

**ANTİRETROVİRAL İLAÇ BASKILANMIŞ POLİMERİK
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE NAZAL SALINIM
SİSTEMLERDE KULLANILMASI**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
ANTIRETROVIRAL DRUG IMPRINTED POLYMERIC
NANOPARTICLES AS NASAL RELEASE SYSTEMS**

CANSUN ARIKAN

PROF. DR. NİLAY BERELİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023



*“İlkelerinden bir gün bile şaşmadığım,
Türkiye Cumhuriyeti’nin kurucusu
Ulu Önder **Mustafa Kemal ATATÜRK**’e ithafen...”*

ÖZET

ANTİRETROVİRAL İLAÇ BASKILANMIŞ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE NAZAL SALINIM SİSTEMLERDE KULLANILMASI

Cansun ARIKAN

Yüksek Lisans, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilay BERELİ

Nisan 2023, 82 sayfa

Moleküler baskılanmış polimerlerin stereospesifik tanımaya sahip olmaları gibi üstün özellikleri, onların son zamanlarda ilaç salınımı gibi biyomedikal uygulamalarda da kullanılmalarını gündeme getirmiştir.

Nazal kontrollü salım sistemleri, terapötik etkiyi optimum dozda, doğru zamanda ve doğru yerde kullanarak ilacı hedef dokuya iletmeye dayanan etkin bir tedavi yöntemidir. Nazal salınım sistemi ile ilaç iletimi, hafif asidik pH derecesine sahip olması ve bu bölgede enzimatik aktivitenin düşük olması sebebiyle avantajlı bir yöntemdir. Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan biyomalzemeler, doğal veya sentetik olarak elde edilebilen polimerik sistemlerdir ve her geçen gün çeşitleri artmaktadır. Bu sistemlerden birisi de nanopartiküllerdir. Nanopartiküller üstün özellikleri sayesinde birçok çalışmada biyomalzeme olarak kullanılmaktadır. Hidrofilik nanopartiküller, mukozanın yapışkanlığından dolayı, istenen moleküllerin nazal yolla salınımında önemli rol oynar.

Mukozaya yapışan nanopartikül sistemleri, mukozaya güçlü bir şekilde bağlandıkları ve musinin viskozitesini artırdıkları için mukozal absorpsiyonu iyileştirir. Böylelikle nazal mukosiliyer klirens oranını önemli ölçüde azaltırlar ve böylece formülasyonun burun boşluğunda kalma süresini uzatırlar.

Bu doğrultuda, tez kapsamında RTV baskılanmış nanopartiküllerin sentezlenerek nazal salınım sistemlerinde kullanılması hedeflenmiştir. Tezin ilk aşamasında, MATrp- RTV kompleksi oluşturulmuş ve mini-emülsiyon polimerizasyonu ile RTV baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartikülleri sentezlenmiştir. Ayrıca baskılanmamış nanopartiküller, kalıp molekül Ritonavir olmadan sentezlenmiştir. Tezin ikinci aşamasında, FTIR, SEM, Zeta Boyut Analizi ve yüzey alanı hesaplamaları yardımı ile sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Zeta boyut analizi sonucunda Ritonavir (RTV) baskılanmış nanopartiküllerin ortalama boyutu 88.46 nm'dir ve polidispersitesi 0.279 olarak ölçülmüştür. MIP nanopartikülün spesifik yüzey alanı 628.34 m²/g olarak bulunmuştur. Tezin üçüncü aşamasında, in vitro koşullarda Ritonavirin salımı üzerine çalışmalar gerçekleştirilmiş ve UV spektrofotometre kullanılarak salınan RTV miktarı belirlenmiştir. pH, sıcaklık ve derişim parametrelerinin ilaç salım davranışlarına etkileri gözlemlenmiştir. Yapılan salım çalışması kinetik olarak incelenmiştir ve ilaç salımının Korsmeyer-Peppas yasasına uyan bir salım olduğu ve kontrollü salım için uygun olduğu belirlenmiştir. Tezin son bölümünde ise, sitotoksosite çalışmalarında yapılan analizlerin (MTT testi) sonucunda, sentezlenen nanopartiküllerin canlı hücrelerde herhangi bir sitotoksosite göstermediği görülmüştür. Bu çalışma, RTV baskılanmış nanopartiküllerin nazal salınım sistemlerinde kullanımı için hızlı, hassas ve kontrollü bir analiz yöntemi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Antiretroviral ilaç, Ritonavir, Nanopartikül, Moleküler baskılanmış nanopartiküller, Kontrollü ilaç salımı, Nazal salınım.

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIRETROVIRAL DRUG IMPRINTED POLYMERIC NANOPARTICLES AS NASAL RELEASE SYSTEMS

Cansun ARIKAN

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Nilay BERELİ

April 2023, 82 pages

The superior properties of molecularly imprinted polymers, such as stereospecific recognition, have recently brought their use in biomedical applications such as drug release.

Nasal controlled release systems are an effective treatment method based on delivering the drug to the target tissue by using the therapeutic effect at the optimum dose, at the right time and at the right place. Drug delivery via the nasal release system is an advantageous method because of its slightly acidic pH and low enzymatic activity in this region. Biomaterials used in the preparation of controlled release systems are polymeric systems that can be obtained naturally or synthetically and their varieties are increasing day by day. One of these systems is nanoparticles. Thanks to their superior properties, nanoparticles are used as biomaterials in many studies.

Due to the adhesiveness of the mucosa, hydrophilic nanoparticles play an important role in the nasal release of desired molecules. Mucoadhesive nanoparticle systems improve mucosal absorption as they bind strongly to the mucosa and increase the viscosity of mucin. Thus, they significantly reduce the nasal mucociliary clearance rate and thus prolong the residence time of the formulation in the nasal cavity.

In this direction, it is aimed to synthesize RTV-imprinted nanoparticles and use them in nasal release systems within the scope of the thesis. In the first stage of the thesis, MATrp-RTV complex was formed and RTV imprinted poly(HEMA-MATrp) nanoparticles were synthesized by mini-emulsion polymerization. In addition, non-imprinted nanoparticles were synthesized without the template molecule Ritonavir. In the second stage of the thesis, the characterization of the synthesized nanoparticles was carried out with the help of FTIR, SEM, Zeta Size Analysis and surface area calculations. As a result of Zeta size analysis, the average size of Ritonavir (RTV) imprinted nanoparticles was 88.46 nm and its polydispersity was measured as 0.279. The specific surface area of the MIP nanoparticle was found to be 628.34 m²/g. In the third stage of the thesis, studies on the release of Ritonavir under in vitro conditions were carried out and the amount of RTV released was determined using UV spectrophotometer. The effects of pH, temperature and concentration parameters on drug release behavior were observed. The release study was kinetically examined and it was determined that the drug release is a release that complies with the Korsmeyer-Peppas law and is suitable for controlled release. In the last part of the thesis, as a result of the analyzes performed in cytotoxicity studies (MTT test), it was observed that the synthesized nanoparticles did not show any cytotoxicity in living cells. This study demonstrated that RTV imprinted nanoparticles are a fast, sensitive and controlled analysis method for the use of nasal release systems.

Keywords: Antiretroviral drug, Ritonavir, Nanoparticle, Molecular imprinting nanoparticles, Controlled drug release, Nasal release.

TEŞEKKÜR

*Engin tecrübelerinden feyz aldığım, bilgi birikimiyle çalışmalarına yön veren değerli hocam **Prof. Dr. Adil Denizli**'ye,*

*Yüksek lisans sürecim boyunca bilimsel katkılarıyla yoluma ışık tutan, anlayışı ve güzel kalbiyle manevi olarak her daim yanımda hissettiğim, enerjisi ve güler yüzüyle bana motivasyon kaynağı olan çok sevgili hocam ve tez danışmanım **Prof. Dr. Nilay Bereli**'ye,*

*Öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum, pozitif enerjisi ve desteğiyle yanımda olan sevgili hocam **Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz**'e,*

*Yüksek lisans sürecimde kendisini tanıma fırsatı bulduğum, yaşadığım her zorlukta yanımda olan, tez çalışmalarındaki en büyük destekçim, neşesiyle enerjimi yükselten canım hocam **Arş.Gör.Merve Çalışır**'a,*

*Lisans öğreniminden bu yana birlikte koşturduğumuz, yüksek lisans sürecimde de dostluğunu ve yardımlarını eksik etmeyen bölüm arkadaşım **Muhammed Erkek**'e,*

*Liseden bu yana iyi ve kötü günlerimdeki en büyük desteğim olan, pozitifliğini ve temiz kalbini her daim hissettiğim canım arkadaşım **Elifnur Benhür**'e,*

*Yüksek lisansa başlamamdaki itici güçlerden biri olan, fikirlerimi paylaşmaktan ve tartışmaktan keyif aldığım, desteğini her an hissettiren sevgili dayım **Cumhur Ceyhan**'a,*

*Beni yetiştiren, bugünlere gelmemde büyük emeği olan, bana inanan, sevgisini ve desteğini esirgemeyen birtanecik annem **Sevgi Arıkan** ve canım babam **Kemal Arıkan**'a,*

*Tüm zorlukların üstesinden gelmemi sağlayan, düştüğümde elimden tutan, ağladığımda güldüren, iyi ve kötü tüm duygularla yaşadığım bu hayatı gerçek kılan, her gün beni bir üst versiyonuma ulaşabilmem için motive eden **canım kendime**,*

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Antiviral İlaçlar	3
2.1.1. Ritonavir	7
2.1.2. Nazal Spreyler.....	8
2.2. Nanoteknoloji.....	9
2.2.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları.....	9
2.3. Nanopartiküller	11
2.3.1. Nanopartikül Hazırlama Yöntemi.....	11
2.3.2. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları	12
2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	13
2.4.1. Moleküler Baskılama Tekniği	16
2.4.1.1. Kalıp (Hedef) Molekül.....	17
2.4.1.2. Fonksiyonel Monomerler.....	18
2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar.....	19
2.4.1.4. Çözücüler	20
2.4.1.5. Başlatıcılar	21
2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	22
2.4.2.1. Kovalent Baskılama	22
2.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama	23
2.4.2.3. Metal-Şelat Etkileşimlerinin Oluşturduğu Moleküler Baskılama	24
2.4.3. Moleküler Baskılama Tekniğinin Uygulamaları	24
2.5. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri	25

2.5.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması	26
2.5.2. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması	28
2.5.3. İlaç Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi	30
2.5.3.1. Sıfır Derece Modeli	31
2.5.3.2. Birinci Derece Modeli	31
2.5.3.3. Higuchi Modeli	32
2.5.3.4. Korsmeyer-Peppas Modeli	32
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	34
3.1. Kimyasal Malzemeler	34
3.2. Yöntem.....	34
3.2.1. N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) Fonksiyonel Monomerinin Sentezlenmesi	35
3.2.2. MATrp-RTV Ön Kompleksinin Hazırlanması	36
3.2.3. RTV Baskılanmış ve Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) Nanopartiküllerin Hazırlanması	36
3.2.4. RTV Baskılanmış Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	38
3.2.4.1. FTIR ile Yapı Analizi	38
3.2.4.2. Zeta Boyut Analizi.....	38
3.2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi	39
3.2.4.4. Yüzey Alanı	39
3.2.5. İn vitro Salım Çalışmaları.....	40
3.2.6. Sitotoksosite.....	42
3.2.6.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	42
3.2.6.2. Sitotoksosite Analizleri (MTT Testi).....	42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	43
4.1. RTV Baskılanmış poli(HEMA-MATrp) Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu	43
4.1.1. FTIR Çalışmaları	44
4.1.2. Yüzey Morfolojisi.....	45
4.1.3. Zeta Boyut Analizi.....	46

4.1.4. MIP Nanopartikülün Spesifik Yüzey Alanı.....	48
4.2. RTV in vitro Salım Çalışmaları	48
4.2.1. Yüklenen İlaç Derişiminin RTV Salımına Etkisi	49
4.2.2. pH'ın RTV Salımına Etkisi.....	50
4.2.3. Sıcaklığın RTV Salımına Etkisi.....	51
4.3. Sentezlenen RTV Yüklü Nanopartiküllerin Salım Kinetiklerinin İncelenmesi...	51
4.4. Sitotoksisite Analizleri.....	56
5. YORUM.....	67
6. KAYNAKLAR	70
EKLER.....	81
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. HIV virüsünün yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarında kullanılan ilaçlar ve bu ilaçların geliştirildiği yıllar	6
Şekil 2. 2. Ritonavirin moleküler yapısı.	7
Şekil 2. 3. Nanoteknoloji ürünlerinin üretim kategorilerine göre dağılımı	9
Şekil 2. 4. Nanopartikül hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi.	12
Şekil 2. 5. Moleküler baskılama yönteminin şematize edilerek gösterilmesi.....	14
Şekil 2. 6. Moleküler baskılanmış polimerler ile ilgili yayın sayısının yıllara göre dağılımı (2017-2023)	16
Şekil 2. 7. Moleküler baskılanmış polimer için hazırlık prosedürü.....	17
Şekil 2. 8. Moleküler baskılama yönteminde yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler.....	19
Şekil 2. 9. Moleküler baskılama yönteminde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar.....	20
Şekil 2. 10. Moleküler baskılama yönteminde yaygın olarak kullanılan başlatıcılar.....	21
Şekil 2. 11. Kovalent baskılama yöntemi.	22
Şekil 2. 12. Kovalent olmayan baskılama yöntemi.	23
Şekil 2. 13. Nanopartiküllerde kullanılan ilaç salım mekanizması.....	27
Şekil 2. 14. Moleküler baskılamanın ilaç salım sistemlerinde kullanımını içeren yayınların yıllara göre dağılımı.....	29
Şekil 2. 15. Moleküler baskılanmış bir taşıyıcı kullanılarak hedeflenen ilaç salımı.	29
Şekil 2. 16. Moleküler baskılanmış polimerlerin ilaç salım sistemlerinde kullanımının avantajları.....	30
Şekil 3. 1. MATrp monomerinin sentez tepkimesi.....	35
Şekil 3. 2. RTV baskılanmış polimerik nanopartikül (MIP) sentezinin şematik gösterimi.....	37
Şekil 3. 3. A) Homojenizatör (T10, Ika Labortechnik, Almanya), B) Polimerizasyon reaktörü (Radleys Carousel 6, UK), C) Ultrasantrifüj (Beckman Coulter Optima L-100K).	37
Şekil 3. 4. Nano Zeta Sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere).	38
Şekil 3. 5. RTV in vitro salım düzeneğinin şematik gösterimi.....	41

Şekil 3. 6. A) Çalkalamalı etüv (Edmund Bühler TH-30/SM30, Almanya), B) UV-VIS spektrofotometre (UV-1240, Shimadzu, Japonya).	41
Şekil 4. 1. N-Metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) kimyasal yapısı.....	43
Şekil 4. 2. MATrp'ın sentez tepkimesinin mekanizması.....	44
Şekil 4. 3. RTV ilacı ve NIP, MIP nanopartiküllerine ait FTIR spektrumu.	45
Şekil 4. 4. RTV baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin SEM görüntüleri....	46
Şekil 4. 5. MIP nanopartiküllerin Zeta boyut dağılımı grafiği.	46
Şekil 4. 6. NIP nanopartiküllerin Zeta boyut dağılımı grafiği.	47
Şekil 4. 7. RTV baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartikülün hacim-kütle grafiği. ..	48
Şekil 4. 8. RTV çözeltisine ait kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 4. 9. Yüklenen ilaç (RTV) derişiminin RTV salımına etkisi (37°C, pH 5.5).	50
Şekil 4. 10. pH değerinin RTV salımına etkisi (25°C, 1 mg/mL RTV).	50
Şekil 4. 11. Sıcaklığın RTV salımına etkisi (pH 5.5, 1 mg/mL RTV).	51
Şekil 4. 12. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 0.2 mg/mL).....	52
Şekil 4. 13. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 0.5 mg/mL).....	53
Şekil 4. 14. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 1.0 mg/mL).....	53
Şekil 4. 15. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 1.5 mg/mL).....	54
Şekil 4. 16. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 2.0 mg/mL).....	54
Şekil 4. 17. RTV, NIP ve MIP nanopartikülleri ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş L929 hücrelerinin % canlılık analizlerine ait grafik.....	57
Şekil 4. 18. Ritonavir'e ait hücre canlılığı görüntüleri.	58
Şekil 4. 18. Ritonavir'e ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).....	59
Şekil 4. 18. Ritonavir'e ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).....	60
Şekil 4. 19. Ritonavir baskılanmış nanopartiküle (MIP) ait hücre canlılığı görüntüleri.....	61
Şekil 4. 19. Ritonavir baskılanmış nanopartiküle (MIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).....	62

Şekil 4. 19. Ritonavir baskılanmış nanopartiküle (MIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).....	63
Şekil 4. 20. Ritonavir baskılanmamış nanopartiküle (NIP) ait hücre canlılığı görüntüleri.....	64
Şekil 4. 20. Ritonavir baskılanmamış nanopartiküle (NIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).....	65
Şekil 4. 20. Ritonavir baskılanmamış nanopartiküle (NIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).....	66



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantajları ve dezavantajları	26
Çizelge 2. 2. Farklı geometrilerdeki polimerik matrislerden aktif ajanların salım modelleri.....	33
Çizelge 4. 1. MIP ve NIP nanopartiküllere ait partikül çapı ve polidispersite sonuçları.....	47
Çizelge 4. 2. RTV yüklü nanopartiküllere ait kinetik analiz sonuçları.....	55
Çizelge 4. 3. Küresel formdaki nanopartiküller için Korsmeyer-Peppas denkleminde bulunan n değerine göre salım mekanizmaları.	55



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

N	1 mL süspansiyondaki nanopartikül sayısı
S	% katı
d	çap (μm)
ρ_s	polimer yoğunluğu (g/mL)
Q_t	t anında salınan ilaç miktarı
Q_0	başlangıç anında bulunan ilaç miktarı
k	salım hız sabiti
A	ilaç taşıyıcıya ait yüzey alanı
C	matris içerisindeki başlangıç ilaç derişimi
C_s	matris içerisindeki ilacın çözünürlüğü
D	matris içerisindeki ilacın difüzyon katsayısı
M_t	t anında salınan ilaç miktarı
M_∞	∞ zamanda salınacak ilaç miktarı
M_t/M_∞	t anında salınan ilaç fraksiyonu
n	salım kuvveti

Kısaltmalar

RTV	Ritonavir
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
HEMA	2-Hidroksietilmetakrilat
PVA	Polivinil alkol
APS	Amonyum persülfat
MATrp	N-metakriloil-L-triptofan
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi
UV-vis	Ultraviyole- görünür ışık spektrofotometresi
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
NIP	Baskılanmamış polimer

1. GİRİŞ

İnsan immün yetmezlik virüsü hastalarının tedavisinde, antiretroviral ilaç tedavisi temel bir rol oynar. Ritonavir (RTV), günümüzde HIV antiretroviral terapisi için kullanılan ve yaygın olarak reçete edilen bir proteaz inhibitörüdür. HIV-1 enfeksiyonunun gelişmesi için şart olan poliproteinleri HIV-1 işlevsel proteinlerine parçalama işlemini yapan proteazları inhibe ederek fonksiyon gösterir [1].

Moleküler baskılanmış polimerlerin stereospesifik tanımaya sahip olmaları gibi üstün özellikleri, onların son zamanlarda ilaç salınımı gibi biyomedikal uygulamalarda da kullanılmalarını gündeme getirmiştir [2].

Kontrollü ilaç salımı, ilaçların belli bir süre boyunca yavaş yavaş salınmasıyla etki sürelerinin uzatılması veya dozajın kontrollü bir şekilde sağlanması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. İlacı tek bir büyük doz halinde uygulamak minimum toksik dozun aşılmasına dolayısıyla zehirlenmeye bağlı yan etkilere neden olurken birçok küçük doz halinde uygulamakta kandaki ilaç seviyesinde dalgalanmalara ve terapötik etkinin azalmasına sebep olabilir. Bu sebeple düşük dozlu frekanslarla kontrollü bir şekilde ilaç salımı yapan ilaç taşıyıcıları geliştirmek için yürütülen araştırmalara talep giderek artmaktadır [3].

Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller, $100 \text{ nm} \geq$ boyutlara sahiptir. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan nanopartiküllere olan ilginin artmasının başlıca nedeni, maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılarından farklı olarak normalin dışında özellikler ve işlevsellik göstermesidir. Nanopartiküllerin, geniş yüzey alanı, mekanik güç, optik aktiflik ve kimyasal reaktiflik gibi birçok eşsiz özelliği vardır. Bu özellikler nanopartikülleri çeşitli uygulamalar için elverişli hale getirir.

Nazal yol ile ilaç uygulanması sıklıkla tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Ayrıca burun boşluğu nazal mukozanın altındaki zengin damar yatağını örten gözenekli endotel yapısının sağladığı ilaç emme kapasitesi sayesinde sistemik ilaç taşınması için ümit vaat eden bir yoldur [4]. Nazal yol ile ilaç uygulaması sindirim sistemine göre daha avantajlıdır çünkü sindirim sisteminin aksine, hafif asidik pH derecesine sahiptir ve bu bölgede enzimatik aktivite düşüktür. Aynı zamanda nazal yol damardan ilaç uygulamasına da iyi bir alternatif oluşturur [5].

