukça fazladır ki bu da beklenen bir sonuçtur. Bu sonuç, yüksek konsantrasyonda jeldeki protein miktarının artışı ve buna bağlı olarak da BSA’nın jelden difüzyonu ile sürücü gücün (konsantrasyon farkı) artışıyla açıklanabilir. Ön çalışmalarda BSA konsantrasyonu 3 mg/ml’nin üzerine çıktığında salım değerlerinin fazlaca değişmediği ve jelde kısa sürede parçalanma olduğu görülmüştür.



Şekil 4.15. Çözelti konsantrasyonunun BSA yüklemesine etkisi

- a) Başlangıç çözelti konsantrasyonu: 3 mg/ml
- b) Başlangıç çözelti konsantrasyonu: 1 mg/ml

Çok hızlı gerçekleşen yüklemelerde 3 mg/ml’lik çözeltiden 29.72 mg BSA/g kuru jel, 1 mg/ml’lik çözeltiden 3.36 mg BSA/g kuru jel miktarlarında BSA yüklenmiştir. Çapraz bağlama yönteminde emdirme yönteminde yüklenen miktar olan 0.0136 g BSA hem kuru, hem de 5 mg/ml BSA çözeltisinden 2.6 ml ile yüklenmiştir

4.4.2. Protein Salım Kinetiği ile ilgili Sonuçlar

Deneysel çalışma kısmında açıklandığı gibi salım çalışmalarında florimetrik olarak tayin edilen salım miktarlarından yararlanılarak kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve salınan BSA değerleri, mg/g kuru polimer ve %salım olarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Kümülatif salım değerlerinin hesaplanmasıyla ilgili veriler EK 3.1’de verilmiştir.

Model sistemde BSA salımı

Madde miktarları belli olan S1, S2, S3, S4 jellere, 3 mg/ml ve 1mg/ml konsantrasyonlarında olan BSA çözeltilerinden emdirme yöntemiyle ve 0.0136 g BSA hem kuru halde, hem de 5 mg/ml BSA çözeltisinden (2.6 ml) çapraz bağlama yöntemiyle yüklendikten sonra salım işlemine geçilmiştir. Jellerin özellikleri ve simgeleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Salım çalışması, sistemin vücut içerisinde kullanımı için tasarlandığından vücut içi sıcaklıkta, (37°C) ve fizyolojik pH’da (pH=7,4) yürütülmüştür.

Çizelge 4.7. BSA salımında kullanılan jellerin* özellikleri ve simgeleri

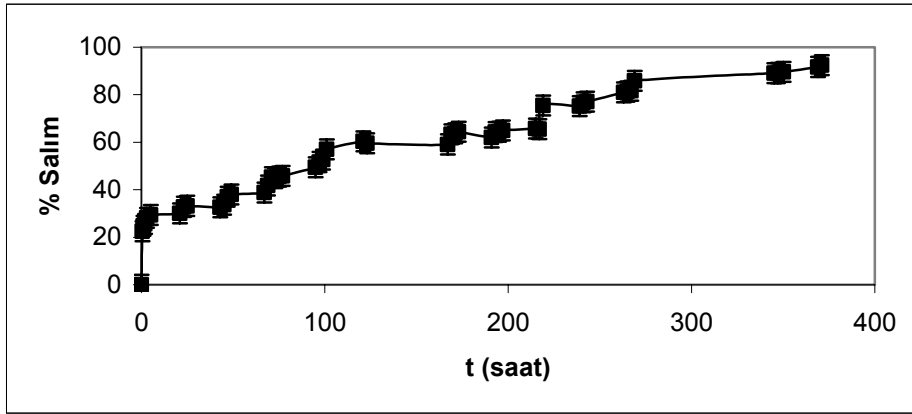
Jellerin simgeleri	Yükleme yöntemi	Yüklenenecek BSA çöz. konantrasyonu	Yüklenen BSA miktarı (mg/g kuru jel)
S1	Emdirme	3 mg/ml	29.72
S2	Emdirme	1 mg/ml	3.36
S3	Çapraz bağlama	-	13.60
S4	Çapraz bağlama	-	13.60

* Çizelgedeki tüm jeller D2 bileşiminde olup BSA yüklemesi sonrasında değişik yükleme miktarlarına sahip jeller S1, S2, S3, S4 olarak kodlanmıştır.

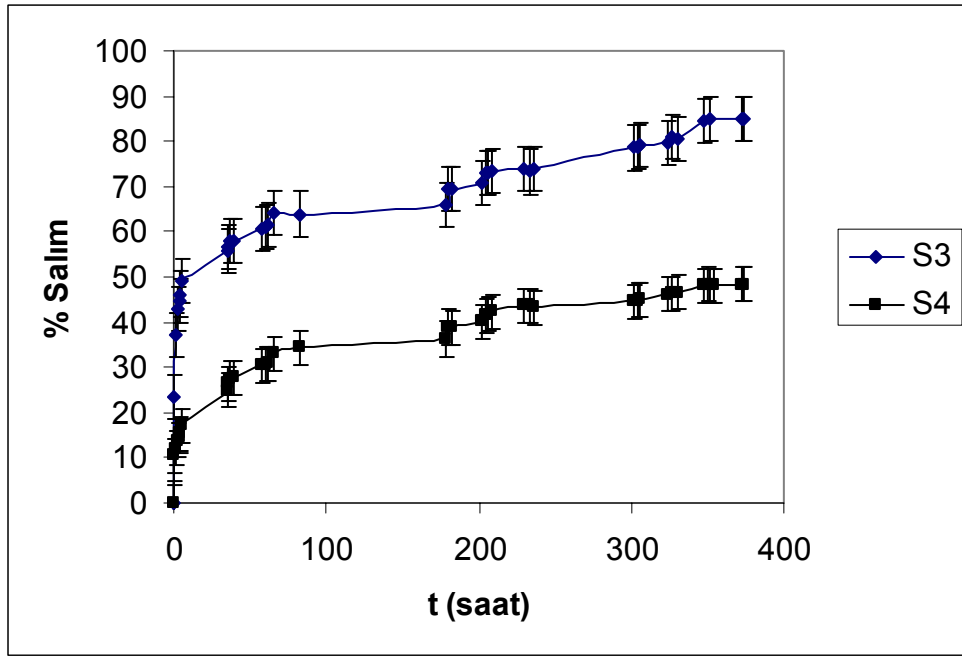
Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de zamana karşı % salınan BSA miktarı verilmiştir. S2 jeline yüklenen miktarın çok az olması nedeniyle salım çalışmalarında S1 jeli kullanılmıştır. Emdirme yöntemi kullanılarak yüklenen bu jelden salım yaklaşık

350inci saatte denge değerine ulaşmıştır. S1 jelinden salım yaklaşık %92, S3 jelinden salım yaklaşık %85, S4 jelinden salım yaklaşık %48'dir.

Bütün jellerde ilk 8 saatte hızlı bir salım gerçekleşmekte (burst effect) ardından salım hızı yavaşlamaktadır. şekil 4.18 ve şekil 4.19' de ilk 5 saatte jellerden salınan BSA miktarları % salım cinsinden verilmiştir. şekillerde görüldüğü gibi jellerden salım ilk 1 saatin içinde çok hızlı gerçekleşmekte ve salınacak miktarların büyük çoğunluğu salınmaktadır. İlk saatlerde gerçekleşen hızlı salımın başlıca nedeni, yükleme sonrasında jelin kurutulmasıdır. Kurutulan jel hızla salım ortamında şişmekte bu şişme sonrasında jel ile salım ortamı arasında oluşan yüksek konsantrasyon farkından kaynaklı burst effect görülmektedir. şekil 4.18 ve şekil 4.19'da ilk 5 saatte jellerden salınan BSA miktarları % salım cinsinden verilmiştir.



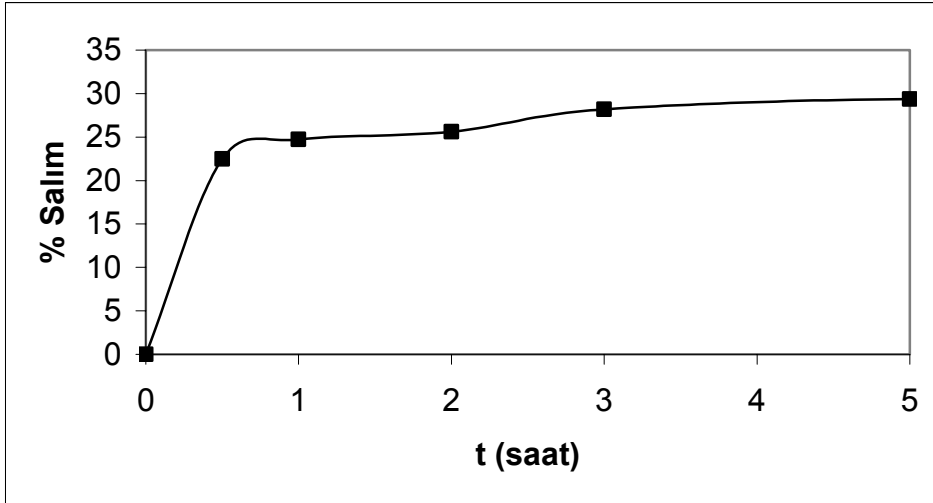
şekil 4.16. Emdirme yöntemi kullanılarak yüklenmiş S1 jelinden BSA salımı (T= 37°C, pH=7.4)