Nazal spreylerin tam verimlilikle kullanılabilmesi için ilacın burun boşluğunun belirli kısımlarına ulaştırılması gerekir. Nazal boşluklarda başarılı bir şekilde tutunmayı sağlamak için tipik nazal epitel boyutları 30-120 mikron arasındır [6]. Ritonavir ve Lopinavir gibi ilaçların, nazal salım sistemlerinde kullanılmak üzere çözünürlükleri ve geçirgenlikleri artırılarak, nano süspansiyonları yapılabilir [7].

Tez çalışması kapsamında ilk kez, Ritonavir baskılanmış nanopartiküllerin nazal salınım sistemlerinde kullanımı gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması; RTV baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu, in vitro koşullarda RTV salımı, salım kinetiğinin incelenmesi ve sitotoksite analizlerini içermektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antiviral İlaçlar

Virüsler dünya tarihinde uzun zamandan beri var olan, insanları, hayvanları ve bitkileri hücresel seviyede etkileyerek ele geçirdikleri organizmanın bedenini üremek için kullanan, her yerde bulunan parazitlerdir. Virüsler, muhtemelen gezegen üzerinde en yaygın olarak bulunan varlıklardır. Bağımsız hareket kabiliyetleri olmadığı için ele geçirdikleri canlıyı yayılmak amacıyla kullanırlar ve neredeyse her türden canlıyı enfekte edebilirler. Basit yapıda olmalarına karşın iyi şekilde kamufle olurlar ve olağanüstü bir hızda çoğalırlar.

Virüsler çoğalmak için ele geçirdikleri hücreyi iki şekilde kullanabilir. Bunlardan ilki, viral DNA moleküllerini konak genomundan ayrı olarak konak hücre membranı parçalayana kadar çoğalttıkları litik döngüdür. Diğeri ise, viral DNA moleküllerini konak genomunun arasına ekledikleri lizojenik döngüdür. Konak canlılar virüslerden korunma mekanizmaları geliştirdikçe virüsler de bu mekanizmalardan kurtulacak şekilde evrilmişlerdir. Virüsler ribozoma sahip olmadıklarından kendi proteinlerini üretemezler. Bu sebeple konak canlıının hücresel mekanizmalarını oluşmalarını ve üremelerini sağlayacak olan kendi proteinlerini üretecek mRNA moleküllerini oluşturmak için kullanırlar. Viral genomlar tek sarmallı yahut çift sarmallı yapıdadır. Çift sarmallı virüsler DNA virüsü olarak adlandırılırken, tek sarmallılar RNA virüsü ya da retrovirüs olarak adlandırılır. Viral genom, kapsit adında bir protein kılıf tarafından nükleazlardan korunur. Bu kılıf aynı zamanda konak hücrenin reseptörlerine bağlanmaya da yardım eder. Bazı virüsler aynı zamanda kinazlar, RNA polimerazlar, ters transkriptazlar gibi üremeleri ve kılıfları için gereken başka temel proteinleri de içerirler. Virüsler, konak organizmanın vücuduna girdiklerinde mukoza ve dolaşım yoluyla hareket ederek çeşitli nörolojik yollar ile yayılırlar. Sonrasında, konak hücrelerin membranlarında bulunan reseptörlere bağlanarak kapsit ve diğer proteinlerini hücre içine aktarırlar. Çoğu DNA virüsünün genetik materyallerini çoğaltmak için hücre çekirdeğine ulaşması gerekirken, RNA virüsleri bu işlemi çoğunlukla sitozolde gerçekleştirebilir. Hedefi enfekte edebilmek amacıyla virüslerin çok aşamalı bir giriş mekanizması vardır. Bu giriş mekanizması temel olarak konak hücre yüzeyine bağlanma, endositoz ve çekirdeğe ulaşma aşamalarından oluşmaktadır [8]. Antiviral ilaçlar viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Virüslerin yaşam döngüsünü kırmak için çeşitli mekanizmalar kullanırlar.

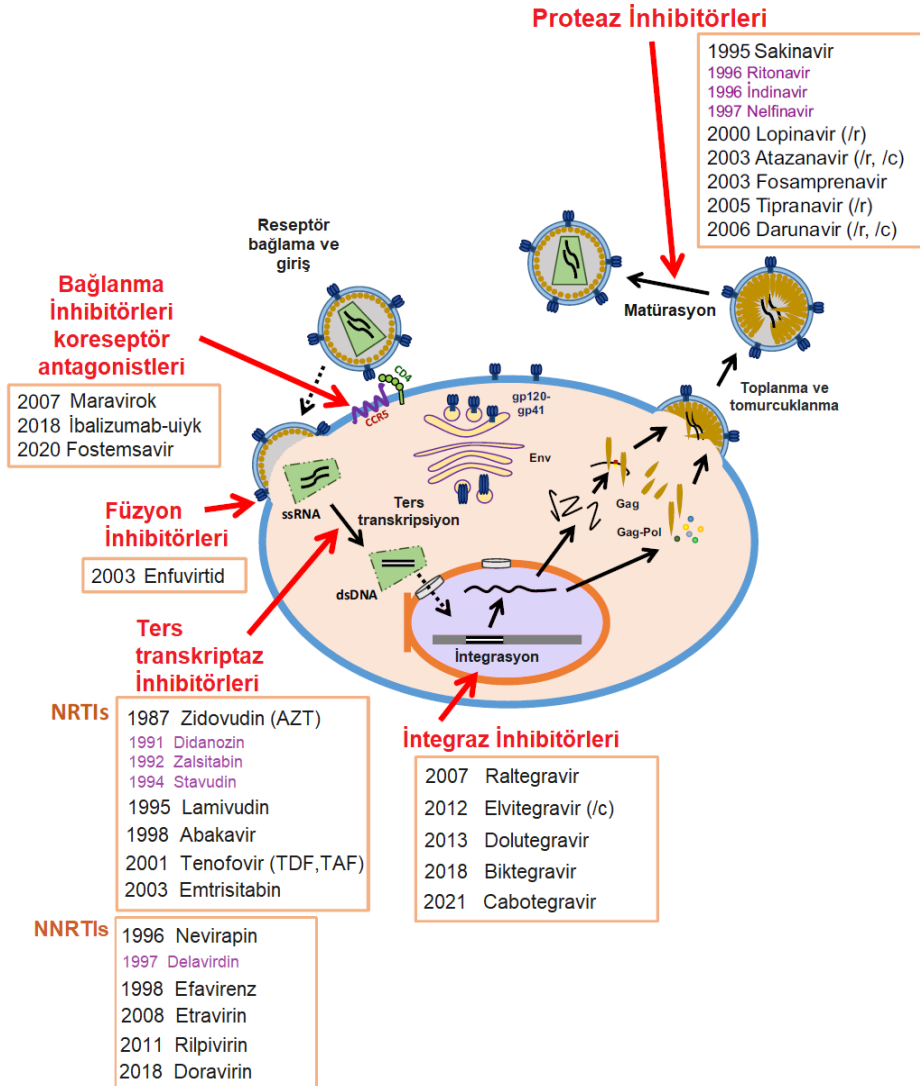
İlk antiviral ilaç olan İdoksüridin 1963 yılında onaylanmıştır. Antiviraller çoğunlukla özel bir virüsü hedeflese de geniş spektrumlu antiviraller de yaygındır. Antiviraller, çoğu antibiyotiğin aksine, hedefini yok etmekten çok işlevini engellemeyi amaçlar. Virüsler çoğalmak için konak hücreleri kullandığından konak hücrelere zarar vermeden virüslerle savaşmak için güvenli ve verimli bir yol bulmak zordur. Bu sebeple insan kullanımı için onaylanmış az sayıda antiviral ilaç mevcuttur. Antiviral ilaçların kullandığı iki hedefleme yaklaşımı vardır. Virüsleri direkt olarak hedef alabilirler ya da konak hücreleri hedefleyebilirler. Virüsleri direkt olarak hedefleyen antiviral ilaçların temel olarak kullandıkları çeşitli yollar vardır; virüsün girişini engellemek, viral içeriğin salınımını engellemek, viral protein üretimini engellemek ve viral genetik materyal üretimini engellemek bunlardan bazılarıdır. Virüsün konağa girişini engelleyen antiviraller virüsün konak hücreye karışmasını önleyerek viral döngüyü ilk aşamasında durdurur ve enfeksiyonun önüne geçerler. Viral içeriğin salınımını önleyen ilaçlar, temel olarak viral yüzeye bağlanarak açılmasını engellerler. Viral protein üretimini önleyen ilaçlar viral proteinlerinin oluşması için gerekli parçalama işlemlerini yapan proteazları engelleyerek fonksiyon gösterirler. Viral genetik materyal üretimini engelleyen ilaçlar ise genellikle transkriptaz faaliyetlerini, viral genomun çoğalmasını sağlayan polimerazları ve viral genomun konak genomuna eklenmesini sağlayan integrazları bloklama işlevine sahiptir. 2010 yılında en çok kullanılan antiviraller proteaz, viral DNA polimeraz ve integraz inhibitörleri olarak listelenmişlerdir [9].

AIDS hastalığının ilk kez raporlandığı 1981 yılından beri, antiviral ilaç araştırmalarının odağında en çok yer alan konulardan biri şüphesiz HIV enfeksiyonudur. HIV (human immunodeficiency viruses), insanları enfekte eden lentivirüslerin iki türünün genel ismidir. Bu viral enfeksiyon, tehditlere karşı savaşacak olan bağışıklık sisteminin çökmesine yol açan edinsel bağışıklık yetmezliği sendromuna, dolayısıyla hayati tehlike taşıyan enfeksiyon ve kanser gibi durumların oluşmasına, neden olur [10]. Aynı zamanda HIV enfeksiyonunun merkezi sinir sistemini etkileyen özgün nörolojik belirtileri de vardır. Beyne ulaşması durumunda HIV enfeksiyonu bireyin yaşamı sonlanana kadar orada kalır. Virüs beyne direkt olarak ulaştığında nörolojik, motor ve bilişsel bozukluklara sebep olan HIV ilişkili demansa (HAD) yol açar [7]. HIV bir retrovirüs olduğundan tedavisi için yapılan çalışmalar antiretroviral terapinin temellerinin oluşmasını sağlamıştır. Antiretroviral ilaçlar HIV ve diğer retrovirüslerin yol açtığı enfeksiyonlarla savaşmak için kullanılırlar.

HIV virüsünün hayat döngüsü yedi aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama virüsün konak hücreye bağlanmasıdır. Füzyon olarak adlandırılan ikinci aşama, virüsün içeriğini konak hücreye aktarmasıdır. Üçüncü aşamada virüs ters transkriptaz enzimini kullanarak kendi tek sarmallı RNA moleküllerini konak genomuna uygun çift sarmallı DNA molekülüne çevirir, dördüncü aşamada ise integras enzimini serbest bırakarak kendi genetik materyalini konak genomuna ekler. Beşinci aşamada virüs konağı kullanarak HIV proteinleri üretmeye başlar. Altıncı aşamada konak hücrede oluşturulan protein kılıflar ve viral RNA birleşerek olgunlaşmamış HIV virüsünü oluşturur. Son aşamada ise, yeni oluşan HIV virüsleri konak membrandan tomurcuklanarak ayrılırlar. Sonrasında virüsler içerdikleri proteazları kullanarak içerdikleri uzun protein zincirlerini kırarlar ve enfekte hale gelirler.

Antiretroviral ilaçların da viral enfeksiyonlarla savaşmak için antiviral ilaçlara benzerlik gösteren çeşitli yöntemleri vardır. Bu yöntemler HIV virüsünün hayat döngüsünün farklı aşamalarını hedef alırlar. Antiretroviral ilaçlar, proteaz inhibitörleri, füzyon inhibitörleri, integras inhibitörleri, bağlanma inhibitörleri ve ters transkriptaz inhibitörleri olmak üzere beş ayrı grupta incelenebilirler. Proteaz inhibitörleri, virüsün çoğalması için gereken proteaz aktivitesini durdurur. Proteaz inhibitörler, ters transkriptaz inhibitörlerinden sonra, en kalabalık antiretroviral ilaç grubunu oluşturur. Bu grupta bulunan ilaçlar farklı işlevlere sahip proteazları inhibe ederek enfeksiyonu farklı şekillerde önlerler. Örneğin, Sakinavir virüs yaşam döngüsünün son aşamasında uzun protein zincirlerini keserek aktif hale getiren proteazları inhibe ederek virüslerin enfekte olmayan şekilde kalmasını sağlar. Füzyon inhibitörleri, virüs protein kılıfının hücre zarı ile entegre olmasını engeller. İntegras inhibitörleri, viral DNA molekülünün konak genomuna entegre olmasını engeller. Bağlanma inhibitörleri virüsün glikoproteinlerine yahut konak hücre reseptörlerine bağlanarak virüsün konak hücrenin membranına bağlanmasını engellerler. Enfuvirtid ve Maravirok bu ilaçların onaylanmış örnekleridir. Enfuvirtid HIV-1 tedavisinde kullanılır ve virüsün konak membranına bağlanmasını sağlayan gp41 proteinine bağlanarak onu inhibe eder. Maravirok ise, CCR5 hücre reseptörüne bağlanarak HIV-1 virüsünün bağlanmasını engelleyerek antagonist işlev gösterir. Maravirok, konak hücre proteinini hedeflemesi açısından antiretroviral ilaçlar arasında eşsizdir. Onaylanmış antiretroviral ilaçların yarısından fazlası ters transkriptaz inhibitörleridir. Bu moleküller viral RNA moleküllerinin çift sarmallı DNA molekülüne dönüşümünü engellerler. HIV-1 ters transkriptaz enzimi 51 ve 66 kDa büyüklüğünde iki alt parçadan oluşur. Büyük parça DNA polimeraz ve ribonükleaz için katalitik tarafı oluşturur.

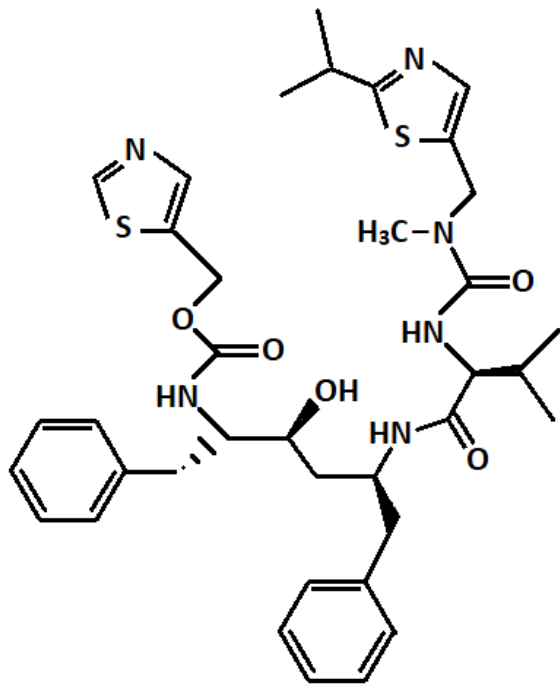
Ters transkriptaz polimerizasyon için DNA ya da RNA moleküllerini kullanabilir. Ters transkripsiyonu önlemek için iki yaklaşım vardır. İlki, NRTIs, nükleozit analogları kullanmaktır. Nükleozit analogları polimerizasyon sırasında yeni oluşturulan DNA zincirine eklendiğinde 3'OH ucundan yoksun olduklarından yeni bir nükleozitin bağlanmasını engelleyerek polimerizasyonu bloklarlar. Diğer yaklaşımda ise inhibitör molekül, NNRTIs, direkt olarak transkriptaza bağlanarak onu işlevsiz hale getirir (Şekil 2.1) [11].



Şekil 2. 1. HIV virüsünün yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarında kullanılan ilaçlar ve bu ilaçların geliştirildiği yıllar [11].

2.1.1. Ritonavir

Kimyasal olarak 1,3-tiazol-5-ilmetil N-[(2S,3S,5S)-3-hidroksi-5-[(2S)-3-metil-2{[metil ({[2-(propan-2-yl)-1,3tiyazolil]metil})karbamoyl]amino}bütanamido]-1,6-difenilhekzan -2-yl]karbamat'tır. Ritonavir'in (RTV) moleküler ağırlığı ve moleküler formülü sırasıyla 720.946 ve $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$ 'dir (Şekil 2.2) [12]. RTV, günümüzde HIV antiretroviral terapisi için kullanılan peptidomimetik HIV-1 ve HIV-2 proteaz inhibitörüdür. HIV-1 enfeksiyonunun gelişmesi için şart olan poliproteinleri HIV-1 işlevsel proteinlerine parçalama işlemini yapan proteazları inhibe ederek fonksiyon gösterir, böylece enfekte olmayan HIV proteinlerinin üretimine sebep olur. Ancak RTV benzeri proteaz inhibitörü (PI) ilaçlar, serum, hepatik trigliseritler, vücut yağ dokusu ve adipokin seviyeleri üzerinde etkili olarak hasta metabolizmaları üzerindeki kilo kaybı ve bilişsel becerilerde azalma gibi negatif değişimlerde rol oynamaktadırlar. Bu etkiler doz bağımlıdır [1,13].



Şekil 2. 2. Ritonavirin moleküler yapısı.

RTV, biyolojik yarı ömrü 3 ila 5 saat olan büyük peptit benzeri bir lipofilik moleküldür, sulu çözeltide oldukça yavaş bir çözünme hızına sahiptir ve metabolizması temel olarak karaciğerde gerçekleşmektedir. Düşük çözünürlüğü ve büyük boyutu sebebiyle ağızdan emilimi zor ve dolayısıyla oral biyoyararlanımı düşüktür.

RTV amorf hali ile kristalin fazından on kat daha fazla çözünürlüğe sahiptir fakat amorf fazındayken de sulu çözeltide kristalize olduğu ve jel oluşturduğu için çözünürlük hızı düşüktür. Bağırsakta ise orta derecede geçirgenliğe sahiptir. Düşük çözünürlüğü ve geçirgenliğinden dolayı Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi tarafından dördüncü sınıf bir ilaç olarak tanımlanmıştır. Toksisitesi düşük bir polietiler bileşiği olan polietilen glikol 8000 (PEG) ile hazırlanan katı dispersiyonunun çözünürlük hızı daha yüksektir. RTV oral yolla uygulandığında en çok miktarda olanı M2 olmak üzere, M1, M2 ve M11 gibi oksidatif ürünlere metabolize edilmektedir. RTV sitokrom p45-3A4 ve 2D6 tarafından metabolize edilir [1,14,15].

2.1.2. Nazal Spreyler

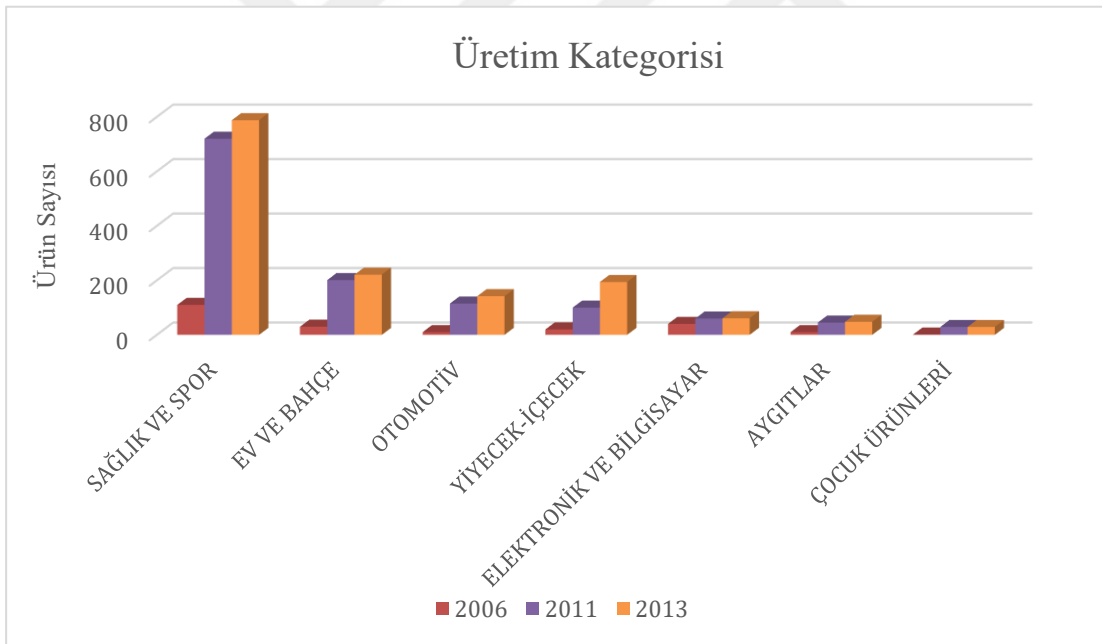
Nazal yol ile ilaç uygulanması, sinüzit, alerjik rinit, nazal polipler ve migren gibi rahatsızlıklar için sıklıkla tercih edilen bir tedavi yöntemidir. Ayrıca burun boşluğu nazal mukozanın altındaki zengin damar yatağını örten gözenekli endotel yapısının sağladığı ilaç emme kapasitesi sayesinde sistemik ilaç taşınması için ümit vaat eden bir yoldur. Buna ek olarak, burun boşluğunun yukarısında yer alan koku siniri merkezi sinir sistemine ulaşmak için potansiyel bir yoldur. Bu şekilde ilaç koku siniri aracılığıyla beyne ulaştırılabilir. Bu yol daha düşük dozda ilaç kullanımını ve nörolojik hastalıkların tedavisi için olası bir fırsattır [4]. Nazal yol ile ilaç uygulaması sindirim sistemine göre daha avantajlıdır çünkü sindirim sisteminin aksine, hafif asidik pH derecesine sahiptir ve bu bölgede enzimatik aktivite düşüktür. Aynı zamanda nazal yol damardan ilaç uygulamasına da iyi bir alternatif oluşturur [5]. Nazal spreylerin tam verimlilikle kullanılabilmesi için ilacın burun boşluğunun belirli kısımlarına ulaştırılması gerekir. Burun spreynin uygulamadaki açısı ve ilacın taşıma tekniği burun eti civarında oluşan nazal birikimi etkiler. Nazal boşluklarda başarılı bir şekilde tutunmayı sağlamak için tipik nazal epitel boyutları 30-120 mikron arasındadır [6]. Spreyden çıkan aerosolün yayılma açısı genişledikçe ilaç birikimi ve ilaç uygulama tekniğinin etkisi azalır [16]. Ritonavir ve Lopinavir gibi ilaçların nano süspansiyonları, yüzey aktif maddelerin uygulanmasıyla çözünürlükleri ve geçirgenlikleri artırılarak bu nazal boşluktan beyne uzanan yolu kullanmak için yapılabilir [7].

2.2. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, bilim ve mühendisliğin nano ölçekli boyutlarda olan materyal, yapı, cihaz ve sistemler için sundukları tasarım, karakterizasyon, üretim ve uygulamalardır [17]. Nanoteknoloji, biyolojik ve biyolojik olmayan yapıların benzersiz ve yeni işlevsel özellikler sergilediği 100 nm'den küçük boyutlu yapıların karakterizasyonu, tasarımı ve mühendisliği üzerine odaklanır [18].

2.2.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknoloji, son yıllarda birçok alanda önemli bir araştırma alanı haline gelmiştir. Nanoteknoloji ürünleri arasında en fazla ürün sayısına sahip kategori sağlık ve spor ürünleridir, onu ev ve bahçe kategorisi ile, elektronik ve bilgisayar kategorisi takip eder (Şekil 2.3) [19].



Şekil 2. 3. Nanoteknoloji ürünlerinin üretim kategorilerine göre dağılımı [19].

Nanoteknoloji, geleneksel yöntemlerin sınırlarını aşarak, yüksek performanslı malzemelerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Kimya alanında, nanoteknolojinin kullanımı sayesinde daha etkili katalizörler üretilabilmekte ve malzemelerin özellikleri kontrol altında tutulabilmektedir [20].

Nanoteknolojinin gelişmesi, enerji alanında sürdürülebilirliği arttırmak için potansiyel fırsatlar sunmaktadır. Nanoteknoloji, güneş, hidrojen yakıt hücresi, biyoyakıt, enerji depolama ve termoelektrik alanlarında çözümler sunar [21]. Gıda endüstrisinde kullanılan nano materyaller arasında ise nano boyutta yüzey kaplamaları, nano emülsiyonlar, nano kapsülleme sistemleri, nano partiküller, nano sensörler ve nano filmler yer almaktadır [22]. Nanoteknolojinin malzeme biliminde kullanımı, malzemelerin daha hafif, daha dayanıklı, daha esnek ve daha işlevsel hale getirilmesine olanak tanır [23]. Nanoteknolojiden yararlanarak üretilen membranlar, daha etkili bir şekilde suyu arındırabilir ve atık suyu geri dönüştürme sürecini hızlandırabilir. Buna ek olarak, nanoteknoloji, hava filtreleri gibi hava kalitesini iyileştiren teknolojilerde de kullanılır [24].

Nanoteknoloji son yıllarda kimya alanında oldukça önemli bir yere sahip olmuştur. Nanometre boyutundaki malzemeler ve yapılar, özellikle yüzeylerindeki kimyasal ve fiziksel özellikler açısından, geleneksel ölçeklerdeki malzemelerden önemli ölçüde farklılık gösterirler. Nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen nanomalzemeler, kimyasal reaktifler, katalizörler, polimerler ve biyomoleküller gibi birçok alanda kullanılmaktadır [25].

Nanoteknolojinin tıp alanındaki uygulama alanları arasında görüntüleme teknolojileri, tıbbi cihazlar ve ilaç taşıyıcı sistemler yer almaktadır [26]. Nanoteknolojik malzemeler, ilaç taşıma sistemleri, stentler ve kaplama materyalleri olarak kullanılabilir, böylece daha etkili ve daha az invaziv tedavi seçenekleri sunulabilir [17]. Nanoteknolojinin özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanımı giderek artan bir alandır. Nanopartiküller, ilaçları hedeflenen dokulara taşımak ve etkinliğini artırmak için kullanılabilirler. Örneğin, nanopartiküller, kanser hücrelerine doğrudan hedeflenerek, kemoterapinin yan etkilerini azaltmakta ve tedaviye daha fazla etkinlik katmaktadır. Ayrıca, nanoteknoloji bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri, diyabet tedavisinde de kullanılmaktadır. Nanopartiküller, insülinin daha hassas bir şekilde taşınmasını sağlayarak, kan şekeri seviyelerinin daha iyi kontrol edilmesine yardımcı olabilir. Bu alandaki araştırmaların devam etmesiyle, daha da gelişmiş nanoteknoloji bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilebilir ve hastalıkların tedavisinde daha da etkili bir yöntem haline gelebilir [27].

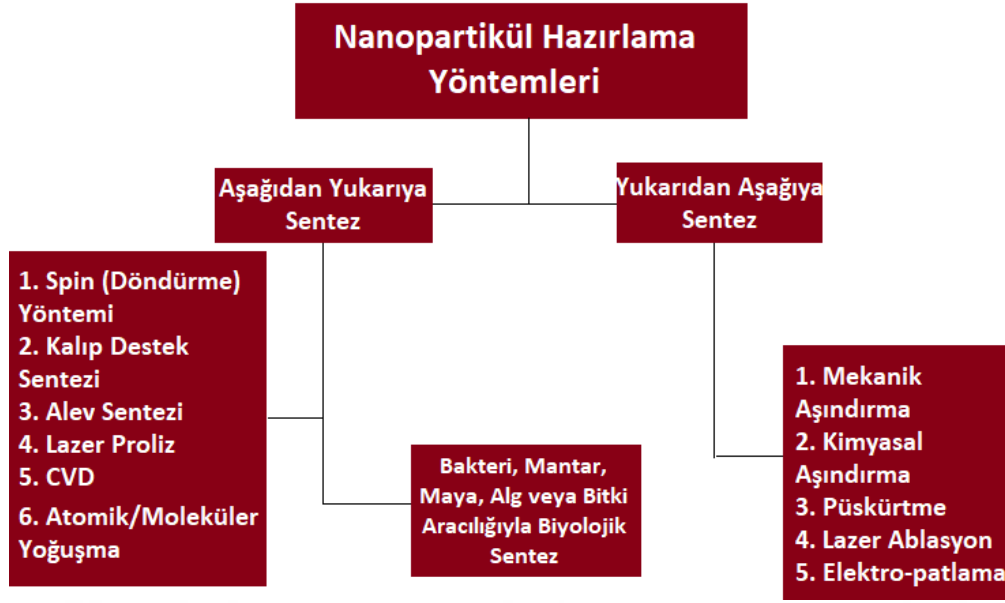
2.3. Nanopartiküller

Nanopartiküller, 10-1000 nm aralığında en az bir boyuta sahip olan katı parçacık veya dispersiyonlar olarak tanımlanır. Nanopartiküller, geniş bir malzeme sınıfından üretilirler. Nanopartiküllerin boyutu, normal boyutlu parçacıklardan binlerce kez daha küçüktür [28]. Bu nedenle, nanopartiküllerin özellikleri ve davranışları, normal boyutlu parçacıklardan oldukça farklıdır. Boyutlarının optik özellikler gibi fizyokimyasal özelliklerini de değiştirebileceğinin fark edilmesiyle, nanopartiküllerin kullanımı ve önemi, son yıllarda hızla artmıştır [29]. Nanopartiküller üç katmandan oluşurlar. Bu üç katman sırasıyla, yüzey, kabuk ve çekirdektir. Yüzey katmanı, metal iyonları, yüzey aktif maddeler ve polimerler gibi çeşitli küçük moleküllerle işlevselleştirilebilir. Kabuk, çekirdekten kimyasal özellikler bakımından tamamen farklı materyallerden yapılır. Çekirdek ise nanopartikülün merkezinde yer alır ve genellikle nanopartikülün kendisi olarak bilinir [30]. Nanopartiküller, morfolojilerine, büyüklüklerine ve kimyasal özelliklerine göre birçok farklı kategoriye ayrılırlar. Kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre nanopartikülleri, karbon bazlı, metal, seramik, yarı iletken, polimerik ve yağ bazlı, olmak üzere altı kategoriye ayırabiliriz. Nanopartiküllerin, geniş yüzey alanı, mekanik güç, optik aktiflik ve kimyasal reaktiflik gibi birçok eşsiz özelliği vardır. Bu özellikler nanopartikülleri çeşitli uygulamalar için elverişli hale getirir [31].

2.3.1. Nanopartikül Hazırlama Yöntemi

Nanopartiküllerin hazırlanması için aşağıdan-yukarı(bottom-up) ve yukarıdan-aşağı(top-down) olmak üzere iki temel yaklaşım kullanılır.

Yukarıdan aşağıya yaklaşımında, büyük moleküllerden başlayarak onları daha küçük birimlere ayırtmak ve elde edilen birimleri uygun nanopartiküllere dönüştürmek amaçlanır. Bu yaklaşım için öğütme ve aşındırma gibi yöntemler kullanılır. Aşağıdan yukarıya yaklaşım ise bunun tam tersidir. Bu yaklaşımda, basit maddelerden sentez yöntemleri ile nanopartiküllerin elde edilmesi amaçlanır. Şekil 2.4'te nanopartikül hazırlama yöntemleri verilmiştir [32].



Şekil 2. 4. Nanopartikül hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi.

2.3.2. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Nanopartiküllerin materyal üretiminde, çevre teknolojilerinde, elektronikte, enerji üretiminde, mekanik endüstrilerde ve tıpta çeşitli uygulamaları vardır. Nanokristalin malzemeler, özellikleri boyuta bağlı olduğundan, materyal bilimine çok ilginç maddeler sunarlar. Üretilen nanopartiküller, tıbbi, ticari ve ekolojik sektörlerde aranan benzersiz elektriksel, mekanik, optik ve görüntüleme özellikleri sergiler. Organik boyar molekülleri ve soy metallerin nanopartiküllerden oluşan rezonant enerji transferi (RET) sistemi, son zamanlarda biyofotoniklerde ve malzeme biliminde önemli ilgi görmektedir.

Nanopartiküllerin ticari olarak kullanılan ürünlerde bulunması giderek yaygın hale gelmektedir. Altın ve gümüş gibi soy metaller de dahil olmak üzere metal nanopartiküller, plazmon rezonansına dayalı olarak görünür bölgede birçok renge sahiptir. Bu, nanopartiküllerin yüzeyindeki elektronların kolektif salınımından kaynaklanan bir durumdur. Rezonans dalga boyu, nanopartiküllerin boyutu ve şekli, parçacık aralığı ve çevreleyen ortamın dielektrik özelliğine bağlı olarak güçlü bir şekilde değişir. Bu soy metal nanopartiküllerin benzersiz plazmon absorpsiyon özellikleri, biyosensörler ve birçok alan da mevcut olmak üzere çeşitli materyal üretimi uygulamalarında kullanılmasını sağlar. Nanopartiküllerin endüstride ve evde kullanımı bu tür maddelerin doğaya salınımına yol açmaktadır.

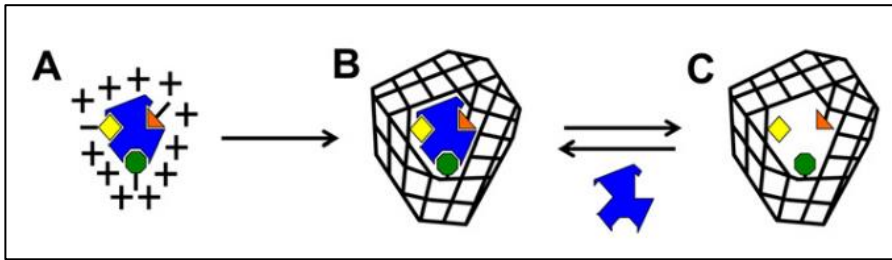
Nanopartiküllerin doğada birikmesinin yol açacağı riskleri kontrol edebilmek için bu parçacıkların hareket kabiliyetini, reaktifliğini, eko-toksisitesini ve kalıcılığını anlamayı gerektirir. Yüksek yüzey kütle oranlarından dolayı nanopartiküller, kontaminantları absorbe ederek azaltma kapasitesine de sahiptirler. Nanopartiküllerin içinde bulunduğu çevre uygulamaları, sürdürülebilir ürünlerin üretilmesini, zararlı maddelerin kontamine ettiği materyallerin iyileştirilmesini ve çevresel olaylar için geliştirilen sensörleri kapsar [33]. Nanopartiküller, eşsiz yapısal, optik ve elektriksel özelliklerinden dolayı yeni nesil elektronik ürünlerin, fotonik materyallerin ve sensörlerin yapısal bloklarını oluştururlar. Nanopartiküllerin sahip oldukları karakteristik özellikler bu yapılarda kolay değiştirilebilirliği ve geri dönülebilir montajlamayı sağlar [34]. Aynı zamanda nanopartiküller, geniş yüzey alanları, optik davranışları ve katalitik doğaları nedeniyle fosil yakıtlara alternatif sürdürülebilir enerji kaynakları arayışında en iyi adaylardandır [35]. Buna ek olarak, nanopartiküller sahip oldukları yüksek gerilim ve yüksek strese dayanıklılık özellikleri ile kaplayıcı, yağlayıcı ve yapıştırıcı olarak mekanik endüstride kullanılabilirler [36]. Nanopartiküller terapötik etkiyi arttıran uygun doz aralığında ilaç taşıma kapasiteleri sayesinde tıbbın her dalından ilgi görmüşlerdir. Geçtiğimiz birkaç on yıl içinde biyolojik olarak parçalanabilir nanopartiküller etkili ilaç taşıma aletleri olarak görülmüşlerdir [37].

2.4. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Genel olarak yaşam süreçlerinin biyo-spesifik moleküler tanıma dayandığı kabul edilir [38]. Moleküler tanıma, yaşamın arkasındaki itici güç olan ve doğada her yerde bulunan temel bir biyolojik mekanizmadır. Bu teknoloji, immün sisteminde antikor/antijen tanıma, enzimatik kataliz, sinyal iletimi gibi etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelerde belirleyici bir rol oynar [39]. Antikorlar, enzimler, nükleik asitler ve hücreler dahil olmak üzere doğal tanıma unsurları, hedeflerine olağanüstü güçlü afinitelerle bağlanmak için hidrofobik etkileşimler, iyonik bağlar, Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağları gibi çoğunlukla kovalent olmayan etkileşimlerden yararlanır [40].

Moleküler tanıma, Emil Fischer'in bir asırdan uzun bir süre önce ilk kez "anahtar-kilit modeli" olarak tanımlamıştır. Bu model, reseptör-substrat kompleks oluşumunu esas alır. Bu kavram, kompleks oluşumunun, kilit ya da reseptör üzerindeki tamamlayıcı fonksiyonel gruplar ile istenen anahtar veya substrat (analit) arasındaki moleküller arası etkileşimlerin sonucu olduğunu ileri sürmektedir [41].

Doğal tanıma elemanlarına dayalı sistemlerin başarılarına rağmen, uzun vadede kimyasal ve fiziksel kararlılığının düşük olmasının yanı sıra, nispeten yüksek maliyete sahip olması ve nitelikli işgücü gerektirmesi, bilim insanlarını bu dezavantajları minimuma indirebilecek alternatif metodlar araştırmaya teşvik etmiştir [42–44]. Son zamanlarda umut vadeden bu yaklaşım, organik polimerlerin bir şablon molekül varlığında çapraz bağlanması yoluyla oluşturulan ve bu ilgili analit için stereo-spesifik bağlanma bölgeleriyle sonuçlanan, tamamen sentetik sistemler olan moleküler baskılı polimerlerdir (MIP'ler) [45–52]. Moleküler baskılama ile ilgili ilk makale 1931'de yayınlanmış olmasına karşın, moleküler baskılama üzerine araştırmalar 1980'li yıllara kadar yapılan araştırma sayısı oldukça düşüktür [53]. 1972'de Wulff ve arkadaşları moleküler baskılama yöntemini açıklamışlardır [54]. Moleküler baskılama tekniği, kalıp molekül yardımıyla makromoleküllerde spesifik tanıma ve katalitik bölgelerin oluşumuna izin verir [55]. Başka bir deyişle, kalıp molekülü tanıma özelliği taşıyan sentetik reseptörler oluşturmaya yarayan bir tekniktir (Şekil 2.5). Sentetik polimerlerin moleküler baskılanması, fonksiyonel monomerin ve bir kalıp molekül görevi gören hedef analitin (baskı molekülü), uygun porojenik çözücü varlığında, çapraz bağlayıcının kopolimerizasyonuna dayanan bir işlemdir [56,57]. Bu işlem sırasında, fonksiyonel monomerler, ilk olarak kalıp molekülü ile etkileşime girerek bir ön kompleks oluşturur ve polimerizasyonun ardından fonksiyonel grupları, yüksek oranda çapraz bağlı bir polimerik matriks meydana gelir. Daha sonra kalıp molekülünün polimerik matriksten uzaklaştırılması ile, analit için boyut ve şekil bakımından tamamlayıcı olan bağlanma bölgeleri elde edilir. Böylelikle, bu polimer, kalıp molekül için çok yüksek bir özgüllük ve afiniteye sahip olur [42].

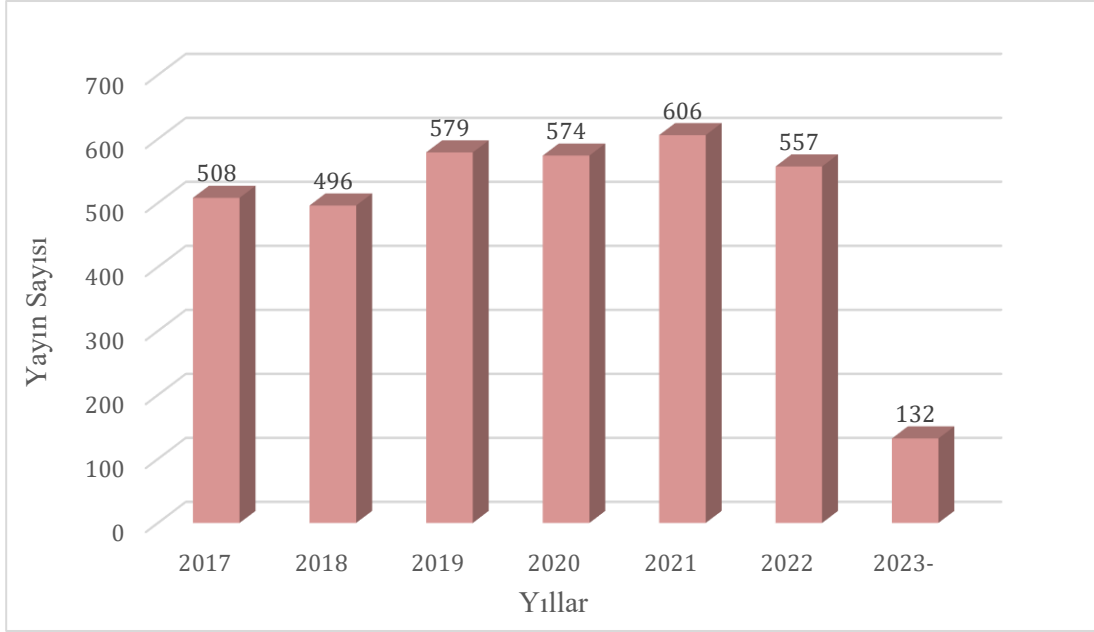


Şekil 2. 5. Moleküler baskılama yönteminin şematize edilerek gösterilmesi. (A) Kalıp molekül (mavi ile gösterilmiştir) ve fonksiyonel monomerlerin (sarı, yeşil ve turuncu ile gösterilmiştir), çapraz bağlayıcı (+) ile polimerizasyonu sonucu ön kompleks oluşumu; (B) Serbest radikal polimerizasyonuyla polimer matriksinin oluşturulması; (C) Kalıp molekülün, polimer matriksten uzaklaştırılması ile yapıda kalıp moleküle özgü boşlukların oluşması [56].