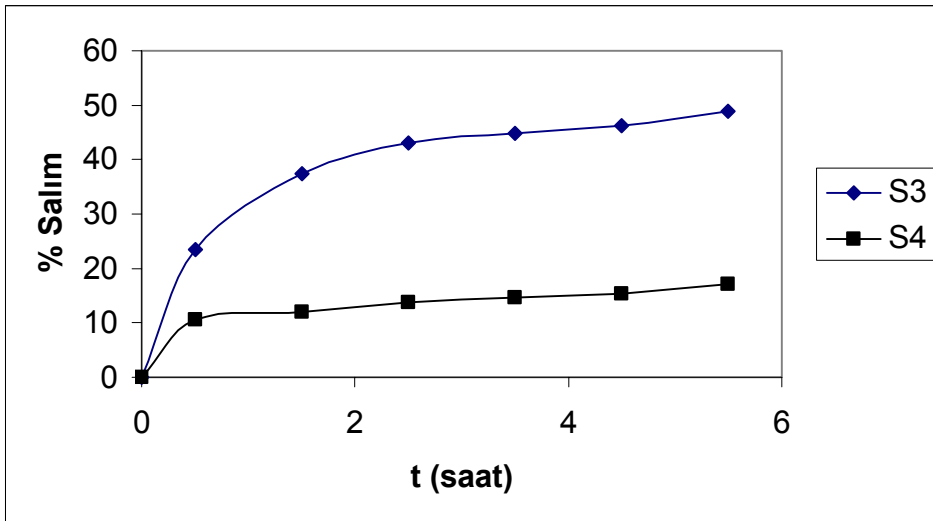
Şekil 4.17. Çapraz bağlama yöntemi kullanılarak yüklenmiş jellerden salım

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi S3 jelinden salınan BSA miktarı S4 jelinden salınan BSA miktarından daha fazladır. Bunun nedeni yükleme sırasında toz halde çapraz bağlanan BSA’nın jelin tamamına homojen olarak dağıldığı söylenebilir. BSA çözeltisi kullanılarak çapraz bağlamada ise BSA model proteini jelin iç kısımlarında hapsolmuş (burst effect) ve etkin salım gerçekleşmemiştir.

Sonuç olarak BSA model proteinin salımı için emdirme yöntemiyle yüklenen jelden salım daha verimli bulunmuştur. Ayrıca yükleme konsantrasyonunda optimum değer olan 3 mg/ml uygun görülmüştür.



Şekil 4.18. Emdirme yöntemi kullanılarak yüklenmiş S1 jelinden ilk 5 saatte BSA salımı



Şekil 4.19. Çapraz bağlanma yöntemi kullanılarak yüklenmiş jellerden ilk 5 saatte BSA salım

4.4.3. BSA Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

İlaç salımının, hidrojel matrise çözücü moleküllerinin girişi ve ardından matrisin şişmesiyle kontrol edildiği sistemlere “şişme kontrollü sistemler” denir. Bu sistemlerde, ilaç başlangıçta camsı polimerde çözünür veya dağılır. Biyolojik akışkanla temas haline gelindiğinde ise polimer matris şişmeye başlar ve polimerde iki ayrı faz gözlenir; içteki camsı faz ve şişen kauçuğumsu faz. İlaç molekülleri polimerin kauçuğumsu fazından dışarı difüzlenebilirler. Yani, polimerin

camsı kısmından dışarı ilaç difüzenmesi olmadığından ilaç salımı, camsı kauçuğumsu ara yüzeyin hızı ve pozisyonuyla kontrol edilir. Camsı-kauçuğumsu ara yüzeyde makromoleküler gevşeme olayı meydana gelir ve bu, ilaç salımını önemli derecede etkiler. Makromoleküler gevşemenin ilaç salım mekanizması üzerindeki bağıl etkisi, deneysel verilerin Eş. 2.1.'ye uydurulmasıyla kolayca tayin edilebilir. Ancak bu eşitlik, salınan toplam ilaç miktarının ilk %60 için uygulanabilir (Peppas ve ark., 2000).

Bu çalışmada da yukarıdaki bilgilerin ışığında hidrojellerden BSA samlında difüzyon mekanizmasının türünü belirlemek üzere Eş.2.1 kullanılmıştır. n üsteli, bu eşitlikteki verilerin logaritmik ekseninde grafiğe geçirilmesi ve lineer regresyon ile doğru eğiminin hesaplanmasıyla bulunmuştur. Çizelge 4.8'de tüm jellerden salıma ait n ve k değerleri, regresyon katsayıları ile birlikte topluca sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Salımda çalışmalarında kullanılan tüm örnekler için n, k ve R^2 değerleri

Membran Örnekleri	n	k	R^2
S1	0.18	0.21	0.90
S3	0.21	0.28	0.99
S4	0.21	0.31	0.98

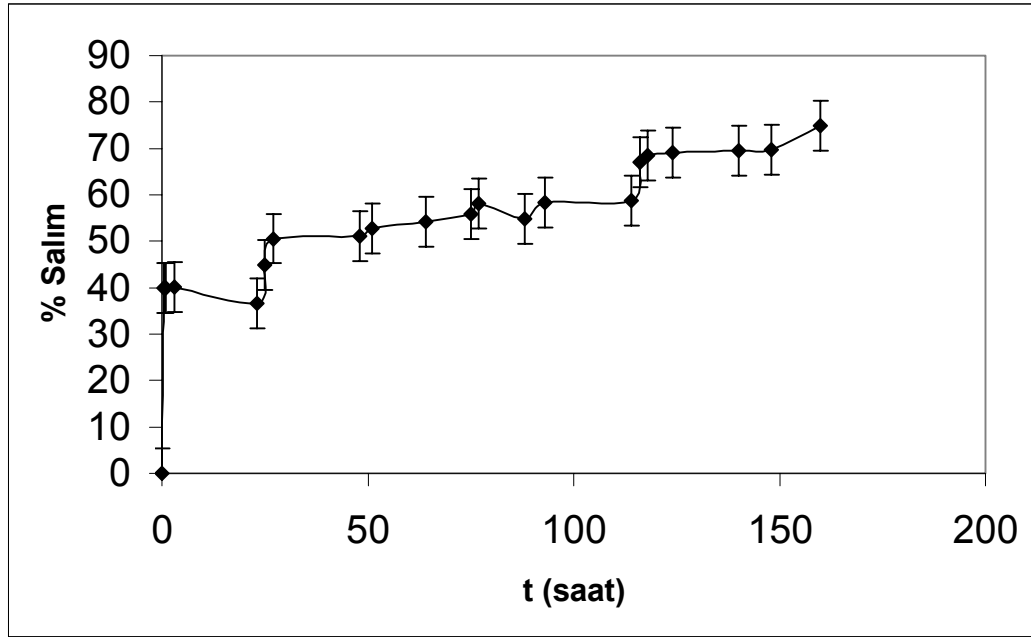
Çizelgede görüldüğü gibi, n değerleri 0.50'de küçüktür. Bu da salımın Fick yasasına uymadığını göstermektedir.

4.5. Jellerden 5-FU Salımı ile İlgili Sonuçlar ve Tartışılması

Tez çalışmasının önceki kısımlarında sıcaklık duyarlı, sol-jel geçiş özelliğine sahip kitosan hidrojellerden, büyük moleküllü BSA proteinin yükleme ve salımı incelenmiştir. Çalışmanın bu kısmında model olarak seçilen jelden küçük moleküllü bir ilaç olan 5-fluorouracil'in (MA=130.1), in-vitro ve in-vivo ortamlarda yükleme ve salım sonuçları verilecektir.

4.5.1. In-vitro Ortamda Jellerden 5-FU Salımı

In-vitro koşullarda emdirme yönteminin uygulaması için %10'luk 5-FU çözeltisi hazırlanmıştır. Ortalama yüklenen miktar UV spektrofotometresi ile 22.36 mg/g kuru hidrojel olarak belirlenmiştir. Madde miktarı belli olan kitosan jele “emdirme” yöntemi ile yüklenen 5-FU için % salım sonuçları Şekil 4.20.'de verilmiştir. 160 saatlik sürede salımını tamamlayan 5-FU, yaklaşık yüklenen miktarın %75'ini salmıştır. Salım sonuçları ile ilgili veriler EK. 6'da verilmiştir



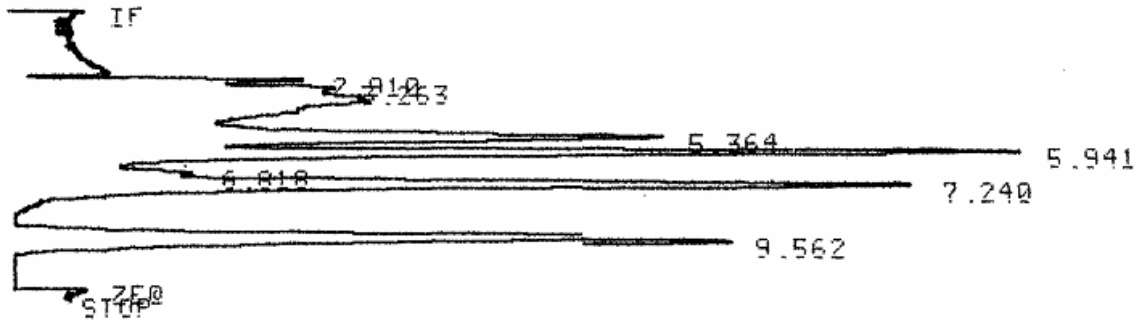
Şekil 4.20. In-vitro ortamda kitosan jellerden 5-FU salımı (T=37°C, pH=7.4)

4.5.2. In-vivo Ortamda Jellerden 5-FU Salımı

Daha öncede belirtildiği gibi, in-vivo ortamda sıçanlar ile yapılan çalışmalarda, etken maddenin tayini için, HPLC cihazının UV dedektörü kullanılmıştır. HPLC cihazı için, 5-FU kalibrasyon grafiği EK.5'de verilmiştir. Jele, 1.2 mg 5-FU, çapraz bağlama yöntemiyle yüklenmiş, ve hayvana kas içi enjeksiyonla verilmiştir. Kontrol için aynı miktarda (1.2 mg) 5-FU jele yükleme yapılmadan, hayvana kas içi enjeksiyonla verilmiştir. Hayvandan, ön çalışmalarda belirlenen, 51 saat boyunca, 5-FU salımı izlenmiştir. Enjeksiyondan 1 saat sonra alınan kan plazmasındaki 5-FU miktarının HPLC ile tayinine ait kromatogram örneği Şekil 4.21'de verilmiştir. HPLC kromatogram incelemeleri yapılırken öncelikle madde miktarı aranılan maddenin kaçınıcı dakikalarda pik verdiği araştırılır. Buna bağlı olarak öncelikle

cihazda saf 5-FU pikinin zamanı belirlenmiştir. Daha sonra araştırmada kullanılan cihazın yazıcı türüne bağlı olarak, genel uygulamalardan farklı şekilde pik-alan hesaplamaları yerine pik-boy hesaplamaları yapılmıştır.