Sulu ortamlarda MIP'lerin zayıf performansı ile ilgili sorunların çözülmesindeki güçlükler ve MIP tasarımı için herhangi bir genel prosedürün olmaması nedeniyle, MIP'lerin ticari uygulaması hakkında henüz çok az bilgi mevcuttur [58]. Öte yandan, MIP'lerin doğal reseptörlerinkine benzer olan yüksek afiniteleri ve seçicilikleri, doğal biyomoleküllerin gösterdiğinden daha üstün benzersiz kararlılıkları, düşük fiyatları ve biyolojik reseptör bulunamayan analitler için özel olarak üretilebilmeleri, MIP'leri yoğun araştırmaların hedefi haline getirmiştir [42,58]. Lotierzo ve arkadaşları, yakın zamandaki bir çalışmada, MIP sistemlerinin aynı koşullar altında daha geniş bir algılama aralığı ve uzun vadede daha yüksek kararlılık ile monoklonal antikordlardan daha iyi performans gösterdiğini bildirmiştir [59]. Mosbach, yirmi yıl sonra, bu alandaki ilk organik polimer raporu ile mevcut alanın temelini atmıştır. Bu çalışma, enzimlerin ve hücrelerin tutulması için akrilik işlevselliklere sahip poliakrilamid jel matriksleri kullanmıştır. Akrilamid ve akrilik bazlı monomerler, halen birçok MIP sisteminin temel bileşenleri olarak günümüzde önemini korumaktadır [60].

Proteinler, DNA gibi moleküllerin baskılanması rapor edilmiş olmasına rağmen [61–64], bu tür makromolekülleri kullanan araştırma makalelerinin sayısı küçük moleküllere göre nispeten azdır. 2003 yılına kadar, biyo-makromoleküllerin baskılanması üzerine her yıl 10'dan az araştırma makalesi yayınlanmıştır [65,66] ve son yıllarda (Şekil 2.6) daha büyük biyomoleküllerin baskılanmasıyla ilgili araştırma makalelerinin sayısı önemli ölçüde artmaktadır [67–70].

Yıllar boyunca kaydedilen ilerlemeyi açıklayan bu ve diğer araştırmalardan, moleküler baskılamanın kalitatif/kantitatif ayırmalar, kataliz, biyosensörler ve ilaç salımı gibi birçok uygulama alanı için umut vadeden ve gelişmekte olan bir teknoloji olduğu gözle görülür biçimde ortaya çıkmıştır [71–75].



Şekil 2. 6. Moleküler baskılanmış polimerler ile ilgili yayın sayısının yıllara göre dağılımı (2017-2023) [76].

2.4.1. Moleküler Baskılama Tekniği

Moleküler baskılama tekniği üç ana basamakta gerçekleşir (Şekil 2.7):

i. Ön kompleksleşme

Polimerleşebilen uygun fonksiyonel gruba sahip monomerler, kalıp (hedef) molekülle, porojenik bir çözücü varlığında, kovalent etkileşimlerle veya kovalent olmayan etkileşimlerle, birleşerek bir ön-polimerizasyon kompleksi meydana getirir.

Ön-polimerizasyon kompleksinde hidrojen bağları, Van der Waals etkileşimleri, iyonik bağlar ve hidrofobik etkileşimler, kalıp (hedef) molekülün etrafını saran fonksiyonel monomerlerin uzamsal düzenlemesini belirler [53].

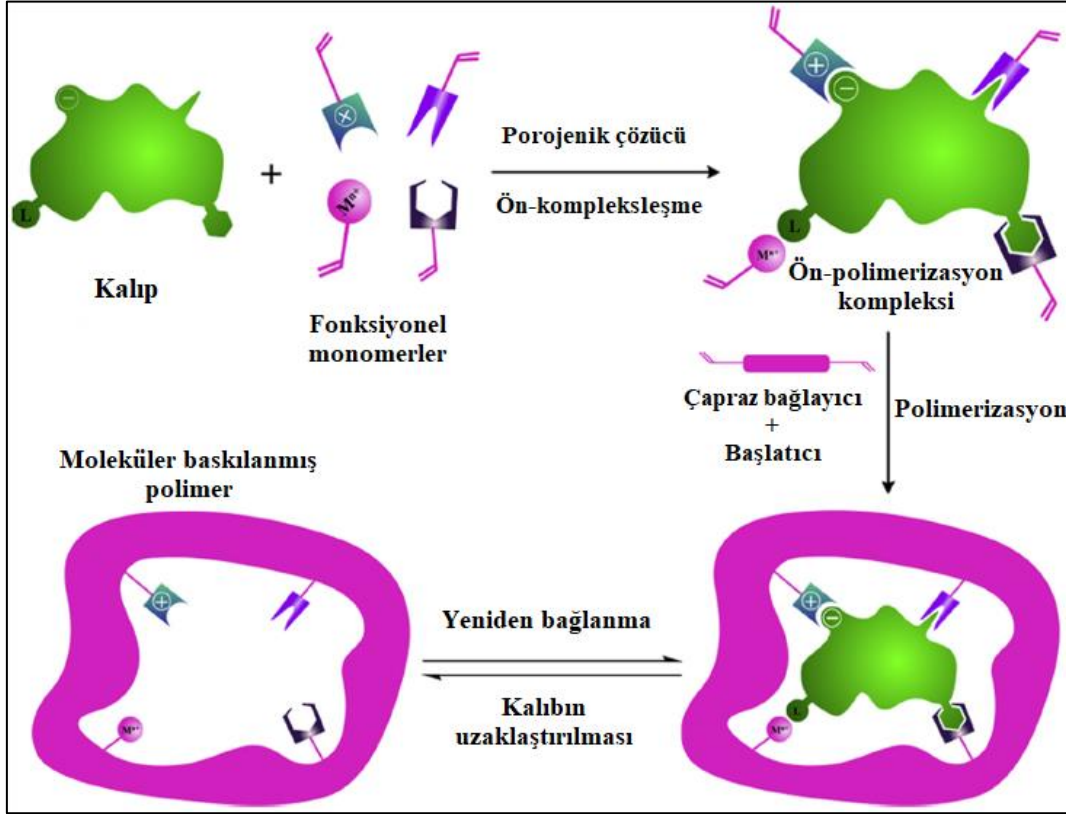
Fonksiyonel monomer ve kalıp molekülün polimerizasyonunun gerçekleştiği basamaktır. Bu basamakta, kalıp (hedef) molekülün 3D yapısı ve kimyasal özellikleri önem arz eder.

ii. Polimerizasyon

Polimerizasyon basamağı, fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksinin, porojenik çözücü varlığında ve uygun bir çapraz bağlayıcı yardımıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilmesini kapsayan süreçtir [77–80].

iii. Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması

Polimerizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra, kalıp (hedef) molekülün yerini dolduracak yapıdaki boşlukların oluşturulması için polimer matrisinden uzaklaştırılır. Daha sonra, uygun şartlar altında şekil, boyut ve kimyasal işlevsellik açısından tamamlayıcı olan spesifik tanıma bölgeleri elde edilir [81].



Şekil 2. 7. Moleküler baskılanmış polimer için hazırlık prosedürü [57].

Moleküler baskılama işleminin etkin olabilmesi için; (1) kalıp (hedef) molekül (2) fonksiyonel monomer, (3) çapraz bağlayıcı, (4) çözücü ve (5) başlatıcı seçimine dikkat edilmesi gerekir.

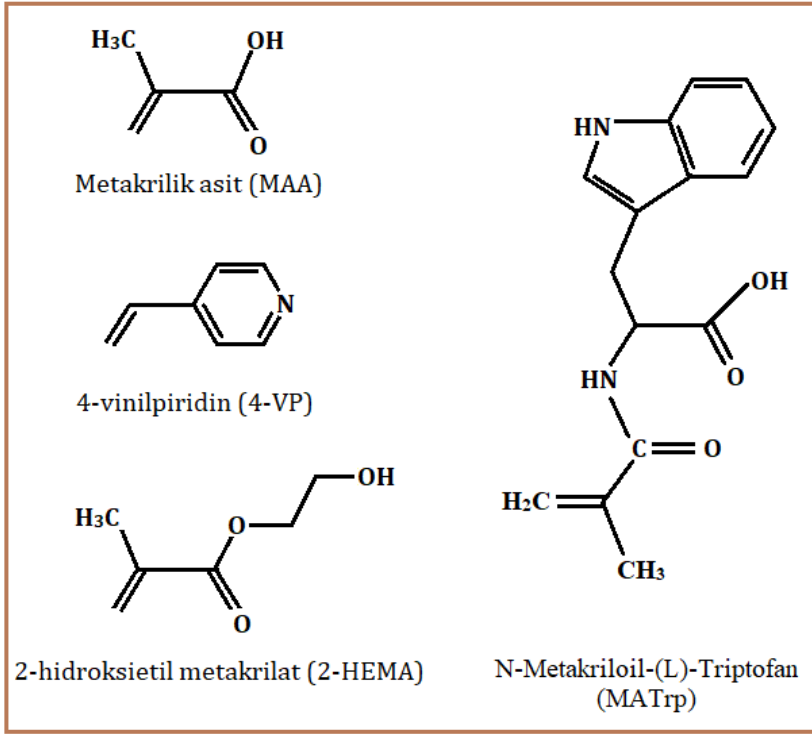
2.4.1.1. Kalıp (Hedef) Molekül

Moleküler baskılama yönteminde, baskılanan kalıp (hedef) molekülün, uygun fonksiyonel grupları içermesi, fonksiyonel monomerle kompleks oluşturabilmesi için önemli bir parametredir. Çeşitli nedenlerden ötürü, her kalıp molekül doğrudan kompleks oluşturmak için uygun şartları sağlamayabilir. Serbest radikal polimerizasyonu ile uyumluluğu açısından, kalıp molekül polimerizasyon koşulları altında kimyasal olarak kararlı olmalıdır.

Bağ yapan fonksiyonel grupların miktarı ne kadar fazla olursa, kalıp molekülün bağlanma etkileşimi de doğru orantılı olarak artış gösterir. Baskılanmak istenen molekülün seçiminde, kalıp (hedef) molekülün, polimerize edilebilir grup içermesi, polimerizasyonu engelleyici veya geciktirici bir fonksiyonel gruba sahip olması ve yüksek sıcaklıklarda ya da UV ışınlarına maruz kaldıktan sonra kararlı olup olmaması dikkat edilmesi gereken etmenler arasındadır [82,83]. İlaçlar, aminoasitler, karbohidratlar, proteinler, nükleotidler, iyonlar ve hormonlar gibi moleküller, moleküler baskılama uygulamalarında kalıp (hedef) molekül seçiminde kullanılabilir [84].

2.4.1.2. Fonksiyonel Monomerler

MIP'ler tarafından spesifik tanıma, kalıp ve monomerler arasındaki etkileşimlerin gücüne bağlıdır. Fonksiyonel monomerin seçimi, moleküler baskılama işlemi sırasında, fonksiyonel monomer-kalıp molekül kompleksinin kararlılığında etkin bir rol oynar. Kompleks oluşumunu ve dolayısıyla moleküler baskılamanın etkisini maksimum seviyeye çıkarmak için fonksiyonel monomerin ve kalıp molekülün uyuşması oldukça önemlidir. Genel olarak moleküler baskılama uygulamalarında tek bir fonksiyonel monomer tercih edilmesine rağmen, bazı durumlarda tanıma kabiliyetlerini geliştirmek amacıyla, iki veya daha fazla monomerin birlikte kullanımı da mümkündür. İki ya da daha fazla monomerin birlikte kullanıldığı uygulamalarda, nötral fonksiyonel komonomerlerin kullanımı, monomer-monomer etkileşimini minimum seviyeye indirmede etkili bir yöntemdir. Kimyasal olarak farklı yapılara ve polaritelere sahip çok sayıda fonksiyonel monomer ticari olarak temin edilebilir ve birçoğu rasyonel tasarımla hazırlanabilir. Şekil 2.8'de, yaygın kullanıma sahip fonksiyonel monomerlerin bir bölümünün moleküler yapıları gösterilmektedir [82,85].



Şekil 2. 8. Moleküler baskılama yönteminde yaygın olarak kullanılan fonksiyonel monomerler.

2.4.1.3. Çapraz Bağlayıcılar

Fonksiyonel monomerlerin kalıp molekül çevresindeki uzamsal dizilimini sabit tutmak için çapraz bağlayıcılar kullanılır [81].

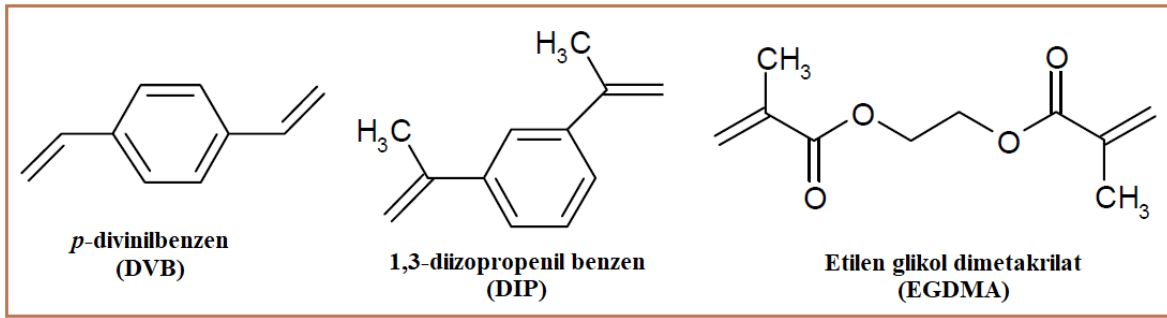
Moleküler baskılama yönteminde, çapraz bağlayıcıların kullanılmasının 3 belirgin amacı vardır. Bunlar;

- (i) Polimer matriksin morfolojisinin kontrolünü gerçekleştirmek,
- (ii) Baskılanan hedef analitin, bağlanma bölgelerinin stabilitesini sağlamak,
- (iii) Polimere kararlılık kazandırmaktır [82,86].

Moleküler baskılama işleminin etkili olabilmesi için, çapraz bağlayıcıların, fonksiyonel monomere uygun yapıda olması gerekir. Fonksiyonel monomerle uyumlu bir çapraz bağlayıcı ajanın kullanılmaması halinde, bir taraf daha baskın davranır ve kopolimerizasyon gerçekleşmez. Ayrıca, komonomerlerin doğru şekilde polimerizasyonunu sağlamak için, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı arasındaki stokiyometrik oranların dengede olması gerekir.

Bu dengenin sağlanmaması, seçiciliği olumsuz yönde etkiler [82,87]. Çapraz bağlayıcı/monomer mol oranı küçük olduğunda, kalıp moleküldeki bağlanma bölgeleri yaklaşarak, komşu bölgelerin bu bağlanma bölgelerini kapatmasına neden olur ve etkili bir sonuç elde edilemez. Çapraz bağlayıcı/monomer mol oranının yüksek olması durumunda ise, çapraz bağlayıcılar, kalıp molekül ya da monomerle kovalent olmayan bağlarla birleşerek moleküler baskılamanın etkinliğini azaltır [88].

Moleküler baskılama ile uyumlu kullanıma sahip yüksek sayıda çapraz bağlayıcı bulunmaktadır ve birçoğu endüstriyel olarak mevcuttur. Şekil 2.9’da, yaygın kullanıma sahip çapraz bağlayıcılardan birkaçının kimyasal yapıları gösterilmektedir [82].



Şekil 2. 9. Moleküler baskılama yönteminde yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılar.

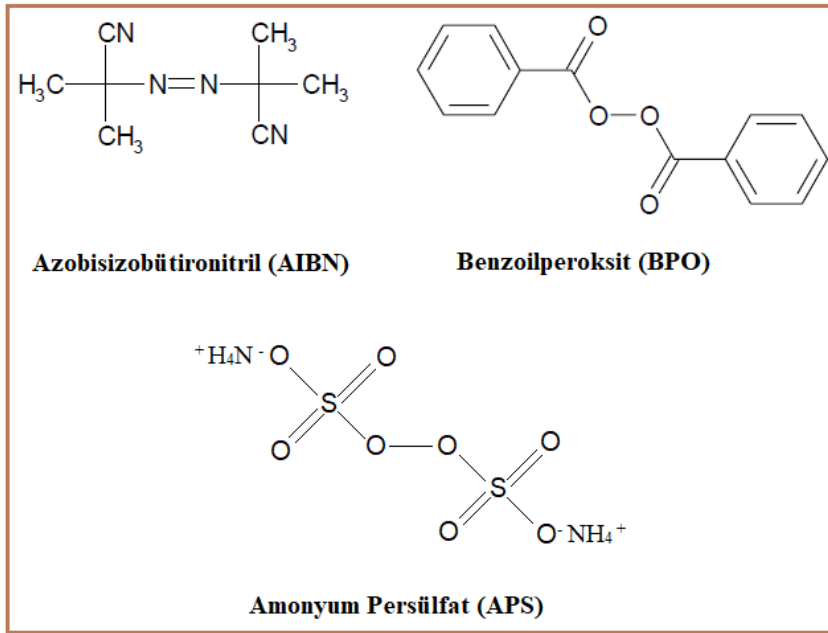
2.4.1.4. Çözücüler

Çözücüler, polimerizasyona giren tüm bileşenleri tek bir faza getirmek amacıyla kullanılır. Ayrıca, polimerizasyon esnasında tepkime ısını düzenleyerek, istenmeyen yan ürün oluşumunun engellenmesinden de sorumludur. Çözücüler, polimer üzerinde gözeneklerin oluşturulmasında önemli bir rol oynar. Bu yüzden çözücü, yaygın olarak “porojen” ismiyle de anılır. Polimerde porojen miktarının artırılması, gözenek hacmini de artırır. Çözücünün, polimer üzerinde oluşturduğu bu gözenekler sayesinde, bağlanan kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması sağlanır. Termodinamik açıdan güçlü bir çözücünün kullanımı, geniş hacimli, iyi gelişmiş gözenek yapıları ve yüksek seçicilikte yüzey alanlarına sahip polimer oluşumunu desteklemektedir. Diğer taraftan, zayıf bir çözücünün kullanımı, zayıf gözenek yapılarına ve seçiciliği düşük yüzey alanlarına sahip polimerlerin oluşmasına neden olur. Kovalent olmayan etkileşimlerde, çözücü seçilirken, kalıp molekül ile fonksiyonel monomer kompleksini destekleyici olmasına önem verilir.

Örneğin, toluen gibi protik olmayan apolar çözücüler hidrojen bağlarını kararlı kıldığı için tercih edilebilir. Hidrofobik kuvvetlerin kullanıldığı bir kompleks oluşumunda ise, çözücü olarak su kullanılabilir [82,87].

2.4.1.5. Başlatıcılar

Serbest radikal polimerizasyonlarının başlatılmasında, farklı kimyasal özelliklerde, kalıp molekül ile uyumlu birçok başlatıcı radikal kaynak olarak kullanılabilir. Moleküler baskılama işleminde başlatıcılar, fonksiyonel monomerlere oranla daha az miktarlarda kullanılırlar [89]. Kompleks oluşumunun hidrojen bağı ile sağlandığı koşullarda, daha düşük polimerizasyon sıcaklıkları tercih edilir. Böyle bir tepkimede, düşük sıcaklıklarda verimli bir şekilde çalışabilen fotokimyasal başlatıcıların kullanılması daha doğru olacaktır. Kalıp molekül ve monomer arasındaki kovalent olmayan bağlanmaların zayıf olduğu koşullarda yüksek sıcaklıklara çıkılamaz. Bu tür durumlarla karşılaşıldığında, ısı bozunma değil, ultraviyole bozunma kullanılması daha doğru olur. Şekil 2.10'da yaygın kullanıma sahip başlatıcıların kimyasal yapıları gösterilmektedir [82].



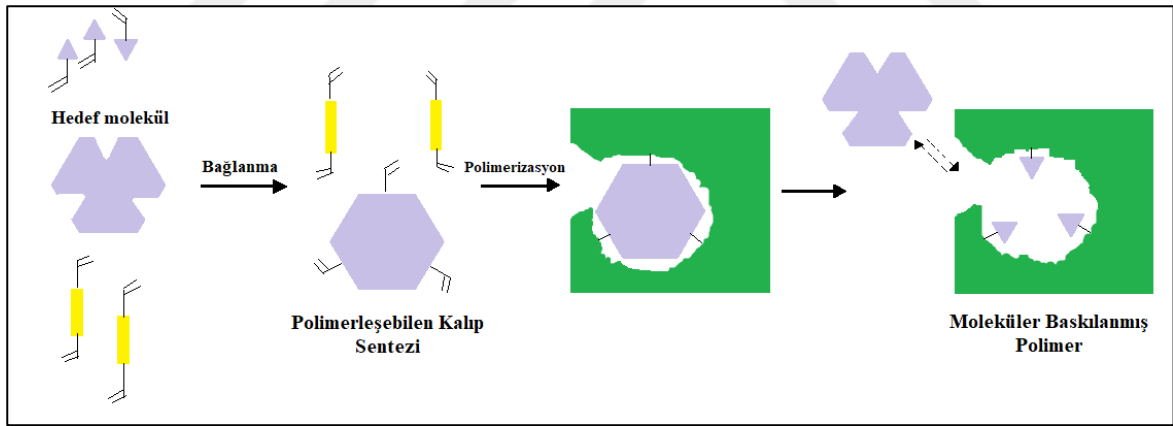
Şekil 2. 10. Moleküler baskılama yönteminde yaygın olarak kullanılan başlatıcılar.