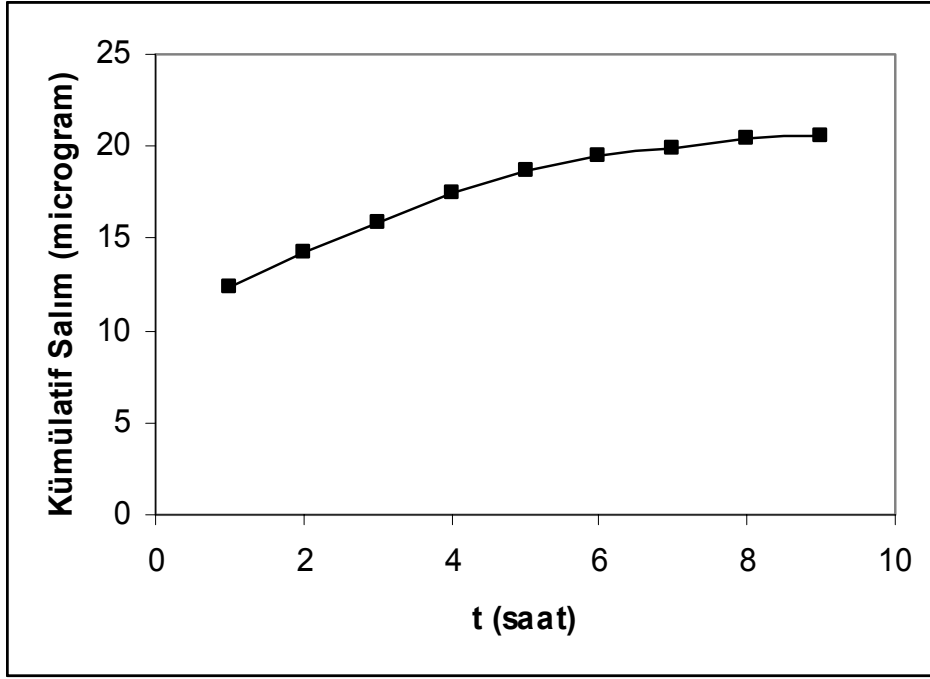
Salınan madde miktarını belirlemede karşılaşılan en büyük güçlük, HPLC cihazında düşük molekül ağırlığına sahip olan 5-FU etken maddesinin büyük moleküllü proteinlere sahip kan plazması içerisinde okunamaması olmuştur. Kontrol grubundaki sıçanlara değişik dozlarda verilen saf 5-FU, tüm metabolik faaliyetlere rağmen plazma içerisinde cihaz tarafından okunabilirken, jellere yüklendikten sonra, düşük salım yüzdesi ile birlikte plazma içerisinde tayin edilememiştir. Bu problemi yenmek amacıyla, HPLC cihazında 250 mm uzunluğunda, 2.5 mm çapında, 5 µm partikül boyutlu özel C18 kolon kullanılmıştır. Ayrıca HPLC cihazlarında taşıyıcı faz olarak kullanılan tampon içeriğinde çeşitli değişiklikler yapılmıştır. Tampon olarak, %99 (h/h) eşit hacimde 1/15 M KH_2PO_4 ile 1/15 M Na_2HPO_4 ve %1 (h/h) asetronitril kullanılmıştır. HPLC analiz sonuçlarına dair kromotogram örneği Şekil 4.21’de verilmiştir.



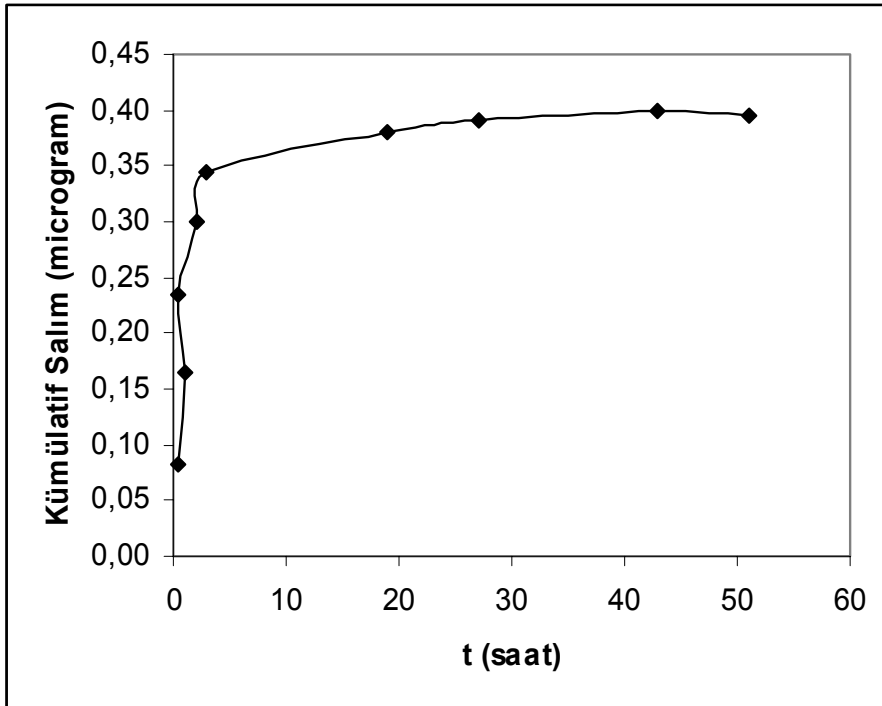
Şekil 4.21. In-vivo salım çalışmaları için kullanılan HPLC kromotogram örneği

In-vivo deneyler, hem klinik çalışmalarda sıcaklık duyarlı, enjekte edilebilir kitosan jellerin uygulama kolaylığını ve verimini göstermesi açısından hem de, 5-FU anti-kanserojen maddesinin kontrollü bir biçimde salımının sağlanması açısından önem taşımaktadır.

In-vivo ortamda salım sonuçları ile ilgili veriler EK. 7’de sunulmuştur. Etken maddenin in-vivo ortamda kontrol olarak salımı ve jelden salım eğrileri Şekil 4.22, Şekil 4.23’de verilmiştir.



Şekil 4.22. 1.2 mg 5-FU'nun kas içi enjeksiyon sonrası salım kinetiği



Şekil 4.23. 1.2 mg 5-FU ile yüklenmiş kitosan jellerin kas içi enjeksiyonu sonrasında salım kinetiği

In-vivo salım çalışmaları sonucunda jele yükleme yapılmadan enjekte edilen 5-FU'nun salımında yaklaşık 20.5 µg madde salınmıştır. Jelle birlikte verilen 5-

FU'nun ise yaklaşık 0.4 µg salınmıştır. Sıçanların metabolik faaliyetleri göz önünde bulundurulduğunda bu beklenen bir sonuçtur.

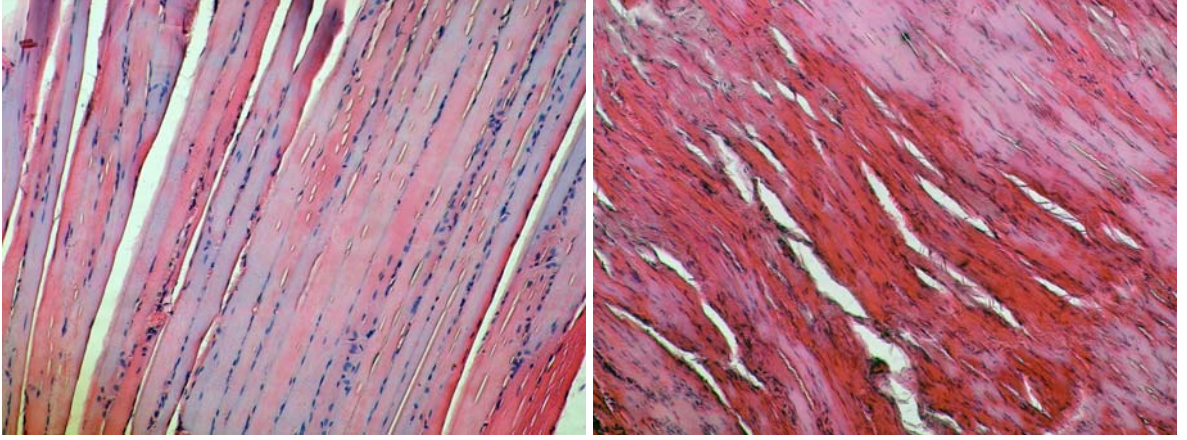
Hazırlanan tez çalışmasında genel olarak amaç; etkili ve yüksek hasta uyumluluğu sağlayabilen ilaç salım sistemi oluşturabilmektir. Bu amaçta kastedilen, doğru konsantrasyonda, doğru yere, istenilen peryotta ve zamanda ilaç salımıdır (Mısırlı D., 2005). Bu kapsam da pek çok çalışma yürütülmüştür. Benzer bir çalışma yürüten Bhattarai N. ve arkadaşlarının 2005 yılında hazırladıkları çalışmada GP tuzu ile nötralize edilen kitosan, PEG polimerinin gövdesine takılmıştır. Oluşan bu polimerin 10-45°C aralığında jelleştiği ancak sentez kısmında çok fazla polimer kaybı yaşandığı belirtilmiştir. In-vitro salım çalışmalarında son konsantrasyon 200-1000 mg/ml olacak miktarda BSA jelle çapraz bağlama yöntemi ile yüklenmiştir. Değişik oranlarda sentezlenen jellerle yürütülen kümülatif salım çalışmalarında ilk 5 dakikada ilacın %52-67'sinin salındığı, salımın 70 saatte sonlandığı belirlenmiştir. Toplam ilacın %70-80'inin salındığı gözlenmiştir. Aynı çalışmanın ikinci kısmında, genipin çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmış ve BSA ile benzer salım eğrileri elde edilmiştir.