2.4.2. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki etkileşimin doğasına bağlı olarak kovalent baskılama ve kovalent olmayan baskılama şeklinde iki temel grupta incelenebilir.

2.4.2.1. Kovalent Baskılama

1972’de Wulff ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri yoğun çalışmalar neticesinde, kovalent moleküler baskılama yöntemini geliştirdiler. Kovalent baskılama, özgül bağlanma bölgeleri oluşturmak için tersinir kovalent bağlar (Schiff bazı, esterler, asetal/ketal) kullanan bir moleküler baskılama yöntemidir [90]. Bu yöntemde, polimerizasyon aşamasından önce tersinir kovalent bağlar ile bir monomer-kalıp molekül kompleksi oluşturulur. Polimerizasyon aşamasından sonra, polimerik matrikste özgül boşluklar oluşturmak amacıyla kovalent bağlar kırılarak, uyumlu bir çözücü sayesinde kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır. Daha sonra kalıp molekül, baskılanan polimerle tekrar bir araya getirilerek kovalent bağların yeniden oluşması sağlanır (Şekil 2.11) [81].



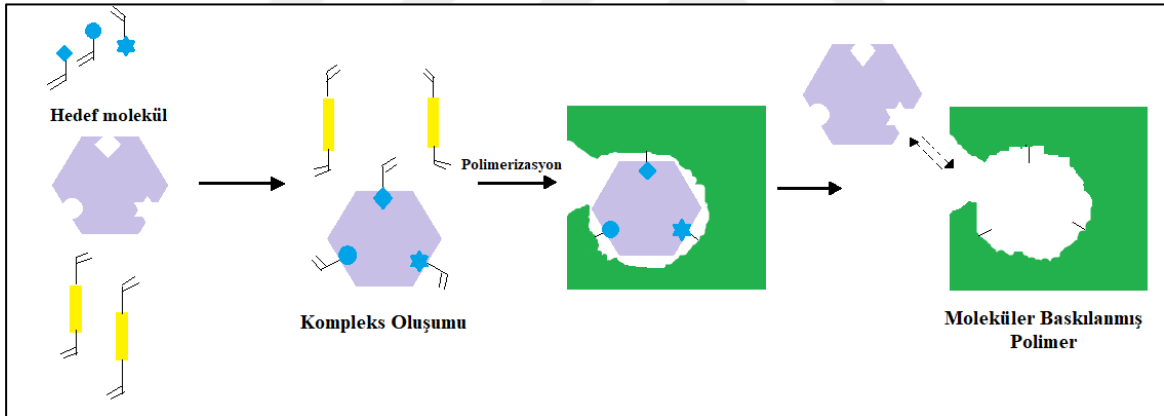
Şekil 2. 11. Kovalent baskılama yöntemi.

Özgül ve homojen bağlanma bölgeleri elde edilmesi açısından, kovalent baskılama oldukça avantajlıdır. Çünkü, kovalent baskılamada, monomer-kalıp molekül kompleksi oldukça kararlı bir yapıya sahiptir. Bu nedenle yüksek sıcaklık ve düşük veya yüksek pH koşullarında polimerizasyonun gerçekleştirilmesine olanak sağlar.

Bununla birlikte, tersinir olarak kovalent bağlanma sayısının sınırlı olması, yavaş bağlanma kinetiği, polimerizasyondan sonra kalıp molekülü polimerden uzaklaştırmanın zorluğu, sentezin zahmetli ve ekonomik olmaması, kovalent baskılama yönteminin önemli dezavantajlarıdır [57,90].

2.4.2.2. Kovalent Olmayan Baskılama

1981’de Mosbach ile arkadaşlarının geliştirdiği kovalent olmayan baskılama, özgül bağlanma bölgeleri oluşturmak için kovalent olmayan kuvvetleri (hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve van der Waals kuvvetleri) kullanan bir moleküler baskılama yöntemidir [57,90]. Bu yöntemde, kalıp molekül ve fonksiyonel monomer kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak monomer-kalıp molekül kompleksini oluşturur. Polimerizasyon aşaması tamamlandıktan sonra, kalıp molekül uygun bir çözücü kullanılarak polimerden uzaklaştırılır. Daha sonra kalıp molekül ve baskılanan polimer kovalent olmayan bağlarla tekrar bir araya gelir (Şekil 2.12) [81].



Şekil 2. 12. Kovalent olmayan baskılama yöntemi.

Kovalent olmayan moleküler baskılamanın en önemli avantajı, yöntemin basit ve kolay uygulanabilir olmasıdır. Çünkü kompleks oluşumu, kalıp molekülün fonksiyonel monomerler ile karıştırılmasıyla doğrudan elde edilebilir ve oluşan kompleks izole edilmeksizin polimerizasyon gerçekleştirilebilir. Ayrıca, kovalent olmayan bağlanmaların kovalent bağlanmalara göre daha zayıf olmasından mütevellit, kalıp molekül uygun koşullar altında basit bir çözücü yardımı ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir [90].

Kovalent olmayan baskılama, kalıp molekülün tekrar bağlanma kinetiğinin kovalent baskılamadan daha hızlı olması ve kovalent etkileşimlere göre daha yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri oluşturması nedeniyle araştırmacılar tarafından tercih edilen bir yöntemdir [86]. Ancak bu yöntemde, kovalent olmayan etkileşimlerin gerçekleşebileceği uygun polimerizasyon koşulları sınırlıdır. Buna ilaveten, kompleks oluşumunu desteklemek amacıyla kullanılan fonksiyonel monomerlerin fazla miktarda olması, afinite açısından heterojen bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olarak bağlanma seçiciliğini azaltabilir [91,92].

2.4.2.3. Metal-Şelat Etkileşimlerinin Oluşturduğu Moleküler Baskılama

Metal-şelat etkileşimlerine dayanan bu moleküler baskılama tekniği, kovalent baskılama ile kovalent olmayan baskılama yöntemlerine alternatif olması için geliştirilmiştir. Diğer iki yöntemde olduğu gibi, metal-şelat etkileşimleri de fonksiyonel monomerleri kalıp molekül etrafındaki dizilimini düzenleme amacı ile kullanılır. Bu yöntem, özgül bağlanma bölgeleri oluşturmak için metal-şelat etkileşimlerinin kullanıldığı bir moleküler baskılama yöntemidir. Metal-şelat etkileşimleri, bağlanma bölgelerinin dayanıklılığı ve özgüllüğü itibarıyla kovalent etkileşimlere benzerlik gösterir [93–95]. Bununla birlikte, metal-şelat etkileşimleri kullanılan çözücü ortamından etkilenmez, bağın kararlılığı çok zayıf değildir ve ligand değişim kinetiği, kovalent baskılamaya kıyasla oldukça hızlıdır. Bu özellikler, metal-şelat etkileşimlerini, oldukça spesifik moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasına olanak sağlayan umut verici bir yöntem haline getirir [90].

2.4.3. Moleküler Baskılama Tekniğinin Uygulamaları

Moleküler baskılı polimerlerin (MIP) hazırlanması kolaydır ve yüksek seçiciliğe sahiptir. Ayrıca, sentezlenmesi ucuzdur ve büyük miktarlarda tekrar tekrar üretilebilir. Bu özellikleri sayesinde MIP'ler farklı alanlarda moleküler tanıma ve ayırma malzemeleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [81,96]. Moleküler baskılamanın analitik ayırmalar, kataliz, ilaç salımı ve biyosensörler olmak üzere birçok farklı kullanımı sayesinde umut vadeden ve gelişmekte olan bir teknoloji olduğu bariz bir biçimde görünmektedir [53]. Başlangıçta MIP'ler, özellikle kiral ayırma için HPLC'de durağan fazlar olarak kullanılmıştır. Daha sonra, kullanımları sıvı kromatografisi, kapiler elektro-kromatografi, katı faz ekstraksiyonu dahil olmak üzere diğer analitik teknikleri içerecek şekilde genişletilmiştir.

Öte yandan, MIP'lerin olağanüstü kararlılıkları ve biyolojik reseptör bulunamayan analitler için özel olarak üretilibilmeleri, onları özellikle kimyasal sensör uygulamaları için uygun kılan özellikler arasındadır [42]. Bağlanma bölgeleri, hidrojen bağı, iyon değişimi ve elektrostatik etkileşim yoluyla hedef molekülü ve yapısal analoglarını spesifik olarak tanıyabilir. Bu nedenle, birçok MIP, kromatografide, katı faz ekstraksiyonunda ve mikro ekstraksiyonda, kirleticilerin adsorpsiyonla uzaklaştırılmasında da kullanılmaktadır [97]. Son on yılda ortaya çıkan MIP'lerin gelişme gösterdiği nispeten yeni alanlar arasında analizlerin ve sensörlerin, membranların, kapiler elektroforezin (CE) geliştirilmesi ve ilaç salım matrisleri gibi özel işlevlere sahip polimerlerin üretimi yer almaktadır [58].

2.5. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Kontrollü ilaç salımı, ilaçların belli bir süre boyunca yavaş yavaş salınmasıyla etki sürelerinin uzatılması veya dozajın kontrollü bir şekilde sağlanması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin temel amacı kandaki ilaç seviyesini en düşük seviyede etki eden derişim ile en düşük toksik derişim arasında sürdürmektir. İlacı tek bir büyük doz halinde uygulamak minimum toksik dozun aşılmasına dolayısıyla zehirlenmeye bağılı yan etkilere neden olurken birçok küçük doz halinde uygulamakta kandaki ilaç seviyesinde dalgalanmalara ve terapötik etkinin azalmasına sebep olabilir. Bu sebeple düşük dozlu frekanslarla kontrollü bir şekilde ilaç salımı yapan ilaç taşıyıcıları geliştirmek için yürütülen araştırmalara talep giderek artmaktadır. Yani kontrollü ilaç salımının en büyük avantajı istenilen dozda ve konumda ilaç salımı gerçekleştirerek terapötik etkide artış sağlamasıdır [3].

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.1’de verilmektedir.

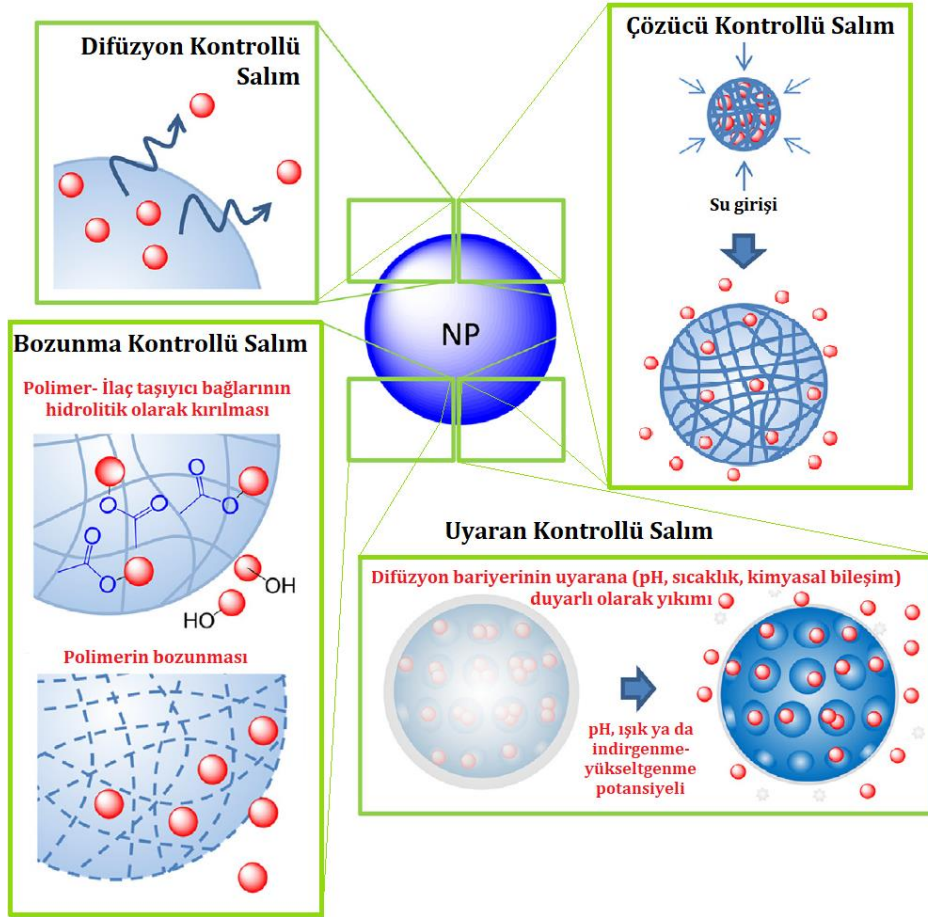
Çizelge 2. 1. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantajları ve dezavantajları [98,99].

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
Kontrollü salım preparatları ilacı istenen terapötik aralıkta tutar.	Daha çabuk ya da daha yavaş salım sonucunda istenmeyen kararlılık problemleri meydana gelebilir.
İlaç istenilen bölgeye lokal olarak verilebilir, böylece uygulanan ilaç seviyesi düşer.	Kontrollü ilaç salım sistemlerindeki ilaçlar ile uygulama esnasında, istenildiği ya da gerekli olduğu zaman uygulama durdurulamaz.
Dozların sayısı ve sıklığı azaldığı için, daha az takip/bakım ihtiyacı vardır.	Dozun belirlenmesi, tek bir faydalı doz ya da bu faydalı dozun katları olduğu için sınırlıdır.
Sürekli ilaç alım zorunluluğu ortadan kalktığı için hastaya konfor sağlar.	İlaçtaki etken maddenin yüksek miktarlarda olması sebebiyle, salımın hızlı gerçekleşmesi hastanın vücudunda toksisiteye neden olabilir.
Geliştirilmiş uyumluluğa sahiptir.	Bu tür ilaçların geliştirilmesi ve üretimi daha pahalı olmaktadır.

2.5.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

Kontrollü ilaç salım sistemlerini, dört ana mekanizma altında inceleyebiliriz (Şekil 2.13):

- Difüzyon kontrollü
- Çözücü kontrollü
- Bozunma kontrollü
- Uyarıcı kontrollü



Şekil 2. 13. Nanopartiküllerde kullanılan ilaç salım mekanizması [3].

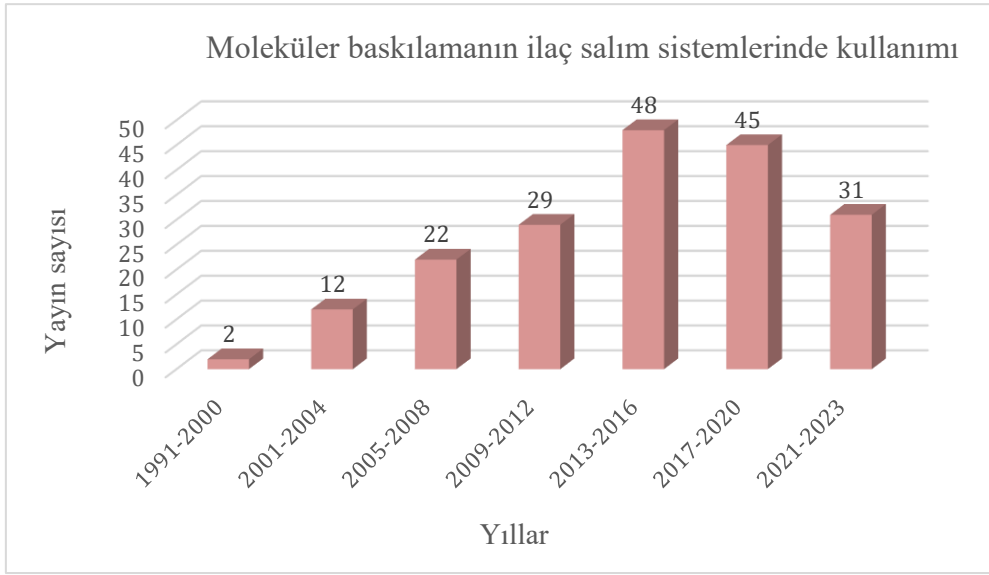
Difüzyon kontrollü ilaç salımında içerisinde ilacın çözündüğü bir zar ile kaplı kapsül gibi bir hazne ile gösterilir. Difüzyon kapsülü saran zarın iki yüzeyi arasında olan derişim farkı sayesinde gerçekleşir. İlaç öncelikle kapsül çekirdeğinde çözünür ve sonrasında zardan difüze olur. İlaç taşıyıcının içine bir çözücü madde taşımakta ilaç taşıyıcının ilaç salımını etkileyebilir.

Çözücü kontrollü salım ozmoz ve şişme kontrollü salımı içerir. Ozmoz kontrollü salımda taşıyıcı yarı geçirgen polimer bir zar ile kaplıdır ve bu zar boyunca su düşük ilaç derişimli dış çevreden yüksek ilaç derişimine sahip olan taşıyıcının çekirdeğine doğru hareket edebilir. Bu mekanizma sabit bir derişim geçişi sürdürüldüğü sürece sabit hızda ilaç salımını sağlar. Şişme kontrollü salımda ise, camsı hidrofil polimerik sistemler vücut sıvılarını içeren sulu çözelti içine yerleştirilirler ve böylelikle su sistemin içine nüfuz eder. Bu su alımını polimerik partiküllerin şişmesine ve bunu takiben ilaç salımına neden olur. Burada ilaç salım hızı suyun difüzyon hızına ve polimerlerin zincirleme genişleme hızına göre değişir [3].

Biyo-bozunabilir polimerlerden oluşan ilaç taşıyıcıları ilaç salımını sahip oldukları ester, amit ya da hidrazon bağlarının hidrolitik veya enzimatik bozunumuyla gerçekleştirirler. Böyle polimerlerden oluşan matrisler tüm matrisin yıkımıyla sonuçlanan kitlesel bozunmaya uğrarlar. İlaç salım hızı, ilaç taşıyıcı polimerin moleküler ağırlığı, sahip olduğu uç gruplar, kristallliği ve monomer kompozisyonu tarafından belirlenen bozunma hızına göre değişir. Biyo-bozunabilir sistemler vücutta uzun süreli etkileri olmaksızın uzaklaştırılabildiklerinden tercih edilirler. Uyarıcı kontrollü ilaç taşıyıcılar ise sıcaklık, pH, iyonik güç, ses, elektriksel ya da manyetik alanlar gibi içsel veya dışsal uyaranlar tarafından kontrol edilirler. Uyarıcının konumunu belirlemek mümkün olduğundan bu tür sistemler hedefe özel ilaç salımı yapmak için tercih edilirler. Nano boyutta ilaç taşıyıcılar küçük boyutları ve geniş yüzey alanları ile ilaç salımında esneklik sağlamaya elverişli olduklarından avantajlıdır. Bu avantajlarından ötürü nanopartiküllerin ilaç salım sistemlerinde kullanımı artmaktadır [100,101].

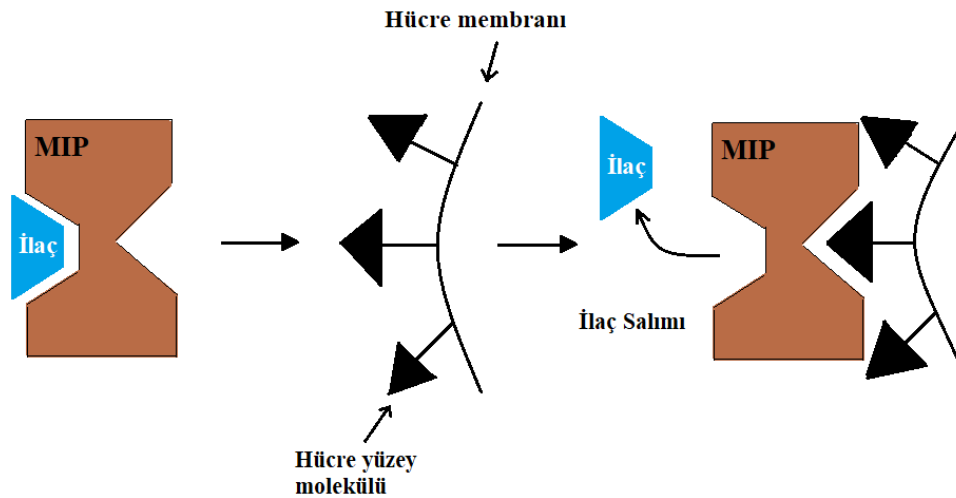
2.5.2. Moleküler Baskılama Teknolojisinin Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması

Moleküler baskılanmış polimerler gibi molekül bazında seçici sentetik reseptörlerin, bilimin çoğu alanında oldukça fazla uygulaması mevcuttur, fakat en geniş uygulamaların oluşturduğu alan terapötikler ile tıbbi uygulamalardır. MIP'ler, farmakolojik etkisi bulunan, potansiyel ilaçların tayininde büyük bir öneme sahiptir. MIP ilk olarak enantiyomerik çözünürlük alanında ortaya çıkmış ve şimdilerde ilaç salım sistemlerinde yoğun ilgi görmektedir. MIP'in biyouyumluluk, düşük toksisite, biyobozunurluk gibi bazı avantajları vardır. Ayrıca düşük maliyeti, hazırlama kolaylığı ve çoklu uygulama yolları onu alternatif bir taşıyıcı yapmaktadır. Moleküler baskılanmış polimerlerin kullanıldığı ilaç salım sistemlerinin uygulanması ve geliştirilmesine yönelik yayınlanan patent ve makalelerin sayısı hızlı bir biçimde artmaktadır (Şekil 2.14) [80,102].