Tez kapsamında yürütülen bu çalışma da ise in-vitro ortamda hem makromoleküler yapıdaki BSA, hem de düşük molekül ağırlığına sahip 5-FU incelenmiştir. Burada dikkati çeken en önemli nokta her iki yapı ile yürütülen salım çalışmalarında ilk saatlerde hızlı bir salım görülse de çalışmaların tamamının uzun süreli oluşudur. BSA ile yürütülen salım çalışması yaklaşık 350. saatte son bulup, yüklenen BSA'nın ~%90'nı salınmıştır. 5-FU ile yürütülen çalışma ise yaklaşık 150 saat sürmüş ve ilacın ~%75'i salınmıştır. Büyük molekül ağırlıklı BSA'nın, 5-FU'ya göre daha uzun sürede ve daha yüksek oranda salınması beklenen bir sonuçtur ve bahsedilen benzer çalışmalara göre de üstünlük sağlamaktadır.

4.5.3. In-vivo Salım Çalışmaları Sonrasında Dokulara Uygulanan Histolojik İnceleme Sonuçları

Histolojik incelemeler için kullanılan tüm preparatlar 200 büyütmede (X20) Olympus IX70 inverted mikroskop ile çekilmiştir. Şekil 4.24'de kontrol grubuna ait normal bir çizgili kas dokusu ve kontrol grubu ile aynı özellikleri taşıyan kas dokusunun histolojik kesitleri gösterilmiştir. Hücreler normal boyutlarında ve düzgün

şekillidirler. Çekirdekleri normal olarak boyanmış ve hücredeki lokalizasyonlarında herhangi bir anormallik gözlenmemiştir.



(a)

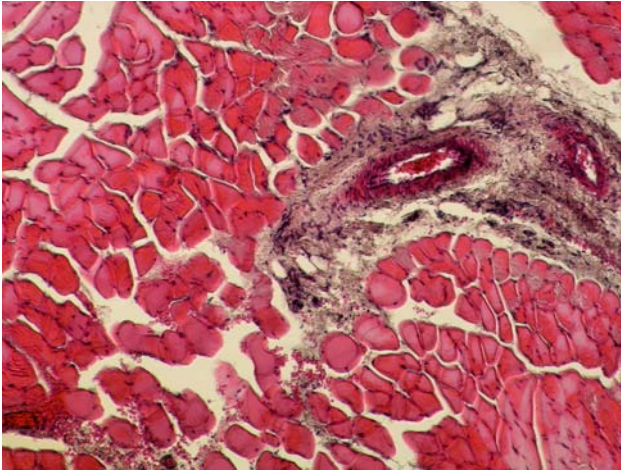
(b)

Şekil 4.24. Histolojik kesit

a) kontrol dokusu

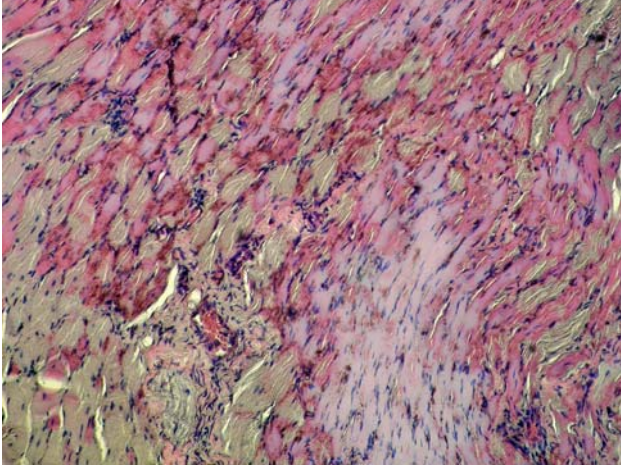
b) kontrol grubu ile aynı özellikleri taşıyan kas dokusu

Şekil 4.25'te kas doku içerisindeki kan damarı görülmektedir. Kan damarı içindeki kırmızı kan hücreleri gözlenmektedir. Bu hücrelerde herhangi bir deformasyon bulunmamaktadır. Kan damarı çeperi normal görüntüsünde ve kalınlığındadır. Kan damarının çevresinde bir miktar hiperplazik etki gözlenmektedir. Mor olarak boyanmış granülositler dokuda görülmektedir.



Şekil 4.25. Kas doku içerisindeki kan damarı

Şekil 4.26'da kas doku ve etrafındaki bağ dokusu görülmektedir.



Şekil 4.26. Kas doku ve etrafındaki bağ dokusu

Histolojik inceleme ve makroskopik gözlem

Enjeksiyondan 1 hafta sonra sıçanlara dietil eter kullanılarak ötenazi uygulanmış ve kas dokusu ile birlikte doku çıkartılmıştır. Doku çıkartılırken, herhangi bir zorlamaya maruz kalmadan kas dokusunun birbirinden ayrıldığı görülmüştür. Ancak enjeksiyon çevresinde herhangi bir kanlanma veya fibroz doku oluşumuna rastlanmamıştır. Sonuç olarak, deney grubundaki histolojik kesitleri deney grubu ile karşılaştırdığımızda anormal bir oluşum veya aktivite göze çarpmamaktadır.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında, ilk olarak sıcaklık duyarlı, sol-jel geçiş özelliğine sahip, enjekte edilebilir hidrojeller sentezlenmiş ve karakterize edilmişlerdir. Daha sonra hazırlanan jellere in-vitro ortamda BSA ve 5-FU yüklenip salım kinetikleri incelenmiştir. Tez çalışmasının son kısmında in-vivo ortamda 5-FU yüklü jellerden ilaç salımı incelenmiş ve salım sonrasında dokular üzerinde histolojik çalışmalar yapılmıştır.

- Sıcaklık duyarlı, enjekte edilebilir, sol-jel geçiş özelliğine sahip kitosan hidrojeller gliseril fosfat disodyum tuzunun çapraz bağlayıcı olarak kullanılmasıyla fiziksel olarak çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlanmanın hidrofobik etkileşimler ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Kitosanın doğal bir polimer oluşu, yüksek biyouyumluluğu ve çapraz bağlanma sırasında herhangi bir kimyasal modifikasyon oluşmaması kitosan jellerin uygun ve güvenilir bir biyomalzeme olarak kullanımını sağlamaktadır.
- Hidrojel üretiminde kitosan doğal polimeri 0.1 M'lık hidroklorik asit çözeltisinde çözündürülmüştür. Çapraz bağlanmada kullanılan tuz 560 mg/ml su konsantrasyonunda hazırlanmıştır. Hidrojeller bu konsantrasyonda değişik hacimlerde (0.25 ml, 0.50 ml, 0.75 ml ve 1.00ml) tuz kullanılarak çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmişlerdir.
- Değişik oranlarda çapraz bağlayıcı ile hazırlanan jeller, jelleşme süreleri ve mekanik dayanımları göz önünde bulundurularak yükleme ve salım çalışmalarında kullanılmak üzere incelenmişlerdir. 0.25 ml tuz kullanılarak sentezlenen jelin jelleşme süresinin çok uzun, mekanik dayanımının düşük olduğu gözlenmiştir. Yüksek miktarda tuz kullanılarak hazırlanan jellerde ise kurutma sırasında kristallenmeler gözlenmiştir. Sonuç olarak optimum jelleşme süresine sahip, mekanik olarak dayanıklı, 0.50 ml hacminde tuz (0.50 ml tuz/9.5 ml kitosan-HCl) ile çapraz bağlanan jel seçilmiştir. Oluşan jel şeffaftır ve mekanik dayanımı yüksektir.
- Değişik hacimlerde tuz kullanılarak hazırlanan jeller FT-IR spektrumu ile karakterize edilmişlerdir. FT-IR sonuçlarında çapraz bağlayıcı oranı

değiştirilmesine karşın piklerin yerlerinde değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Fiziksel olarak çapraz bağlanmış jellerde bu beklenen bir sonuçtur.

FT-IR diagramlarında $3125-3550\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısında yüksek bir –OH gerilmesi gözlenmiştir. Jellere BSA yüklemesi sonrasında (emdirme ve çapraz bağlama yöntemleri ile) alınan FT-IR spektrumlarının ticari kitosan ve 0.50 ml tuz ile çapraz bağlanan jelle ait spektruma benzediği belirlenmiştir. Sonuç olarak emdirme yöntemi ile yüklenmiş jellerde herhangi bir kimyasal değişim oluşmamıştır. Çapraz bağlama yöntemi ile BSA yüklenmiş jellerde, saf kitosan pellette düşük şiddette (2850 cm^{-1} dalga sayısında) bulunan -CH gerilmesi belirginleşmiştir.

- Jellerin yükleme sonrasında yüzey ve kesit özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla SEM fotoğrafları çekilmiştir. Yüzey ve kesit fotoğraflarında kitosan üzerinde kurutma sırasında oluşan çatlaklar ve jelin iç bölgelerine kadar uzanan gözenekler görülebilmektedir. Yükleme sırasında BSA'nın jelin iç bölgelerinde toplandığı ve homojen yayılmadığı, çapraz bağlama sırasında jelin içerisine hapsedilen 5-FU'nun, homojen bir dağılım sergilediği gözlenmiştir.

- Jellerin ısı davranışlarının gözlenebilmesi amacıyla $40-450^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında egzotermik DSC analizleri yapılmıştır. Ticari kitosanın erime sıcaklığı, T_m , yaklaşık 250°C olarak belirlenmiştir. Tuz ile çapraz bağlanmış kitosan jelde aynı sıcaklıkta kitosana ait T_m bulunurken, yaklaşık $80-100^{\circ}\text{C}$ civarında tuzun çözücüsü olan suya ait buharlaşma piki yer almaktadır. Emdirme yöntemiyle BSA yüklenmiş kitosan jelde kitosanın T_m 'si 225°C 'ye düşmektedir. Yaklaşık 325°C 'de BSA için bozunma piki gözlenmektedir. 400°C 'nin üzerine çıkıldığında yapıların bozunduğu düşünülmektedir.

- 0.50 ml GP tuzu ile çapraz bağlanan kitosan membranının mekanik dayanımının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çekme testi sonucunda çekme dayanımı ve uzama değerleri elde edilmiştir. Kopmadaki uzama yaklaşık % 140, çekme dayanımı 0.2285 kN/m , normalize çekme dayanımı 40.95 MPa olarak saptanmıştır.

- Kitosan jellere hem emdirme, hem de çapraz bağlama yöntemi ile yüklenen BSA'nın jel içindeki üç boyutlu dağılımının gözlenebilmesi amacıyla CLSM analizleri yapılmıştır. FITC ile işaretlenmiş BSA ile yüklenen jellerin içinde

maddenin homojen olarak dağılmadığı gözlenmiş ve sonuçlar SEM fotoğraflarını desteklemiştir.

- Oda sıcaklığında çözelti halinde bulunan, vücut sıcaklığında jel haline geçen kitosan jellerin, sıcaklık artışıyla birlikte viskozitesinde oluşan değişiklikleri gözlemek üzere viskozimetrik ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sonucunda viskozitenin 25°C ile 37°C arasında doğrusal olarak değiştiği, 40°C'nin üzerinde sıcaklıklarda doğrusallıktan sapıldığı gözlenmiştir.
- Fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) içerisinde fizyolojik sıcaklıkta gerçekleştirilen şişme deneylerinde şişmelerin oldukça hızlı bir şekilde gerçekleştiği ve yaklaşık ilk 20 dakika içinde sonlandığı gözlenmiştir.
- Hidrojellere protein yüklemesi iki farklı yöntemle yapılmıştır. Emdirme yönteminde 1 mg/ml ve 3 mg/ml'lik BSA çözeltilerinden üç gün süreyle yükleme yapılmıştır. Çok hızlı gerçekleşen yüklemelerde 3 mg/ml'lik çözeltiden 29.72 mg BSA/g kuru jel, 1 mg/ml'lik çözeltiden 3.36 mg BSA/g kuru jel miktarlarında BSA yüklenmiştir. Çapraz bağlama yönteminde emdirme yönteminde yüklenen maksimum miktar olan 0.0136 g BSA hem kuru halde, hem de 5 mg/ml BSA çözeltisinden 2.6 ml kullanılarak yüklenmiştir.
- Emdirme yöntemi kullanılarak yüklenen jellerden salım yaklaşık 350. saatte denge değerine ulaşmıştır. Burada dikkati çeken en önemli nokta 1 mg/ml'lik BSA çözeltisinden yüklenen jelden salımın diğerleriyle karşılaştırıldığında oldukça düşük yüzdeye sahip oluşudur. 3 mg/ml'lik BSA ile yüklenen jelden salım yaklaşık %92, toz formunda bulunan BSA ile çapraz bağlama yöntemi ile yüklenen jelden salım yaklaşık %85 ve BSA çözeltisi kullanılarak çapraz bağlama yöntemi ile yüklenen jelden salım yaklaşık %48'dir. Salım sonuçlarının matematiksel analizinde n , K , R^2 değerleri hesaplanmış ve salımın Fick yasasına uymadığı gözlenmiştir.
- In-vitro koşullarda emdirme yönteminin uygulanması için %10'luk 5-FU çözeltisi kullanılmıştır. Ortalama yüklenen miktar UV spektrofotometresi ile 22.36 mg/g kuru hidrojel olarak belirlenmiştir. Salımını 160 saatte tamamlayan jel, yüklenen 5-FU miktarının yaklaşık %75'ini salmıştır.

- In-vivo ortamda sıçanlar ile yapılan çalışmalarda, etken maddenin tayini için, HPLC cihazının UV dedektörü kullanılmıştır. Jele, 1.2 mg 5-FU, çapraz bağlama yöntemiyle yüklenmiş ve hayvana kas içi enjeksiyonla verilmiştir. Kontrol için aynı miktarda (1.2 mg) 5-FU jele yükleme yapılmadan, hayvana kas içi enjeksiyonla verilmiştir. Hayvandan 61 saat boyunca 5-FU salımı izlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan sıçandan yaklaşık 5 µg 5-FU salınırken, ilaç yüklü jelden salım yaklaşık 0.27 µg olarak saptanmıştır.
- 5-FU'nun in-vivo ortamda salımı tamamlandıktan sonra dokular üzerinde histolojik çalışma yapılmıştır. Sonuç olarak, deney gurubundaki histolojik kesitleri kontrol gurubu ile karşılaştırdığımızda anormal bir oluşum veya aktivite gözlenmemiştir.

Tüm bu çalışmaların ışığında incelenmesi kararlaştırılan ve fiziksel yöntemlerle sentezlenen kitosan-GP doğal polimeri; kolay sentezi, karakterizasyonu ve amaca yönelik sergilediği sol-jel geçişi (viskozite değişimi) ile avantajlı konumdadır. Sistem in-vitro ortamda hem küçük molekül ağırlıklı ajanların, hem de makromoleküler (protein bazlı) yapıların yüksek oranda ve uzun peryotta salımını sağlamaktadır. In-vivo çalışmalar sonucunda beklenen biyoyumluluğu ve kolay kontrolü de diğer sistemlere göre üstünlüklerindendir.

6. EKLER

EK 1.

Şişme Kinetik Çalışmaları ile İlgili Veriler

Zaman (dakika)	Ws (g)			
	D1 (Wo=0.024 g)	D2 (Wo=0.030 g)	D3 (Wo=0.030 g)	D4 (Wo=0.022 g)
0	0	0	0	0
2	0.549817	0.578778	0.75	0.177725
4	0.679423	0.845659	1.04386	0.601212
6	0.979563	1.162915	1.169956	0.754223
10	1.517088	1.703108	1.194079	0.834593
15	1.76675	2.246517	1.258772	0.862413
20	2.144654	1.950697	1.252193	0.901053
30	2.339745	2.192926	1.317982	0.953602
40	2.345203	2.386924	1.337719	1.066429
50	2.553937	2.318328	1.419956	1.176164
60	2.49118	2.499464	1.489035	1.429638
120	2.667171	2.525188	1.653509	1.958223
180	2.648072	2.927117	1.747807	1.928857

Wo=kuru ağırlık (g)

Ws=yaş ağırlık (g)

D1, D2, D3, D4, sırasıyla 0.25 ml, 0.50 ml, 0.75 ml, 1.00 ml hacimlerinde GP tuzu kullanılarak sentezlenmiş kitosan jeller

EK 2.

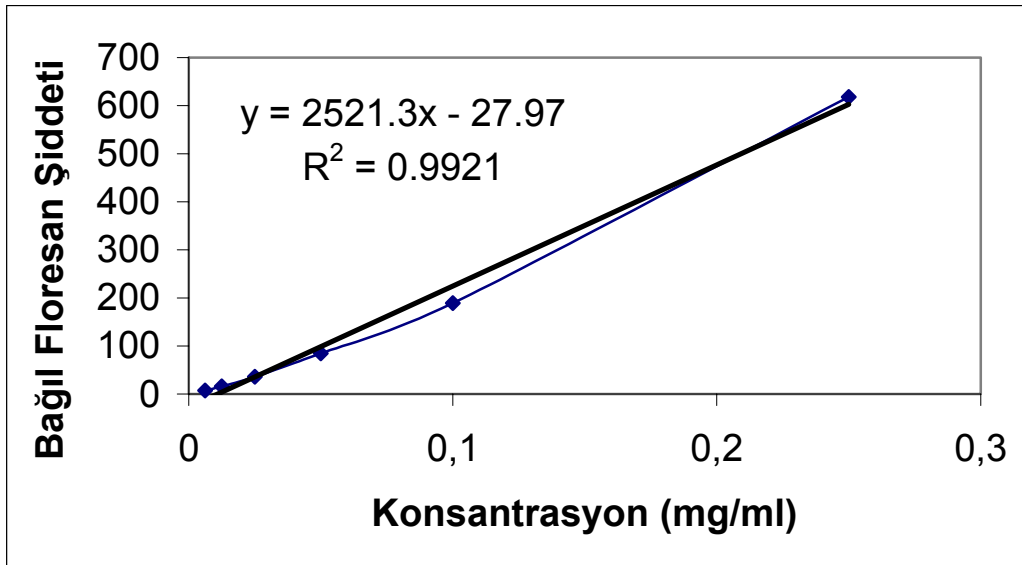
BSA 'nın Kantitatif tayini

BSA yüklü kitosan hidrojellerin PBS (pH=7.4) ortamında saldıkları BSA miktarının belirlenmesi amacıyla floresan spektrofotometresinde hazırlanan BSA kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi aşağıda sunulmuştur.