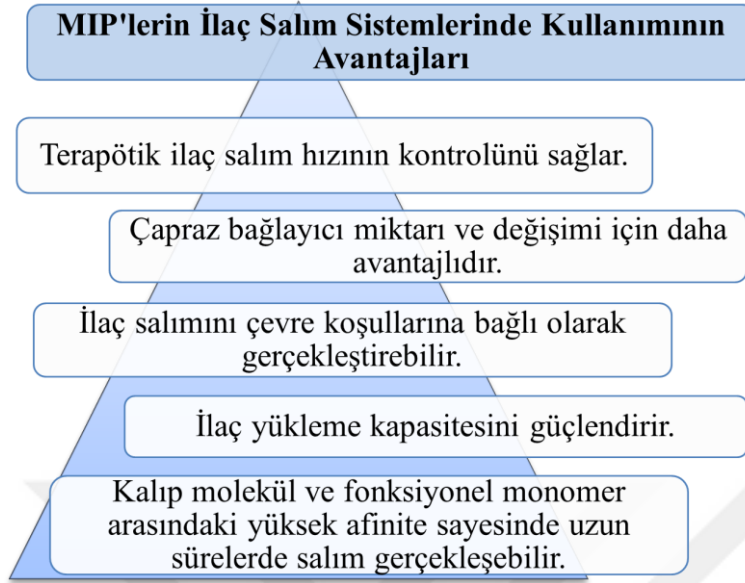
Şekil 2. 14. Moleküler baskılanmanın ilaç salım sistemlerinde kullanımını içeren yayınların yıllara göre dağılımı [103].

Hali hazırda, kontrollü ilaç salımı için, bir dizi biyoyoumlu akrilatlar ve vinil polimerler de dahil olmak üzere çok çeşitli polimerler üzerinde çalışılmaktadır. Moleküler baskılanmış polimer (MIP) bazlı sistemlerin (Şekil 2.15) kontrollü salımda ilk kullanıldığı alan farmakolojidir. MIP'e kovalent ya da kovalent olmayan etkileşimle bağlanan ilaç, moleküler baskılanmış polimerin hücrenin yüzey kısmındaki hedefe bağlandığı an salınır. İlk kez Vtakis ve arkadaşları, diapezam ve teofilin ilaçlarını kullanarak, kovalent olmayan moleküler baskılanmış polimer temelli bir uygulama geliştirmiştir. Ancak bu uygulamayı kontrollü ilaç salımında kullanmamışlardır [2,104].



Şekil 2. 15. Moleküler baskılanmış bir taşıyıcı kullanılarak hedeflenen ilaç salımı.

MIP'lerin ilaç salımında kullanımının getirdiği bazı avantajlar Şekil 2.16'da verilmiştir [105]:



Şekil 2. 16. Moleküler baskılanmış polimerlerin ilaç salım sistemlerinde kullanımının avantajları.

2.5.3. İlaç Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

İlaç salım kinetiği, terapötik ajanların belirli bir dozunun vücuda verildikten sonra kanda, hücrelerde veya dokularda ne kadar hızlı ve ne kadar uzun süre kalacağını belirleyen bir disiplindir. Bu süreç, ilaçların etkilerini belirlemek ve yan etkilerini kontrol etmek için oldukça önemlidir. İlaç salım kinetiği, ilaçların salım hızını ve derişimini etkileyen birkaç faktöre bağlıdır. Bu faktörler arasında ilacın kimyasal özellikleri, dozu, formu, kullanım yolu, emilim yeri, metabolizma ve vücuttaki dağılımı sayılabilir. İlaç salım kinetiği, birkaç farklı aşamadan oluşur. İlk aşama, ilacın emilimini ve yayılmasını içerir. Bu aşamada, ilaç kandan dokulara veya hücrelere taşınır ve etkileri gözlenmeye başlar. İkinci aşama, ilacın derişiminin kararlı hale gelmesidir. Bu aşama, ilacın en yüksek derişime ulaştığı noktadır ve burada ilacın etkisi de en yoğun şekilde hissedilir. Son aşama ise, ilacın vücuttan atılmasıdır. Bu aşamada, ilaç derişimi azalmaya başlar ve etkileri yavaş yavaş kaybolur [106].

İlaç salım modelleri, ilaçların *in vivo* ve *in vitro* ortamlardaki etkisini ve salımını incelemek için kullanılan matematiksel modellerdir.

Bu modeller, önemli parametrelerin ölçülebilmesine ve ilaçların salım kinetiklerinin farklı yönlerini hesaba katarak ilaç salım mekanizmasının belirlenmesine olanak sağlar. Ancak, bu modellerin kullanım alanları, matematiksel denklemleri ve hesaplama yöntemleri farklıdır. Bu nedenle, modellerin doğruluğu ve kullanım alanları da farklılık gösterir [106,107].

Sonuç olarak, modellerden her biri, farklı ilaç salım durumları için geçerli olabilir. Sıfır derece, birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas başlıca ilaç salım kinetik modelleridir.

2.5.3.1. Sıfır Derece Modeli

Sıfır derece modeli, ilaçların belirli bir dozunun vücuda verildikten sonra derişimin zamanla nasıl değiştiğini matematiksel olarak açıklayan bir modeldir. Bu salım modeline uyan sistemler , ilaçların salımının sabit bir hızda gerçekleştiğini varsayar. Sıfır derece modeli denklemi, ilacın derişiminin zamanla değişimini ifade eder. Bu denklemde, Q_0 salım sisteminde başlangıç anında bulunan ilaç miktarını, Q_t salım sisteminde t anında salınan ilaç miktarını, k_0 ise sıfırıncı derece salım hız sabitini ifade eder.

Sıfır derece modelinin denklemi Eşitlik 2.1’de verilmiştir:

$$Q_t = Q_0 + k_0t \quad (2.1)$$

Denklemde, salınan ilaç miktarının (Q_t) zamana (t) karşı grafiğe geçirilmesi sonucunda eğimi sıfırıncı derece salım hız sabiti (k_0) olan bir doğru elde edilir. Sıfır derece modeli, ilaçların dozajının belirlenmesinde ve ilaç etkilerinin kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, ilaçların yan etkilerinin azaltılması ve ilaçların etkilerinin uzun süre devam etmesi için de kullanılır. Sıfır derece modeli, ilaç salım kinetiğinde sadece ilk aşamayı açıklar ve ilacın emilim aşamasını göz ardı eder. Bu nedenle, ilaçların salım hızını tam olarak açıklamak için diğer kinetik modeller de kullanılır [108].

2.5.3.2. Birinci Derece Modeli

Bu modelde ilaç miktarı ilaç derişimine bağımlıdır ve ilaç miktarı zamana bağlı olarak üssel bir biçimde azalır. Birinci derece kinetik modeli, ilaçların derişimi azaldıkça, zamanla ilacın salım hızının da azalacağını varsayar.

Birinci derece kinetik modeli denklemi Eşitlik 2.2’de verilmiştir:

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + k_1t \quad (2.2)$$

Bu denklemde Q_t , t anındaki ilaç salım miktarını, Q_0 , başlangıçtaki ilaç salım miktarını, k_1 ilacın birinci derece salım hız sabitini ifade eder. $\ln Q_t$ değerleri zamana karşı grafiğe geçirildiğinde eğim, birinci derece salım hız sabitini (k_1) verir. Geleneksel dozlamaların çoğunda birinci derece salım modeli kullanılır [109].

2.5.3.3. Higuchi Modeli

Higuchi Modeli, ilaç salım kinetiğinde sıklıkla kullanılan 1961 yılında Higuchi tarafından geliştirilen bir matematiksel modeldir. Bu model, ilaçların polimer matrisler gibi sabit bir yapı içinde salındığı durumlar için uygundur.

Higuchi Modeli denklemi Eşitlik 2.3’de verilmiştir:

$$Q = A\sqrt{D(2C - C_s)C_s t} \quad (2.3)$$

Denklemde; Q , t anında birim yüzey alanından salınan ilaç miktarı, A , ilaç taşıyıcıya ait yüzey alanı, C , matris içerisindeki başlangıç ilaç derişimi, C_s , matris içerisindeki ilacın çözünürlüğü ve D , matris içerisindeki ilacın difüzyon katsayısıdır. Higuchi modeli, ilacın matrisin içine çözünmesi ve matrisin içindeki difüzyonu temel alır. İlaç matrisin içine çözündükçe, ilaç molekülleri polimer matrisin içine difüzyonla yayılır ve bu da salınan ilaç miktarının, zamanın karekökü ile doğru orantılı olarak artmasına neden olur. Higuchi Modeli, ilaçların salım hızının başlangıçta yüksek olduğunu ve zamanla azaldığını varsayar. Bu nedenle, ilacın salım hızı zamanla azalır ve sonunda sabit bir hal alır [110].

Higuchi modelinin uygulanabilmesi için gerekli bazı parametreler vardır. İlk olarak matrisin şişmesi ve çözünmesi ihmal edilebilir düzeyde olmalıdır ve salım difüzyonu tek yönde olmalıdır. Buna ilaveten, salım esnasında ortam hacmi sabit tutularak mükemmel çanak koşulları sağlanmalıdır ve matristeki başlangıç ilaç derişimi, ilacın çözünürlüğünden daha yüksek olmalıdır [111].

2.5.3.4. Korsmeyer-Peppas Modeli

Korsmeyer-Peppas Modeli polimerik sistemlerden ilaç salımını tanımlayan daha kapsamlı bir modeldir. Bu model özellikle şişme özelliği gösteren hidrojel gibi polimerik matrislerin kullanıldığı ilaç salım sistemlerine uygun geliştirilen bir modeldir.

Korsmeyer-Peppas modeline ait denklem Eşitlik 2.4’de verilmiştir:

$$M_t / M_\infty = kt^n \quad (2.4)$$

Bu denklemde, n salım kuvveti, M_t , t anında salınan ilaç miktarı, M_∞ , ∞ zamanda salınacak ilaç miktarı, M_t/M_∞ , t anında salınan ilaç fraksiyonu ve k , salım hız sabitidir. Korsmeyer-Peppas modeli özellikle salım mekanizmasının bilinmediği ya da aynı anda birden fazla salım mekanizmasına uyan salım modellemeleri için kullanılır [112,113].

Denklemde gösterilen n değeri, farklı geometrilerde, ilacın salım mekanizmasını belirlemede önemli bir rol oynar. Polimerik matris sisteminden, ilacın salım mekanizmasını daha iyi destekleyen, n değerine bağlı olarak gözlenen salım davranışına göre bir sınıflandırma yapmak mümkündür [113]. Çizelge 2.2’de farklı polimer geometrilerindeki n değerlerine bağlı olarak adlandırılan ilaç salım mekanizmaları verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Farklı geometrilerdeki polimerik matrislerden aktif ajanların salım modelleri [114].

İlaç Salım Mekanizması	Cisim Geometrisi	Salım Kuvveti (n)	n’in zamana karşı fonksiyonu
Fickian Difüzyonu	İnce Film	0.5	$t^{0.5}$
	Silindir	0.45	$t^{0.45}$
	Küre	0.43	$t^{0.3}$
Fickian Olmayan Difüzyon	İnce Film	$0.5 < n < 1$	$t^{0.5 < n < 1}$
	Silindir	$0.45 < n < 0.89$	$t^{0.45 < n < 0.89}$
	Küre	$0.43 < n < 0.85$	$t^{0.43 < n < 0.85}$
Durum I	İnce Film	1	t^*
	Silindir	0.89	$t^{0.89}$
	Küre	0.85	$t^{0.85}$
Süper Durum II	İnce Film	$n > 1$	$t^{n > 1}$
	Silindir	$n > 0.89$	$t^{n > 0.89}$
	Küre	$n > 0.85$	$t^{n > 0.85}$

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Malzemeler

Ritonavir (SML0491, Sigma), sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum bikarbonat (NaHCO_3), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA, %98), sodyum bisülfat (NaHSO_3 , min. %99), amonyum persülfat (APS, %98) Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) ve Poli(vinil alkol) (PVA; MW:16.000, %98) Acros (Organics, ABD) firmalarından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından alınmıştır. Yapılan deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve sonrasında Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi ile saflaştırılmıştır. Deiyonize suyun iletkenliği 18.2 M Ω /cm'dir.

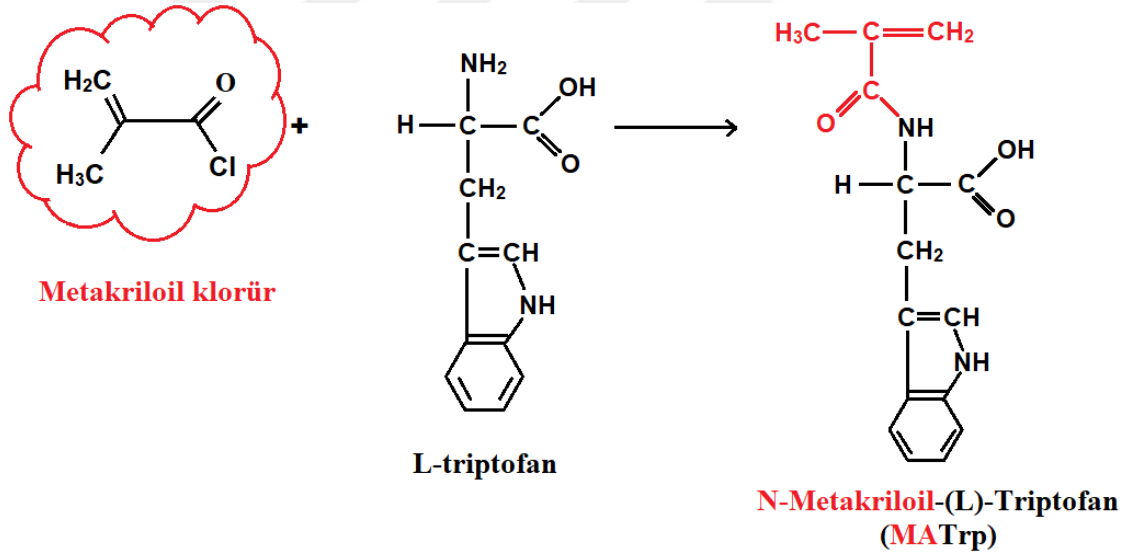
3.2. Yöntem

Hazırlanan tez kapsamındaki deneysel bölümler altı temel başlıkta incelenebilir:

- N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) fonksiyonel monomerinin sentezlenmesi,
- MATrp-RTV ön kompleksinin hazırlanması,
- RTV baskılanmış ve baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin hazırlanması,
- Nanopartiküllerin karakterizasyonu,
- İn vitro koşullarda RTV salımının incelenmesi,
- Sitotoksikite çalışmaları.

3.2.1. N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) Fonksiyonel Monomerinin Sentezlenmesi

Kalıp molekül Ritonavir (RTV) ile etkileşime girmek üzere seçilen fonksiyonel monomer MATrp sentezi (Şekil 3.1) için uygulanan yöntem şu şekildedir: Hidrokinon (0.2 g) ve L-triptofan (5.0 g), 100 mL diklorometan (CH_2Cl_2) içinde çözülmüştür. Çözelti 0°C 'a soğutulduktan sonra, çözeltiye trietilamin (14.0 g) eklenmiştir. Daha sonra çözeltinin üzerine, azot atmosferi altında metakroil klorür (4.0 mL) yavaş bir şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. 2 saatin bitiminde, %10'luk NaOH çözeltisi kullanılarak tepkimeye girmeden kalan metakroil klorür ayrılmıştır. Döner buharlaştırıcı yardımı ile sulu faz buharlaştırılmıştır. Sonraki aşamada, çökelti (MATrp) ise etil alkolde kristalize edilmiştir [115].



Şekil 3. 1. MATrp monomerinin sentez tepkimesi.

3.2.2. MATrp-RTV Ön Kompleksinin Hazırlanması

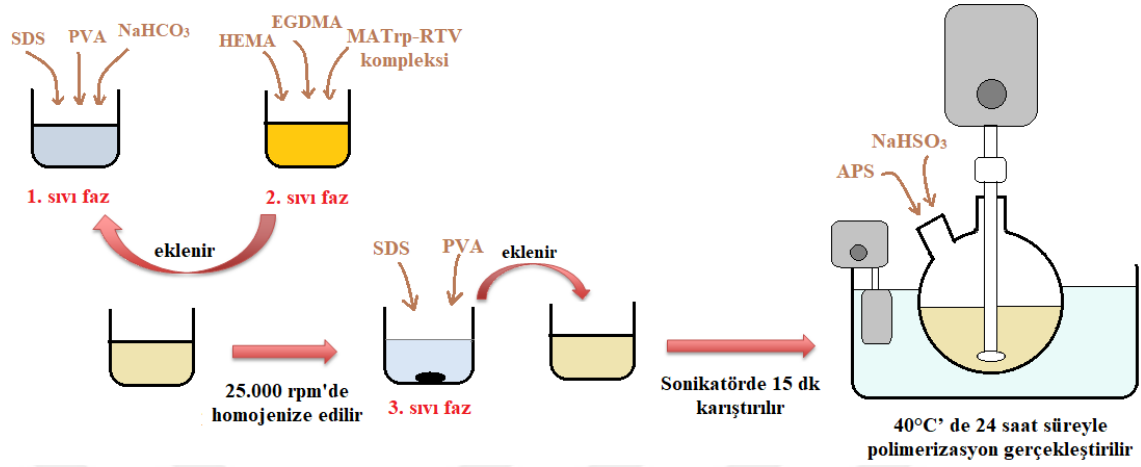
Bu tez çalışmasında, MATrp-RTV ön kompleksinin oluşturulması için kalıp molekül Ritonavir (1.0 mg), 1µmol fonksiyonel monomer MATrp'da çözülerek bir stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 20 µL alınmış ve toplam hacim metanol eklenerek 600 µL'ye seyreltilmiştir. Sonrasında, UV spektrofotometre kullanılarak 238 nm'de absorbens ölçülmüştür.

3.2.3. RTV Baskılanmış ve Baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) Nanopartiküllerin Hazırlanması

RTV baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin (MIP) elde edilmesi için toplamda üç sıvı faz karışımı hazırlanmıştır. Birinci sıvı faz hazırlanırken, PVA (0.187 g), SDS (28.9 mg) ve sodyum bikarbonat (23.4 mg), suda (10 mL) manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. İkinci sıvı faz oluşturulurken, çapraz bağlayıcı EGDMA (1.4 mL), fonksiyonel monomer HEMA (0.7 mL) ve MATrp (1µmol) - RTV (1.0 mg) kompleksi olarak 600 µL kullanılmıştır. Hazırlanan ikinci sıvı faz, birinci sıvı faza eklenerek, miniemülsiyon elde etmek için homojenizatör (T10, Ika Labortechnik, Almanya) 25.000 rpm'e ayarlanarak, 30 dakika boyunca homojen hale getirilmiştir (Şekil 3.3). Daha sonra karışıma, üçüncü sıvı faz olan; PVA (0.1 g) ve SDS (0.1 g)'in sulu çözeltisi (200 mL) eklenerek sonikatör yardımı ile 15 dakika karıştırılmıştır. Sonrasında elde edilen bu karışım polimerizasyon cihazına (Radleys Carousel 6, UK) aktarılarak, karışıma polimerizasyonu başlatıcı ajanlar olan sodyum bisülfat (0.115 g) ile amonyum persülfat (APS) (0.126 g) ilave edilmiştir. Polimerizasyon 400 rpm hızında, 40°C' de 24 saat boyunca sürdürülmüştür. Sentezlenen RTV baskılanan nanopartiküller 5 defa deiyonize su, 5 defa etil alkol ve tekrar deiyonize su ile yıkanarak tepkimeye girmeden kalan monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcı uzaklaştırılmıştır. Her bir yıkama basamağı için çözelti 25000 rpm'de 45 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve nanopartiküller yıkama ortamından ayrılmıştır.

RTV baskılanmamış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin (NIP) sentezlenmesinde, RTV ilave edilmeden yukarıda verilen sentez basamakları aynı şekilde tekrar edilmiştir.

RTV baskılanmış polimerik nanopartiküllerin sentezine ilişkin aşamalar aşağıdaki şemada gösterilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. RTV baskılanmış polimerik nanopartikül (MIP) sentezinin şematik gösterimi.



Şekil 3. 3. A) Homojenizatör (T10, Ika Labortechnik, Almanya), B) Polimerizasyon reaktörü (Radleys Carousel 6, UK), C) Ultrasantrifüj (Beckman Coulter Optima L-100K).