$\lambda_{uy} = 280 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 342 \text{ nm}$

Slit aralığı=5

BSA Kalibrasyon Grafiği



EK 3.

BSA Yüklü Jellerden Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması

BSA yüklü jellerden kümülatif salım değerlerinin hesaplanması amacıyla yapılan in-vitro salım deneylerinde, salım ortamı belirli aralıklarla taze tampon ile değiştirilerek protein yüklü örnekle salım ortamı arasındaki konsantrasyon farkının sabit tutulması hedeflenmiştir. Örnek olması açısından 3mg/ml BSA çözeltisi kullanılarak emdirme yöntemi ile yüklenen jele ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur.

$$m_{\text{jel}} = 0.0436 \text{ g}$$

$$\text{Rezervuar hacmi} = 15 \text{ ml}$$

$$\text{Yenilenen hacim} = 3 \text{ ml}$$

$$\text{Jele yüklenen miktar} = 0.6818 \text{ mg BSA / g jel}$$

$$t = 30. \text{ saat}$$

$$F_I = 17.542$$

$$C = 0.01805 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Salınan protein miktarı} = 0.01805 \times 15 = 0.27075 \text{ mg}$$

$$\text{Atılan protein miktarı} = 0.331935 \times 3 = 0.06639 \text{ mg}$$

$$\text{Toplam protein miktarı} = 0.27075 + 0.06639 = 0.337151 \text{ mg}$$

$$\text{Salınan BSA miktarı (mg/g kuru jel)} = 0.337151/0.0436 = 7.732819$$

Çizelge EK 3.1'de, 3mg/ml BSA derişiminde emdirme yöntemiyle yüklenen jellerden salım verileri verilmiştir.

Çizelge EK 3.1.

T(saat)	FI	C(mg/ml)	Salınan BSA (mg)	Atilan BSA (mg)	Toplam BSA (mg)	Salınan BSA (mg/g hidrojel)
0	0	0	0	-	0	0.000
0,5	9.821	0.015	0.225	-	0.225	5.157
1	13.596	0.016	0.247	-	0.247	5.672
2	15.069	0.017	0.256	-	0.256	5.873
3	19.354	0.019	0.282	-	0.282	6.457
5	21.349	0.020	0.293	-	0.293	6.730
7	22.546	0.020	0.301	-	0.301	6.893
24	27.146	0.022	0.328	-	0.328	7.521
26	27.824	0.022	0.332	-	0.332	7.613
Tampon yenileme (3 ml)						
28	15.741	0.017	0.260	0.066	0.326	7.487
30	17.542	0.018	0.271	-	0.337	7.733
48	23.166	0.020	0.304	-	0.371	8.500
50	24.657	0.021	0.313	-	0.379	8.704
52	26.165	0.021	0.322	-	0.388	8.909
54	31.067	0.023	0.351	-	0.418	9.578
Tampon yenileme (3 ml)						
72	25.123	0.021	0.316	0.070	0.453	10.379
76	25.589	0.021	0.319	-	0.455	10.442
78	26.058	0.021	0.321	-	0.458	10.506
96	32.143	0.024	0.358	-	0.494	11.337
Tampon yenileme (3 ml)						
99	23.854	0.021	0.308	0.072	0.516	11.846
103	25.512	0.021	0.318	-	0.526	12.072
149	32.846	0.024	0.362	-	0.570	13.073
Tampon yenileme (3 ml)						

151	26.354	0.022	0.323	0.072	0.604	13.847
173	31.298	0.024	0.353	-	0.633	14.521
175	31.954	0.024	0.357	-	0.637	14.611
177	33.058	0.024	0.363	-	0.644	14.761
Tampon yenileme (3 ml)						
179	26.211	0.021	0.322	0.073	0.619	14.202
199	30.128	0.023	0.346	-	0.643	14.737
201	30.254	0.023	0.346	-	0.643	14.754
203	31.213	0.023	0.352	-	0.649	14.885
205	32.549	0.024	0.360	-	0.657	15.067
223	32.155	0.024	0.358	-	0.655	15.013
Tampon yenileme (3 ml)						
225	27.452	0.022	0.330	0.072	0.754	17.303
247	29.627	0.023	0.343	-	0.767	17.600
249	30.098	0.023	0.345	-	0.770	17.664
Tampon yenileme (3 ml)						
251	24.998	0.021	0.315	0.069	0.809	18.553
253	25.652	0.021	0.319	-	0.813	18.642
255	26.124	0.021	0.322	-	0.816	18.706
321	33.196	0.024	0.364	-	0.858	19.671
Tampon yenileme (3 ml)						
323	26.342	0.022	0.323	0.073	0.890	20.405
325	26.542	0.022	0.324	-	0.891	20.432
328	27.341	0.022	0.329	-	0.896	20.542
345	30.843	0.023	0.350	-	0.916	21.019
348	32.095	0.024	0.357	-	0.924	21.190
350	32.659	0.024	0.361	-	0.927	21.267
Tampon yenileme (3 ml)						
369	26.653	0.022	0.337	0.072	0.694	15.927
371	26.876	0.022	0.326	-	0.684	15.685

373	26.147	0.021	0.322	-	0.680	15.585
375	26.649	0.022	0.325	-	0.682	15.654
393	29.157	0.023	0.340	-	0.697	15.996
395	30.989	0.023	0.351	-	0.708	16.246
398	31.254	0.023	0.352	-	0.710	16.282
Tampon yenileme (3 ml)						
400	25.121	0.021	0.316	0.070	1.025	23.509
418	26.501	0.022	0.324	-	1.033	23.698
420	26.259	0.022	0.323	-	1.032	23.665

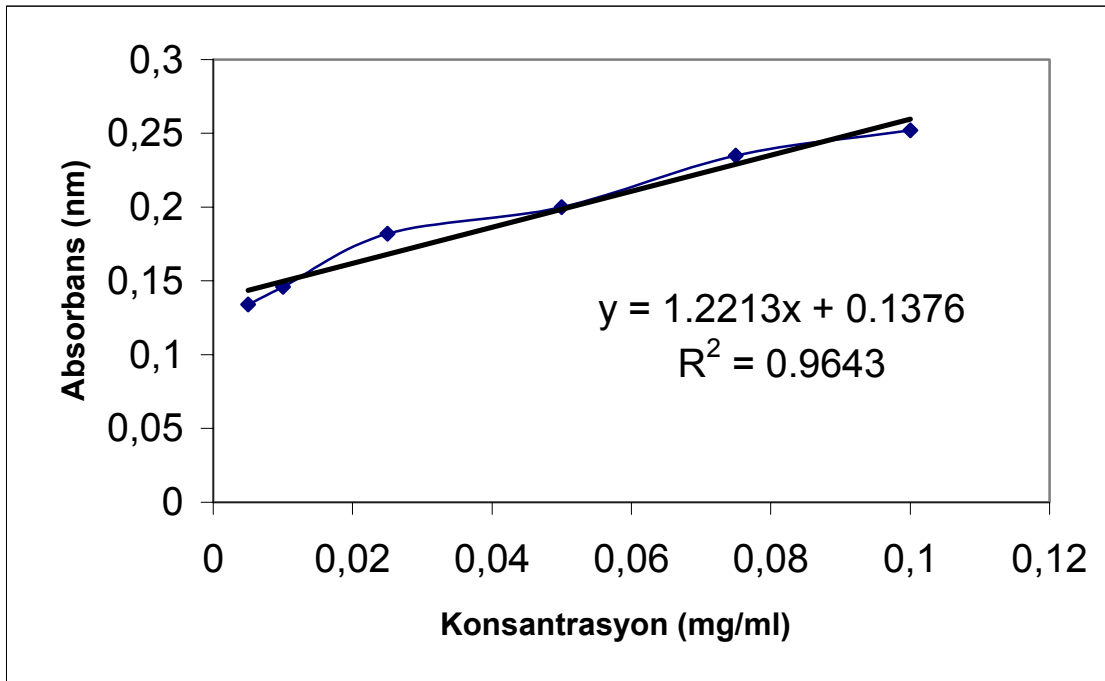
EK 4.

In-Vitro Koşulda 5-FU Kantitatif Tayini

5-FU yüklü kitosan hidrojellerin in-vitro ortamda saldıkları 5-FU miktarının belirlenmesi amacıyla UV-vis spektrofotometrede hazırlanan 5-FU kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi aşağıda sunulmuştur.