3.2.4. RTV Baskılanmış Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.4.1. FTIR ile Yapı Analizi

RTV baskılanmış, baskılanmamış nanopartiküllerin ve ilacın yapısı FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) ile incelenmiştir. Ölçüm yapılmadan önce polimerler 1 gün boyunca vakum etüvüne konularak kuruması sağlanmıştır. Kuruyan nanopartiküller (2 mg), KBr (98 mg, IR Grade, Merck, Almanya) ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm² basınçta 10 dakika bekletilerek ince bir pelet haline getirilmiştir. Hazırlanan tabletin 4600-400 cm⁻¹ dalga boyunda FTIR spektrumu alınmıştır.

3.2.4.2. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen RTV baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin zeta boyut analizi, Nano Zeta Sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) (Şekil 3.4) ile analiz edilmiştir. Zeta boyut analizi için, nanopartikül çözeltileri (1 mL) Zetasizer'ın numune bölmesine yerleştirilmiştir. Işık saçılması 90°'lik geliş açısı ile 25°C'de tayin edilmiştir. Analiz için, deiyonize suyun yoğunluğu (0.8872 mPa.s) ile kırılma indeksi (1.330) kullanılmıştır.



Şekil 3. 4. Nano Zeta Sizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere).

3.2.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

RTV baskılanmış nanopartiküllerin karakterizasyonu için yüzey yapıları SEM (JEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya) kullanılarak gözlemlenmiştir. Nanopartiküller aynı şekilde -60°C’da 1 gün bekletilerek liyofilize edilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Sonrasında altın-paladyum ile kaplanarak SEM görüntüleri kaydedilmiştir.

3.2.4.4. Yüzey Alanı

Sentezlenmiş olan RTV baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartikülünün yüzey alanının matematiksel analizi için 1mL’deki nanopartikül sayısını veren denklem Eşitlik 3.1’de verilmiştir [116,117]:

$$N = 6 \times 10^{10} \times S / \pi \times \rho_s \times d^3 \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte; N, 1 mL süspansiyondaki nanopartikül sayısını; S, % katıyı; d, çapı (μm); ρ_s, polimer yoğunluğunu (g/mL) ifade etmektedir.

Nanopartikül için oluşturulan kütle-hacim kalibrasyon grafiği baz alınarak mL’deki g nanopartikül miktarı teorik olarak belirlenmiştir. Kürenin yüzey alanı hesabı için verilen Eşitlik 3.2’deki matematiksel ifade de kullanılarak, sentezlenen nanopartikülün spesifik yüzey alanı hesaplanmıştır.

$$\text{Kürenin yüzey alanı (A)} = 4 \times \pi \times r^2 \quad (3.2)$$

(π, 3.14; r, nanopartikül yarıçapı (m))

$$\text{Spesifik yüzey alanı} = [(N \times A) / 1 \text{ mL’deki kuru nanopartikül kütlesi (g)}] \quad (3.3)$$

3.2.5. İn vitro Salım Çalışmaları

Tez çalışmasında nanopartiküllerin *in vitro* şartlardaki ilaç salım özelliklerinin incelenmesi için diyaliz membran kullanılmıştır. İlaç salım kinetiğini belirlemek amacı ile yapılan analizler, $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sabit sıcaklıkta çalkalamalı etüv içinde 20 rpm hızında gerçekleştirilmiştir. Liyofilize edilerek kurutulmuş RTV yüklü nanopartiküllerden salım, 25°C 'de, farklı pH değerlerine (pH 4.0, 5.5, 7.4 ve 8.5) sahip 2 mL tampon ortamlarında gerçekleştirilmiştir. İlaç salım düzeneğinden (Şekil 3.5) saat başı örnek alınarak ve ortama taze tampon çözeltisi eklenerek ortam hacmi sabitlenmeye çalışılmıştır.

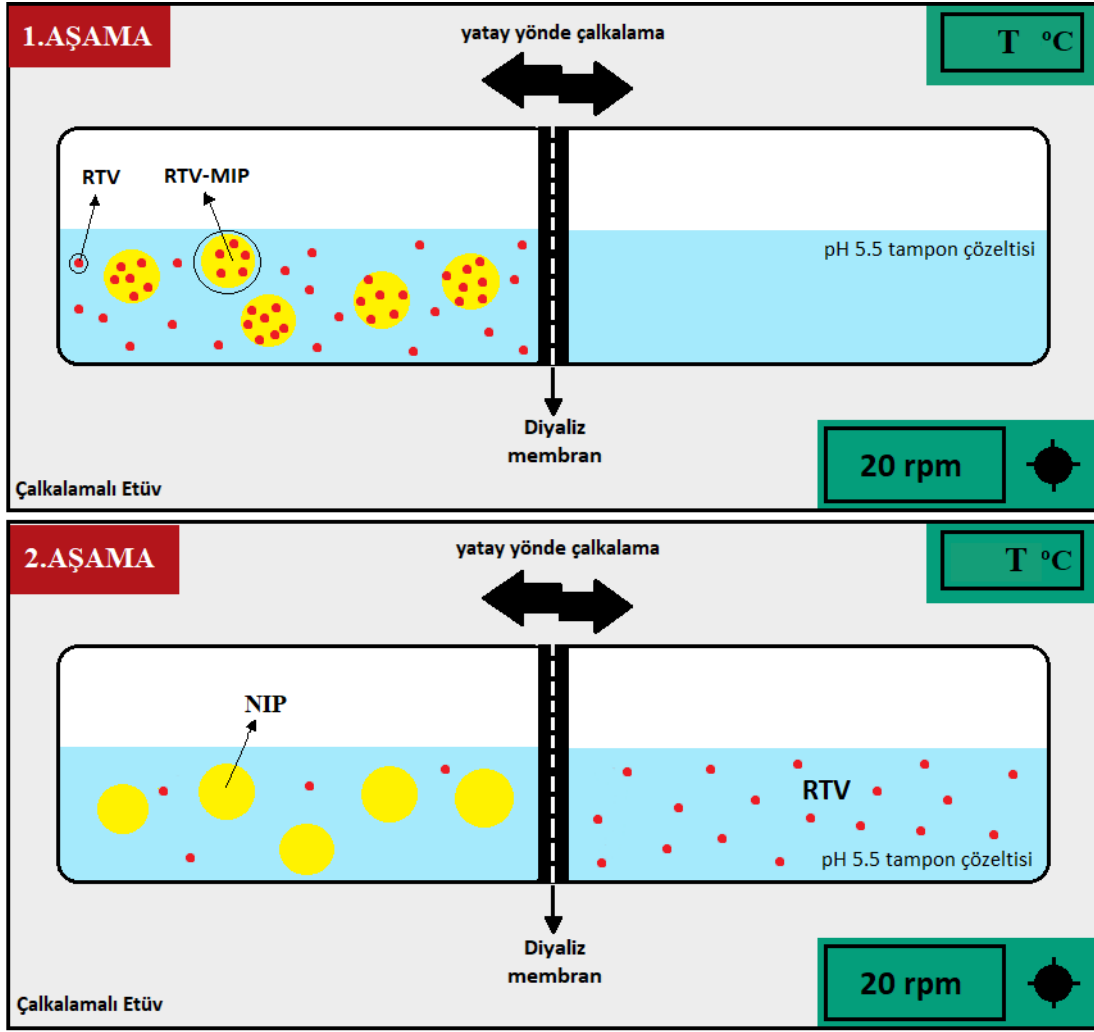
Kümülatif ilaç salımı aşağıda verilen denklemle hesaplanmıştır:

$$\text{İlaç derişimi } (\mu\text{g/mL}) = (\text{eğim} \times \text{absorbans}) \quad (3.4)$$

$$\text{Salınan ilaç miktarı (mg)} = \frac{\text{Derişim} \times \text{çözünme ortamı hacmi} \times \text{seyreltme faktörü}}{1000} \quad (3.5)$$

$$\text{Kümülatif ilaç salımı (\%)} = \frac{\text{Salınan ilaç miktarı (mg)}}{\text{Matriksteki ilaç miktarı (mg)}} \times 100 (\%) \quad (3.6)$$

RTV yüklü nanopartikül örneklerinin farklı derişimlerdeki (0.2, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/mL) ilaç salım miktarlarının hesaplanabilmesi için, deneysel çalışma pH 5.5 ortamı temel alınarak 37°C 'de tekrar yapılmıştır. Yüklenen ilaç miktarının salınan ilaç miktarına etkisini incelemek için farklı RTV derişimlerindeki nanopartiküllerden 10 saatlik salım miktarları değerlendirilmiştir. Salınan RTV miktarının UV spektrofotometre (Şekil 3.6) kullanılarak 238 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmış ve standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.



Şekil 3. 5. RTV in vitro salım düzeneğinin şematik gösterimi.



Şekil 3. 6. A) Çalkalamalı etüv (Edmund Bühler TH-30/SM30, Almanya), B) UV-VIS spektrofotometre (UV-1240, Shimadzu, Japonya).

3.2.6. Sitotoksosite

3.2.6.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Nanopartiküllerin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde L929 fare fibroblast hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler, ilk olarak 37.0°C’de, %5 CO₂ içeren atmosferik şartlarda 75 cm²’lik kültür kabında inkübe edilmiştir. Ortam iki günde bir değiştirilmiştir. Tek katlı hücre tabakası %80 yoğunluğa ulaştığında tripsin/EDTA çözeltisi ile kültür kabından ayrılmıştır. Ardından hücreler, 10 ml hücre medyumuna ile süspanse edilerek 1500 rpm’de 5 dakikada santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Medium, pipet yardımıyla atıldıktan sonra hücreler tekrar medium ile süspanse edilmiş ve hücre sayımı yapılmıştır.

3.2.6.2. Sitotoksosite Analizleri (MTT Testi)

Sitotoksosite; kullanılan ilaç etken maddesinin ya da formülasyonunun canlı hücreler üzerindeki toksisitesini gösterir [118].

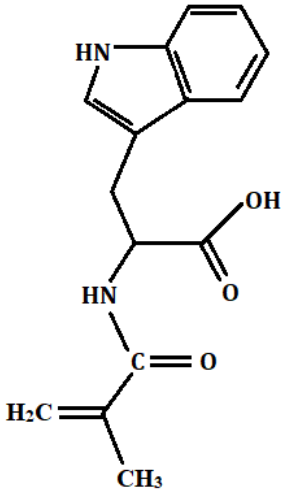
Bu tez çalışmasında *in vitro* analiz olarak MTT analiz tekniği [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] kullanılmıştır. Bu teknikte MTT formazana indirgenir, bu sırada meydana gelen renk kalorimetrik olarak hesaplanır. Oluşan formazan miktarı canlı hücre sayısını verir. Tez çalışması kapsamında ilaç (RTV), RTV baskılanmamış ve RTV baskılanmış nanopartiküllerin sitotoksosite çalışmaları L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 24 ve 48 saat için % hücre canlılığı tespit edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

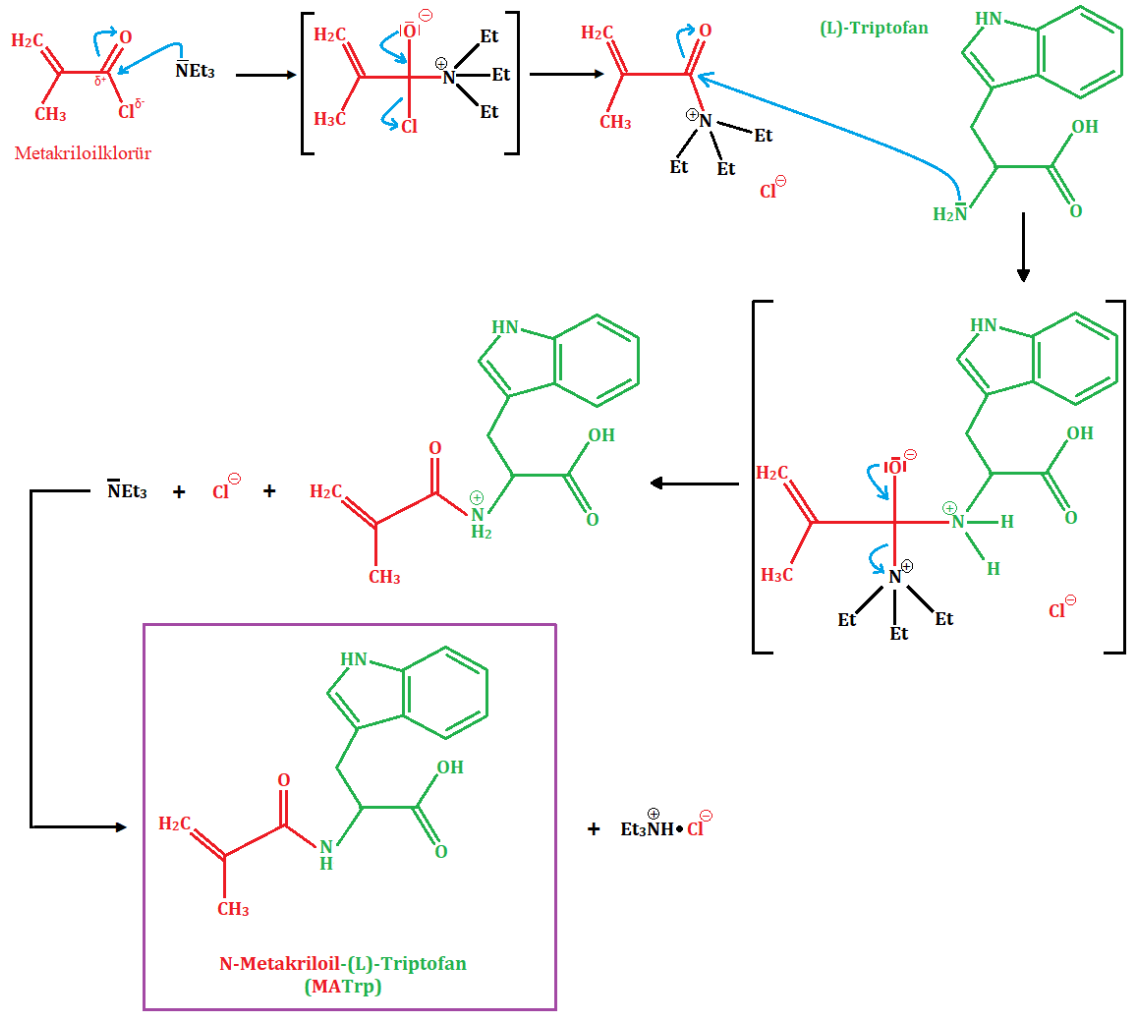
4.1. RTV Baskılanmış poli(HEMA-MATrp) Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

N-metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) (Şekil 4.1), kalıp molekül Ritonavir (RTV) ile kompleks oluşturması amacı ile fonksiyonel monomer olarak seçilmiştir. MATrp-RTV ön kompleksleştirme tepkimesinin ilk aşamasında metakriloil ve L-triptofan kullanılarak MATrp monomeri sentezlenmiştir. Tepkime, ilk olarak trietilaminin (NEt_3) metakriloil klorüre atak yapması ile başlar. Trietilamin, amin tuzu oluşumunu önler ve tepkimenin gerçekleştiği süre boyunca pH'ın bazik olmasını sağlar. MATrp'ın sentezlenmesi sırasında gerçekleşen tepkime mekanizması aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.2). Daha sonra, sentezlenen fonksiyonel MATrp monomeri RTV ile mol oranı 1:1 olarak kompleksleştirilmiştir. Sonraki kısımda, MATrp-RTV kompleksi HEMA-EGDMA monomerleriyle polimerleştirilmiştir. Baskılanmayan nanopartiküller RTV olmadan benzer şekilde hazırlanmıştır.

RTV baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküller, mini-emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır. Sentezlenen nanopartiküller, FTIR, SEM, Zeta boyut analizi ve yüzey alanı ile karakterize edilmiştir.



Şekil 4. 1. N-Metakriloil-(L)-triptofan (MATrp) kimyasal yapısı.

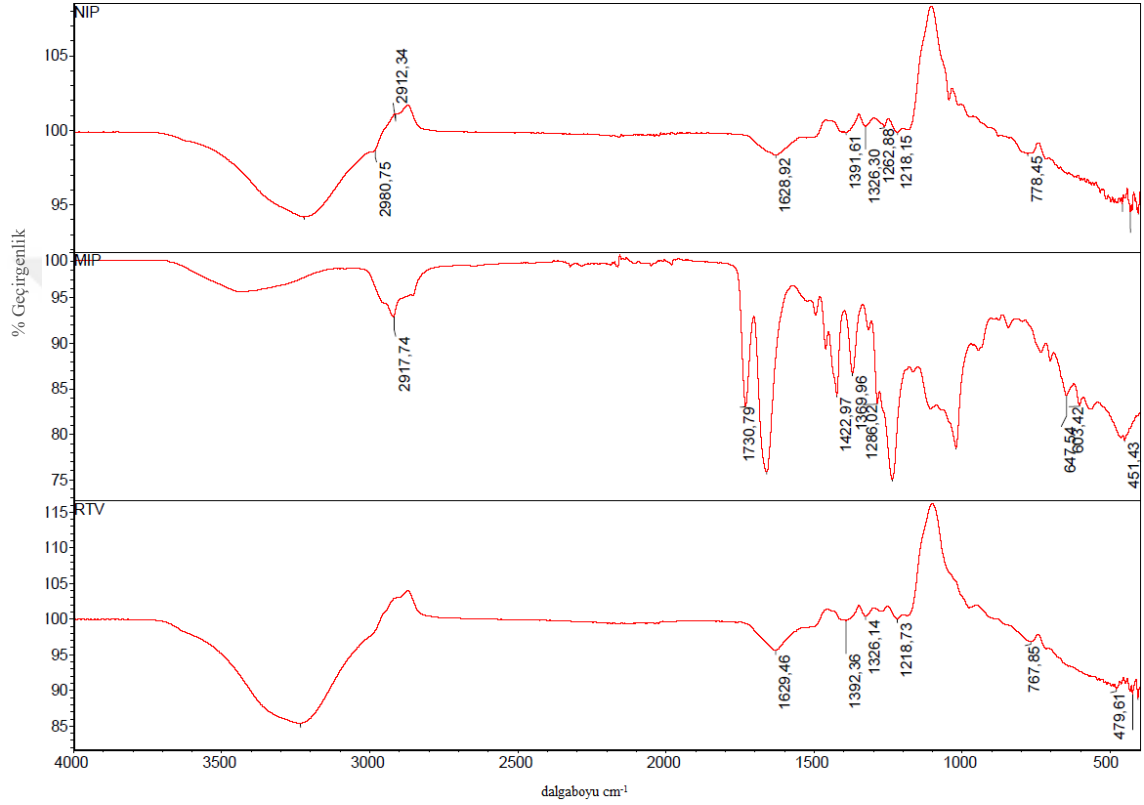


Şekil 4. 2. MATrp'nin sentez tepkimesinin mekanizması.

4.1.1. FTIR Çalışmaları

RTV baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin ve RTV'in sahip olduğu fonksiyonel grupları ve kimyasal bağları belirleyebilmek amacıyla, FTIR spektrofotometresi kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda gözlemlenen MIP, NIP ve RTV'e ait FTIR spektrumları Şekil 4.3'te verilmiştir. MIP ve NIP nanopartiküller, aynı koşullarda sentezlendiği ve aynı fonksiyonel gruplara sahip olduğu için FTIR spektrumları da birbirine benzerdir. MIP ve NIP nanopartiküller için $1628\text{-}1629\text{ cm}^{-1}$ dalga boylarında gözlenen pik alkendeki C=C gerilmelerine aittir. Karboksilik asit için O-H bükülme bandından kaynaklanan pik $1391\text{-}1392\text{ cm}^{-1}$ dalga boyunda görülmektedir.

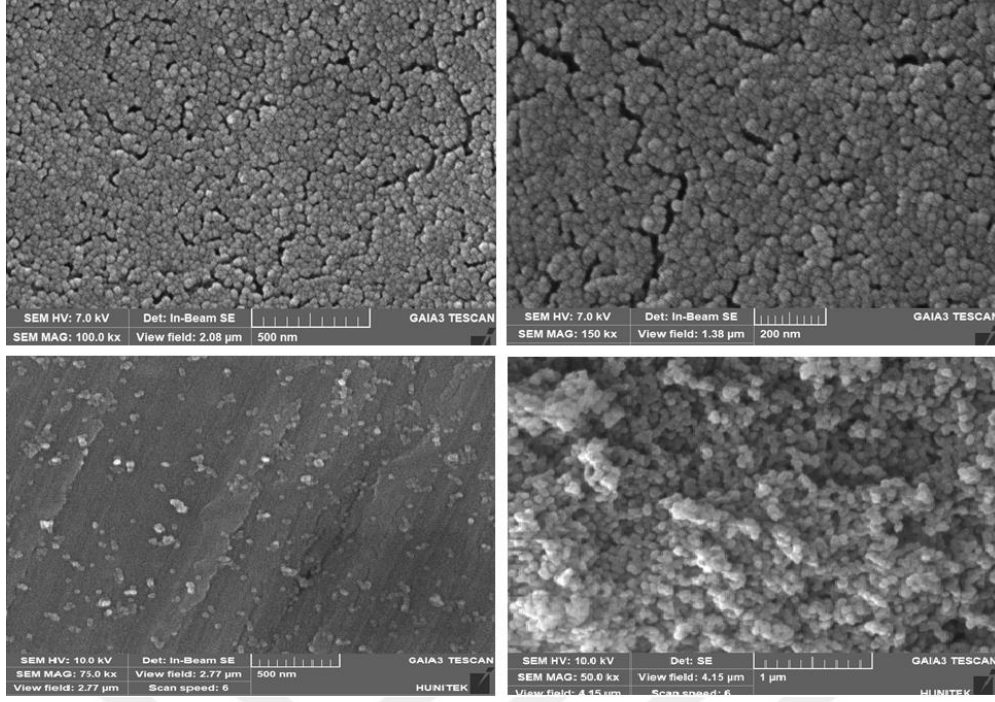
Spektrumda 1218 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen pik ester grubundaki C-O gerilmelerinden kaynaklanır. Bu da 2-HEMA'nın varlığını açıklar niteliktedir. MIP nanopartikülde RTV mevcut olduğundan, RTV'e ait spesifik pikler 2900 cm^{-1} civarında gözlenmektedir. Bu spesifik pik N-H gerilmesine aittir ve ilacın nanopartikülün içerisinde olduğunun bir göstergesidir. Sonuç olarak, tüm bu veriler ele alındığında moleküler baskılama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği söylenebilir.