$\lambda = 281 \text{ nm}$

5-FU için In-vitro Koşullarda Kalibrasyon Grafiği



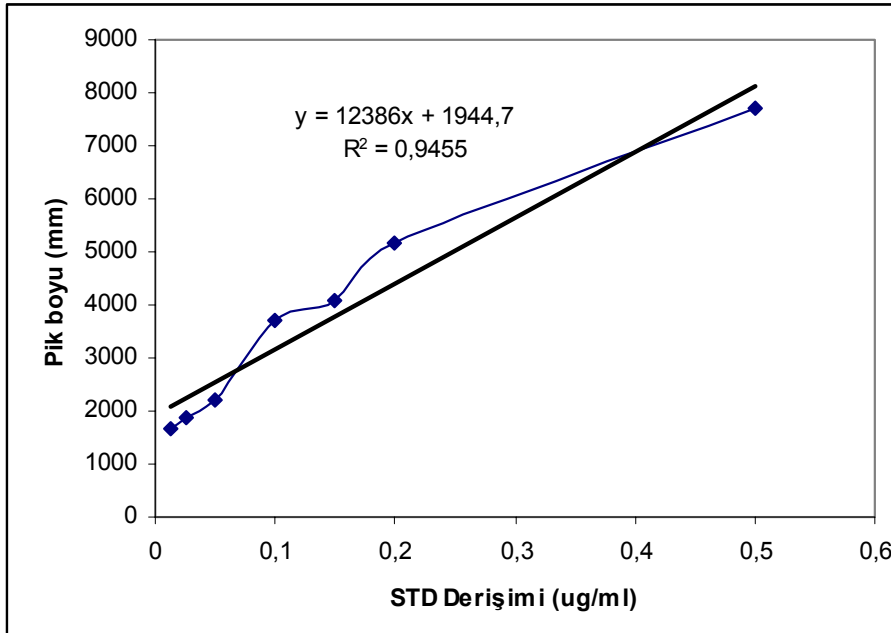
EK 5.

In-Vivo Ortamda 5-FU Tayini

5-FU yüklü kitosan hidrojellerin in-vivo ortamda saldıkları 5-FU miktarının belirlenmesi amacıyla HPLC ile hazırlanan 5-FU kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi aşağıda sunulmuştur.

$\lambda = 265 \text{ nm}$

5-FU için In-vivo Ortamda Kalibrasyon Grafiği



EK 6.

5-FU Yüklü Jellerden In-vitro Ortamda Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması

5-FU yüklü jellerden kümülatif salım değerlerinin hesaplanması amacıyla yapılan in-vitro salım deneylerinde, salım ortamı belirli aralıklarla taze tampon ile değiştirilerek, örnekle salım ortamı arasındaki konsantrasyon farkının sabit tutulması hedeflenmiştir. 5-FU çözeltisi kullanılarak emdirme yöntemi ile yüklenen jele ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur.

$$m_{\text{jel}} = 0.0239 \text{ g}$$

$$\text{Rezervuar hacmi} = 15 \text{ ml}$$

$$\text{Yenilenen hacim} = 3 \text{ ml}$$

$$t = 114. \text{ saat}$$

$$A = 1.472$$

$$C = 0.722 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Salınan 5-FU miktarı} = 0.722 \times 15 = 10.825 \text{ mg}$$

$$\text{Atılan 5-FU miktarı} = 0.742 \times 3 = 2.165 \text{ mg}$$

$$\text{Toplam 5-FU miktarı} = 10.825 + 2.165 + 2.012 = 15.002 \text{ mg}$$

$$\text{Salınan 5-FU miktarı (mg/g kuru jel)} = 15.002/0.0239 = 627.701$$

Çizelge EK 6.1’de, 5-FU ile yüklenen jellerden salım verileri verilmiştir.

Çizelge EK 6.1.

t (saat)	A	C(mg/ml)	Salınan İlaç (mg)	Atılan İlaç (mg)	Toplam İlaç (mg)	Salınan 5-FU mg/g hidrojel
0	0	0	0	0	0	0
0	1.232	0.595	8.927		8.927	373.50
0.5	1.230	0.594	8.911		8.911	372.84
1	1.240	0.599	8.990		8.990	376.15
3	1.267	0.614	9.204		8.204	343.25
23	1.375	0.671	10.058		10.058	420.84
tampon yenileme (3ml)						
25	1.279	0.620	9.299	2.012	11.310	473.23
27	1.295	0.628	9.425		11.437	478.53
48	1.342	0.653	9.797		11.809	494.08
51	1.379	0.673	10.09		12.101	506.33
64	1.430	0.700	10.493		12.505	523.21
75	1.492	0.732	10.984		12.995	543.73
77	1.398	0.683	10.240		12.252	512.62
88	1.498	0.735	11.031		13.043	545.72
93	1.511	0.742	11.134		13.146	550.02
tampon yenileme (3ml)						
114	1.472	0.722	10.825	2.165	15.002	627.70
116	1.511	0.742	11.134		15.311	640.61
118	1.530	0.752	11.284		15.461	646.9
124	1.542	0.759	11.379		15.556	650.87
140	1.547	0.761	11.419		15.595	652.53
148	1.690	0.837	12.550		16.727	699.86
tampon yenileme (3ml)						
160	1.613	0.796	11.941	2.51	18.479	773.18
163	1.597	0.788	11.814		18.352	767.88
166	1.618	0.799	11.980		18.518	774.83

EK 7.

5-FU Yüklü Jellerden In-vivo Ortamda Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması

5-FU yüklü jellerden kümülatif salım değerlerinin hesaplanması amacıyla yapılan in-vivo salım deneylerine ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur

t = 1.0inci saat

Pik boyu, h = 6012 mm

$C = (h-1944.7)/12386 = 0.32838 \mu\text{g/ml}$

$m = 0.1457 \times 0.25 = 0.082095 \mu\text{g}$

Kümülatif salım = $0.082208 + 0.082095 = 0.164303 \mu\text{g}$

Jele yükleme yapılmadan sıçana verilen 5-FU salım sonuçları ile jel ile birlikte sıçana verilen 5-FU salım sonuçları sırasıyla Çizelge EK 7.1.a ve Çizelge 7.1.b'de verilmiştir.

Çizelge EK 7.1.a.

t (saat)	h (mm)	C ($\mu\text{g/ml}$)	m (μg)	Küm Salım (μg)
0.5	91381	7.220757	1.805189	12.42413
1.0	90556	7.154150	1.788537	14.21267
1.5	85333	6.732464	1.683116	15.89578
2.0	77906	6.132835	1.533209	17.42899
3.0	64965	5.088027	1.272007	18.70100
19.0	43874	3.385217	0.846304	19.54730
27.0	20808	1.522953	0.380738	19.92804
43.0	26512	1.983473	0.495868	20.42391
51.0	97780	0.632432	0.158108	20.58202

Çizelge EK 7.1.b.

t (saat)	h (mm)	C ($\mu\text{g/ml}$)	m (μg)	Küm Salım (μg)
0.5	6018	0.328863	0.082216	0.082208
1.0	6012	0.328379	0.082095	0.164303
1.5	5405	0.279372	0.069843	0.234146
2.0	5258	0.267504	0.066876	0.301022
3.0	4068	0.171427	0.042857	0.343878
19.0	3772	0.147529	0.036882	0.380761
27.0	2240	0.023841	0.00596	0.391565
43.0	2325	0.023841	0.007676	0.399241
51.0	1965	0.001639	0.00041	0.394807

EK 8.

In-vivo Deneyler için Alınan Etik Kurul Onayı



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU

Hacettepe 06100, ANKARA

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/

07.04.2005

DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 07.04.2005 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2005/4
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2005/23
KARAR NUMARASI : 2005/23 - 11
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Arş.Gör. Aylin Gürpınar, Arş.Gör. Aysun Sezgin.
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : Wistar Albino Sıçan (.....25..... adet)

Üniversitemiz Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioglu' nun araştırma yürüttüğü olduğu, 2005/23, kayıt numaralı ve **"Biyoparçalanır ve Enjekte Edilebilir Polimerik İlaç Salım Sistemlerinden Kitosan Bazlı Hidrojel Üzerine Yüklü 5-FU'nun İn-Vitro ve İn-Vivo Salım Kinetiğinin ve Biyoparçalanabilirliğinin Test Edilmesi"** konulu araştırma deney protokolü Hayvan Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma; Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına karar verilmiştir.

Prof. Dr. Atilla Dağdeviren (Başkan)

Prof. Dr. Sevim Dalkara

(Üye)

Prof. Dr. Hakan Orer

(Üye)

Prof. Dr. Sema Çalış

(Üye)

Prof. Dr. Erdem Aydın

(Üye)

Prof. Dr. Ömer Görduysus

(Üye)

Doç. Dr. Murat Er

(Üye)

KATILMADI

Doç. Dr. Ahmet Alanay

(Üye)

Doç. Dr. Mehmet Ali Onur

(Üye)

Dr. V. H. İlyas Onbaşlar

(Üye)

Avukat Oya Soyuer

(Üye)

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

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

Başkan: Prof. Dr. Zakir RZAYEV

Üye Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU (Danışman)

Üye Prof. Dr. Mehlika PULAT

ONAY

Bu tez .../.../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../2006

Prof. Dr. Ahmet ÖZDURAL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agi, P., 2003, Kitosan bazlı affinite membranlar: üretim, karakterizasyon ve protein saflaştırılmasında kullanımı, Hacettepe Üni., Yüksek lisans tezi
- Antonsen, K.,P., Nobeshima, Y., Hoffman, A., S., 1993, Biomat. Art. Cells&Immob. Biotech., 21, 1-12
- Bhardwaj, R., Blanchard, J., 1996, Controlled release delivery system for the α -MSH analog melanotan-I using Poloxamer 407, J. Pharm. Sci., 85, 915–919
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Gurny, R., 2004, Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications, Europ. J. Pharm. Biopharm., 57, 35-52
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Gurny, R., Peppas, N. A., 2004, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications., Europ. J. Pharm. Biopharm., 57, 19-34
- Bhattarai N, Ramay R., H., Gunn J., Matsen F., A., Zhang M., 2005, PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release, J.Control Rel., 103, 609-624
- Brannon, L., Peppas, N. A., 1991, Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels, Chem. Eng. Sci., 46, 715-722
- Brazel, C. S., Peppas, N. A., 2000, Modelling of drug release from swellable polymers, Europ. J. Pharm. Biopharm., 49, 47-58
- Bromberg, L. E., Ron E. S., 1998, Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery, Adv. Drug Del. Rev., 31, 197-221
- Casale, F., Canaparo, R., Muntoni, E., Serpe, L., Zara, G. P., Pepa, C., Berno, E., Costa, M., Eandi, M., 2002, Simultaneous HPLC determination of 5-FU and its metabolites in plasma of cancer patients, Biomed. Chromatogr., 16, 446-452

Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., ve ark, 2000, Novel injectable neutral solutions from biodegradable gels in-situ, *Biomaterials*, 21, 2155-2161

Chung J., H., Go D., H., Bae J., W., Jung I., K., Lee J., W., Park., K., D., 2005 Synthesis and characterization of Pluronic grafted chitosan as a novel injectable biomaterial, *Current App. Phys.*, 5, 485-488

Crompton, K. E., ve ark., 2005, Morphology and gelation of thermosensitive chitosan hydrogels, *Biophysical Chemistry*, 117, 43 – 49

Darwis, H. N., Hardiningsih, 1993, Poly(n-vinyl pyrrolidone) hydrogels, *Radiation Phys and Chem.*, 42, 907-914

European Pharmacopia, 2005, volume-1-volume-2

Ficek, B. J., Peppas, N. A., 1993, Novel preparation of poly(vinyl alcohol) microparticles without crosslinking agent for controlled drug delivery of proteins, *J. Control Rel.*, 27, 259-268

Fults, K. A., Johnston, T. P., 1989, Sustained release of urease from a Poloxamer gel matrix, *J. Parent. Sci. Technol*, 44, 58–65

Guenet, J. M., 1992, Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers, *J. Control Rel.*, 18, 47-53

Handbook of Biochemistry and Molecular Biology

Hatton, T. A., Alexandridis, P., 1995, Poly(ethylene oxide)---poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloids and Surf. A:Phy. and Eng. Aspects*, 96, 1-46

Heller, J., Zignani, M., Anderson, J., Gurny, R., 2000, A poly(ortho ester) designed for combined ocular delivery of dexamethasone sodium phosphate and 5-fluorouracil: subconjunctival tolerance and in vitro release, *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 251-255

Hennink, W.E., Van Nostrum, C.F., 2002, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, 13-36

Higgs, P. G., Simon, B. Ross-Murphy, 1990, Creep measurements on gelatin gels, *Int. J. Biolog. Mac. Mol.*, 12:4, 233-240

Hoffman, A. S., 1997, Intelligent polymers, *Control. Drug Del. Challenge and Strate*, 485-497

Jeong, B., Kim, S. W., Bae, Y. H., 2002, Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels, *Adv. Drug Del. Rev.*, 54, 37-51

Jeong, B., Choi, Y. H., Zentner, G., Kim, S. W., 1999, New biodegradable polymer for injectable drug delivery systems, *J. Control Rel.*, 62, 109-114

Jeong, B., Kim, S. W., 1997, Biodegradable block copolymers as injectable drug delivery systems, *Nature*, 388, 860-862

Johnston, T. P., Punjabi, M. A., Froelich, C. J., 1992 Sustained delivery of interleukin-2 from a Poloxamer 407 gel matrix following intraperitoneal injection in mice, *Pharm. Res*, 9, 425–434.

Kabra, B. G., Akhtar, M. K., Gehrke, S. H., 1992, Volume change kinetics of temperature-sensitive poly(vinyl methyl ether) gel, *Polymer*, 33, 990-995

Kim, S.W., Feil, J.H., Bae, Y.H., 1992 Mutual influence of pH and temperature on the swelling of ionizable and thermosensitive hydrogels, *Macromolecules*, 25, 5528–5530.

Kesgin D., 2002, pH'ya Duyarlı Poli (vinil eter) Bazlı Amfifilik Hidrojellerden Protein Salım Kinetiğinin İncelenmesi, Hacettepe Üni., Yüksek Mühendislik Tezi

Krajewska, B., 2005, Membrane-based processes performed with use of chitin-chitosan materials, *Separation&Purification Tech.*, 41, 305-312

Kumar, R., Majeti, N. V., 2000, A review of chitin and chitosan applications, *Reac.&Func. Poly.*, 46, 1-27

Langer, R., 1976, Controlled release of bioactive agents, Trends in Biotech., 2, 47-51

Lee, J. W., Jung, M. C., Park, H. D., Park, K. D., Ryu, G. H., 2004, Synthesis and characterization of thermosensitive chitosan copolymer as a novel biomaterial, J. of Biomat. Sci. 15, 1065-1079

Lin, H. R., Sung, K. C., 2000, Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery, J. Control Rel., 69, 379-388

Maeda, Y., Higuchi, T., Ikeda, I., 2000, Langmuir, Change in hydration state during the coil-globule transition of aqueous solutions of poly(*N*-isopropylacrylamide) as evidenced by FTIR spectroscopy, 16, 7503-7509

Mısırlı Dımitrios, 2005, Development of a novel Drug delivery systems based on polymeric, thermoresponsive, hydrogel nanoparticles, Patras Üni., Yunanistan, Doktora tezi

Miyazaki, S., Ohkawa, Y., Takada M., Attwood, D., 1992, Antitumor effect of Pluronic F-127 gel containing mitomycin C on sarcoma-180 ascites tumor in mice, Chem. Pharm. Bull, 40, 2224-2226

Mucha, M., Pawlak, A., 2005, Thermal analysis of chitosan and its blends, Thermoch. Acta, 427, 69-76

Park, K., Park, H., 1999, Smart hydrogels, Poly. Mater. Ency., 1476-1478

Patil, N. S., Dordich, J. S., Rethwisch, P. G., 1996, Biomaterials, 17, 2343-2350

Peppas, N. A., 2004, Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery, Int. J. of Pharm., 227, 11-17

Peppas, N. A., 2000, Drug release from swelling controlled systems, J. of Control Rel., 183-210

Peppas, N. A., 1999, Recent studies and molecular analysis of drug release from swelling controlled devices, STP Pharma. Sci. 473-485

Peppas, N. A., Wu, D., 1993, Bioresponsive drug delivery systems, *Biomed Appl.*, 3, 36

Peppas, N.A., 1989, Modelling the complex sequence of sol-gel processing reactions, *Amer. Ceram. Soc.*, 91, 342

Peppas, N. A., Korsmeyer, R. W., Lustig, S. R., 1987, Solute and penetrant diffusion in swellable polymers, *J. Appl. Poly. Sci.*, 33, 533-549

Peppas, N. A., 1983, Porous structure of polymeric biomaterials, *Poly. News*, 8, 330-331

Ritger, P. L., Peppas, N. A., 1987, A simple equation for description of solute release I: Fickian and non-Fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders and discs, *J. of Control Rel.*, 5, 23-42

Ruel E., Gariepy, J., Leroux C., 2004, In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems, *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 58, 409–426

Schild, H. G., 1992, Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and applications, *Prog. Poly. Sci.*, 163-249

Tabata, Y., 2000, The importance of drug delivery systems in tissue engineering, *PSST*, 3, 80-89

Tharanathan, R. N., Kittur, F. S., Prashanth, K. V. H., 2002, Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions, *Carboh. Poly.*, 50, 27-33

Topp, M. D. C., Dijkstra, P. J., Talsma, H., Feijen, J., 1997, *Macromolecules*, 30, 8518-8520

Vogelson, T. C., Barron, A. R., 2001, *J. of Non-crys. Solids*, 290, 216-223

Wanka, G., Hoffmann, H., Ulbricht, W., 1990 The aggregation behavior of poly(oxyethylene)–poly(oxypropylene)–poly(oxyethylene) block copolymers in aqueous solution. *Colloid Polym. Sci.* 268, 101-117

Wu, J.C., Peppas, N. A., 1991, A model for coupled deformation and mass transport processes in polymers, Amer. Phys. Soc., 36, 482

Yong, Q., Kinam, P., 2001, Environmentally-sensitive polymer hydrogels, J. Adv. Drug Del. Rev., 53, 321-339

Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., 1995, Comb-type grafted hydrogels with rapid deswelling response to temperature changes, Nature, 374, 240-242

Yu, H., Grainger, D. W., 1993, Thermo-Sensitive swelling behavior in crosslinked *N*-isopropylacrylamide networks: cationic, anionic, and ampholytic hydrogels, J. Appl. Poly. Sci., 49, 1553-1563

Zareie, H. M., Bulmus, V. E., Gunning, A. P., Morris, V. J., Hoffman, A. S., Piskin, E., 2000, Investigation of a stimuli-responsive copolymer by atomic force microscopy, Polymer, 41, 6723-6727

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra ÖZDEMİR

Doğum Yeri : Kayseri

Doğum Tarihi :02/01/1980

Medeni Hali :Bekar

İş Tecrübesi (2005-2006) Abdi İbrahim İlaç Sanayi
Hadımköy/İSTANBUL

Eğitim

Yüksek lisans (2003-2006) : Hacettepe Üniversitesi
Kimya Mühendisliği

Lisans (1999-2003) : Hacettepe Üniversitesi
Kimya Mühendisliği (İngilizce)
Hacettepe Üniversitesi
Yabancı diller Yüksek Okulu
İngilizce Hazırlık

Lise (1995-1998) : Kayseri Sümer Lisesi

Yabancı Dil : İngilizce