Şekil 4. 3. RTV ilacı ve NIP, MIP nanopartiküllerine ait FTIR spektrumu.

4.1.2. Yüzey Morfolojisi

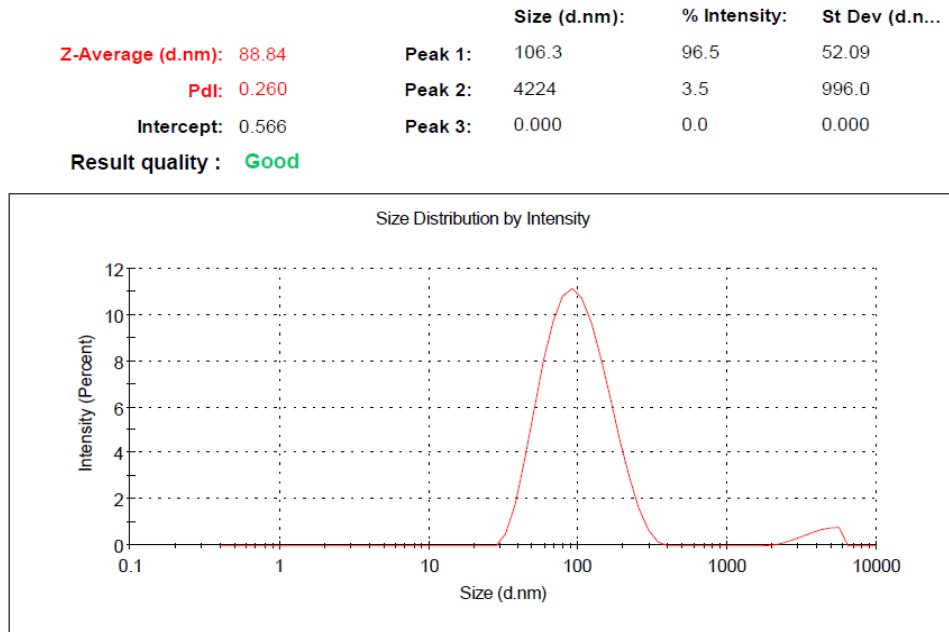
RTV baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküllerinin (MIP) morfolojik özellikleri ve yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımı ile gözlemlenmiştir. RTV baskılanan p(HEMA-MATrp) nanopartiküllerin morfolojik yapısını gösteren SEM görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinden anlaşılabileceği gibi, emülsiyon polimerizasyonu sonucu elde edilen RTV yüklü nanopartiküllerin ortalama büyüklüklerinin ortalama 40-45 nm olduğu, küresel formda ve gözeneksiz yüzeye sahip oldukları anlaşılmaktadır.



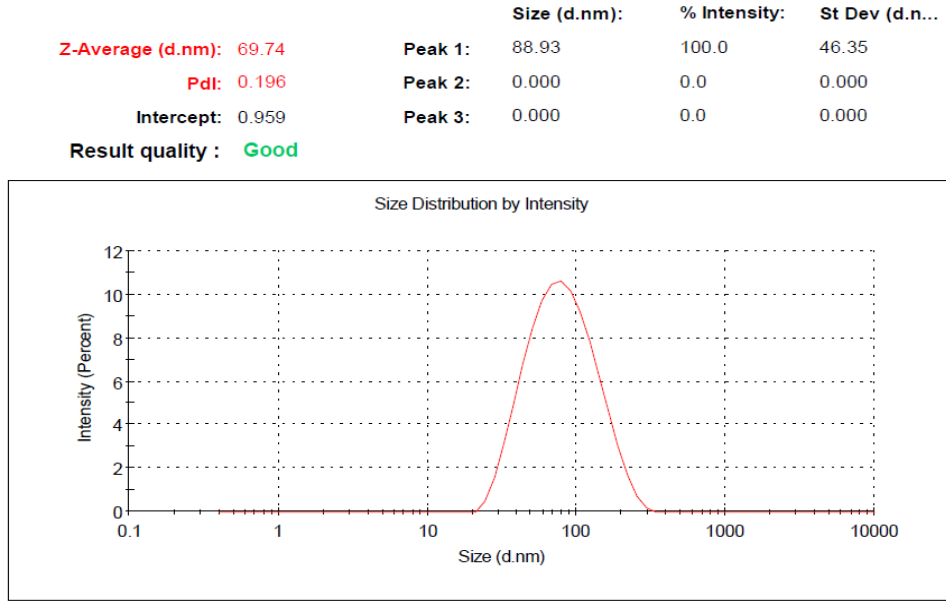
Şekil 4. 4. RTV baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartikülleri SEM görüntüleri.

4.1.3. Zeta Boyut Analizi

Şekil 4.5 ve 4.6’da sırasıyla RTV baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin zeta boyut analizlerine ait veriler yer almaktadır.



Şekil 4. 5. MIP nanopartiküllerin Zeta boyut dağılımı grafiği.



Şekil 4. 6. NIP nanopartiküllerin Zeta boyut dağılımı grafiği.

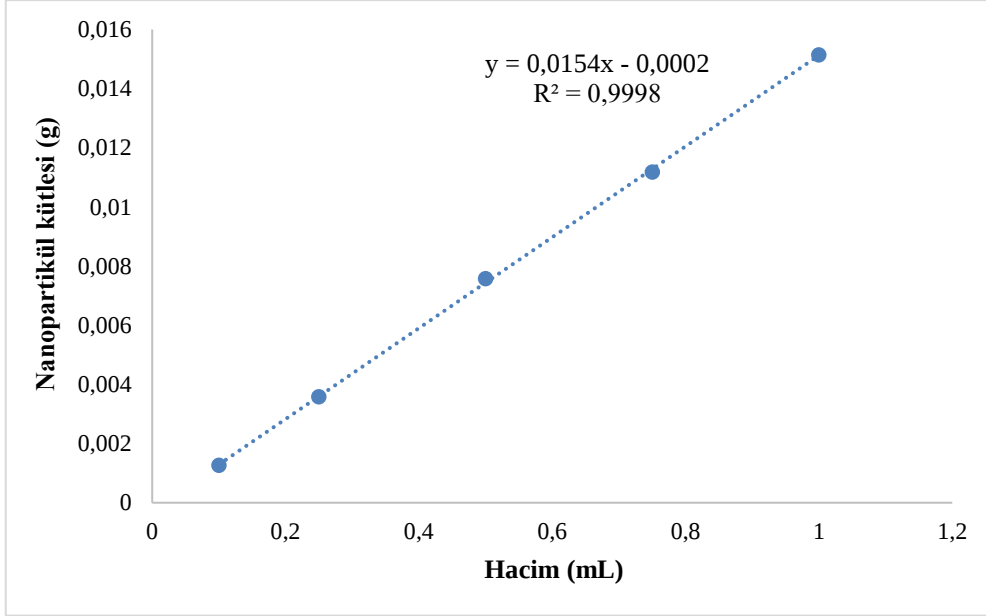
RTV baskılanmış nanopartiküllerin zeta boyut analizi ölçümleri üç kez tekrar edilmiştir (Çizelge 4.1). Alınan bu üç ölçüm sonucunda RTV baskılanmış nanopartiküllerin (MIP) boyutu ortalama 88.46 nm'dir ve polidispersitesi 0.279 olarak bulunmuştur. Baskılanmamış nanopartiküllerin (NIP) zeta boyut analizi ölçümleri üç kez tekrar edilmiştir. Alınan bu üç ölçüm sonucunda baskılanmamış nanopartiküllerin boyutu ortalama 69.53 nm'dir ve polidispersitesi ortalama 0.195 olarak bulunmuştur. Polidispersite (PdI) değerleri partikül boyutu dağılımının homojen olup olmadığının bir göstergesidir. $PdI < 0.7$ olması durumunda homojen bir partikül dağılımı mevcuttur [119]. Sentezlenen MIP nanopartiküllerin PdI değeri yukarıda belirtildiği üzere 0.279 olarak ölçülmüştür. Ölçülen polidispersite değeri 0.7'den küçük olduğu için, homojen bir dağılımın söz konusu olduğu söylenebilir.

Çizelge 4. 1. MIP ve NIP nanopartiküllere ait partikül çapı ve polidispersite sonuçları.

Türü	Partikül Çapı (nm)	Boy Dağılımı (PdI)
MIP	88.46 ± 1.32	0.279 ± 0.014
NIP	69.53 ± 0.21	0.195 ± 0.006

4.1.4. MIP Nanopartikülün Spesifik Yüzey Alanı

RTV baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartikülünün yüzey alanı hesaplanırken, Zeta boyut analizi cihazı ile belirlenen nanopartikülün çapı 88.46 nm ve 1 mL'deki nanopartikül sayısını veren matematiksel ifade kullanılmıştır [116,117].

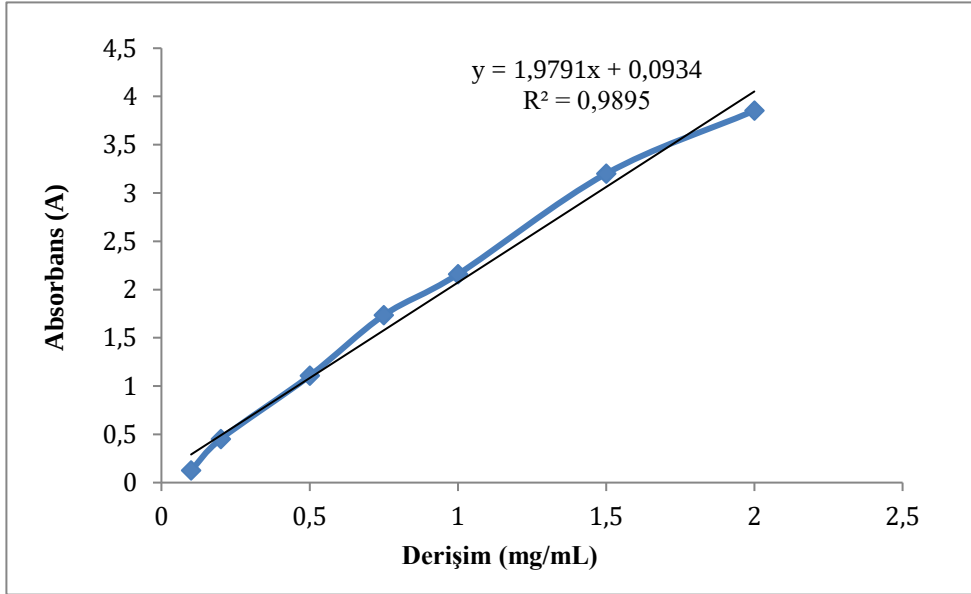


Şekil 4. 7. RTV baskılanmış p(HEMA-MATrp) nanopartikülün hacim-kütle grafiği.

Eşitlik 3.1'de verilen denklem kullanılarak 1 mL'deki partikül sayısı (N) 3.93817×10^{14} olarak hesaplanmıştır. Eşitlik 3.2'de verilen denklem kullanılarak kürenin yüzey alanı (A) 2.4571×10^{-14} olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.7'de verilen kalibrasyon grafiği kullanılarak 1 mL'deki kuru nanopartikül miktarı 0,0154 g olarak alınmıştır. Eşitlik 3.3'te verilen denklemde yerine konularak spesifik yüzey alanı $628.34 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur.

4.2. RTV in vitro Salım Çalışmaları

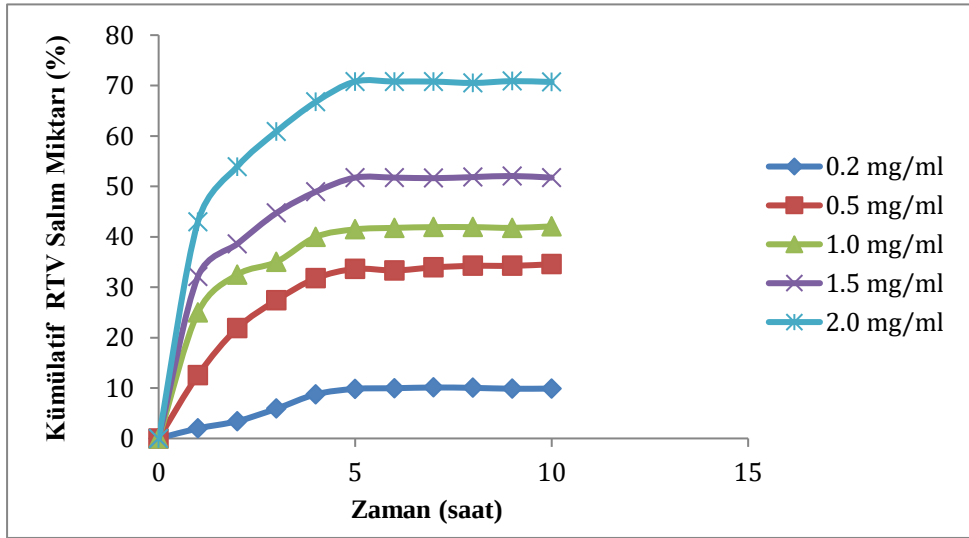
İlaç salım çalışmaları kapsamında RTV yüklü nanopartiküller için farklı pH, derişim ve sıcaklıklarda ilaç salım profilleri incelenmiştir. UV spektrofotometre kullanılarak 238 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine ait standart kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8. RTV çözeltisine ait kalibrasyon grafiği.

4.2.1. Yüklenen İlaç Derişiminin RTV Salımına Etkisi

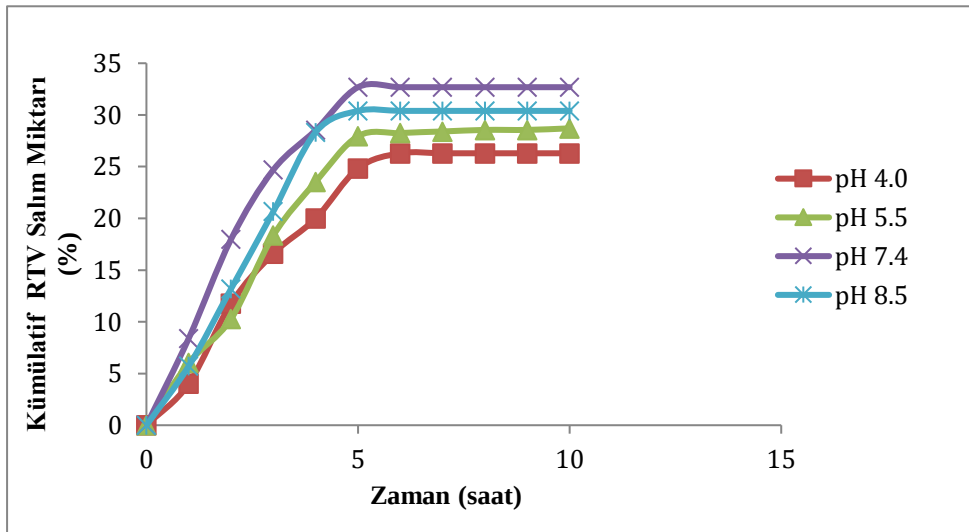
Sisteme yüklenen ilaç miktarı salım çalışmalarında önemli bir parametredir. Bu çalışmada RTV derişiminin salıma etkisini incelemek üzere 0.2 – 2.0 mg/mL derişim aralığında, beş farklı derişimde ilaç yüklemesi yapılmıştır. Şekil 4.9’da RTV derişiminin ilaç salımı üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Grafikten de görüldüğü üzere RTV yükleme miktarının artması, baskılanmış nanopartikülden salınan RTV miktarını artırmıştır. Elde edilen verilere göre, 2.0 mg/mL derişimde gözlemlenen kümülatif RTV miktarı 10 saatin sonunda yaklaşık %71 olarak belirlenmiştir ve 5. ölçümden itibaren sabit değerler göstermiştir. İlaç miktarının artışı sonucunda derişim gradyenti oluşmuştur. Bu da RTV’in difüze edilmesi için gerekli olan itici gücün artışı ile açıklanabilir.



Şekil 4. 9. Yüklene ilaç (RTV) derişiminin RTV salımına etkisi (37°C, pH 5.5).

4.2.2. pH'ın RTV Salımına Etkisi

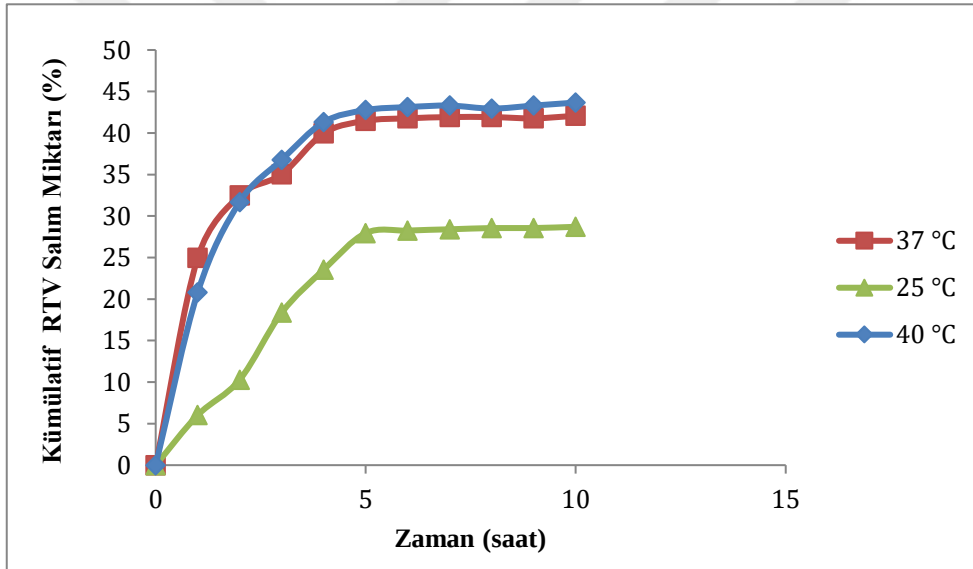
Salım çalışmalarında pH derişimi de ilacın salımını etilemektedir. Bu çalışmada ortam pH'nın salıma etkisini gözlemlemek üzere dört ayrı pH değeriinde (4.0, 5.5, 7.4, 8.5) ilaç yükleme yapılmıştır. Şekil 4.10'da pH'ın ilaç salımı üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Bu grafiğ'e göre, salınan kümülatif % RTV miktarı pH 4.0'de en az salımın gerçekleştiğini gösterirken (%26), pH 7.4'de (%32) en fazladır. İlaç salım hızı beşinci saate kadar yüksek iken, beşinci saatten sonra salım hızının azaldığı ve salımın sabit kaldığı görölmektedir. Kümülatif % salım miktarlarından göröldüğü üzere ölçüm yapılan pH değeriindeki % salım miktarları birbirlerine oldukça yakındır ve kabul edilebilir değeriilerdir.



Şekil 4. 10. pH değeriinin RTV salımına etkisi (25°C, 1 mg/mL RTV).

4.2.3. Sıcaklığın RTV Salımına Etkisi

Sıcaklık, salım çalışmalarında oldukça önemli bir faktördür. Bu çalışmada sıcaklığın salıma etkisini incelemek üzere üç farklı sıcaklık değerinde (25°C, 37°C ve 40°C) ilaç yüklemesi yapılmıştır. Şekil 4.11’de sıcaklığın ilaç salımı üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Grafikten de görüldüğü üzere sıcaklığın artması, baskılanmış nanopartikülden salınan RTV miktarını artırmıştır. Elde edilen verilere göre, 37°C ve 40°C’da salınan kümülatif % RTV miktarları birbirine çok yakındır ve yaklaşık olarak %43 civarındadır. 25°C’ de gözlemlenen ilaç salım miktarı ise %28 bandındadır. 37°C ve 40°C’da salınan kümülatif % RTV benzer olmasından ve 25°C’de gözlenen salım miktarından oldukça fazla olmasından 40°C’nin RTV salımı için optimum koşulları sağladığı söylenebilir.



Şekil 4. 11. Sıcaklığın RTV salımına etkisi (pH 5.5, 1 mg/mL RTV).

4.3. Sentezlenen RTV Yüklü Nanopartiküllerin Salım Kinetiklerinin İncelenmesi

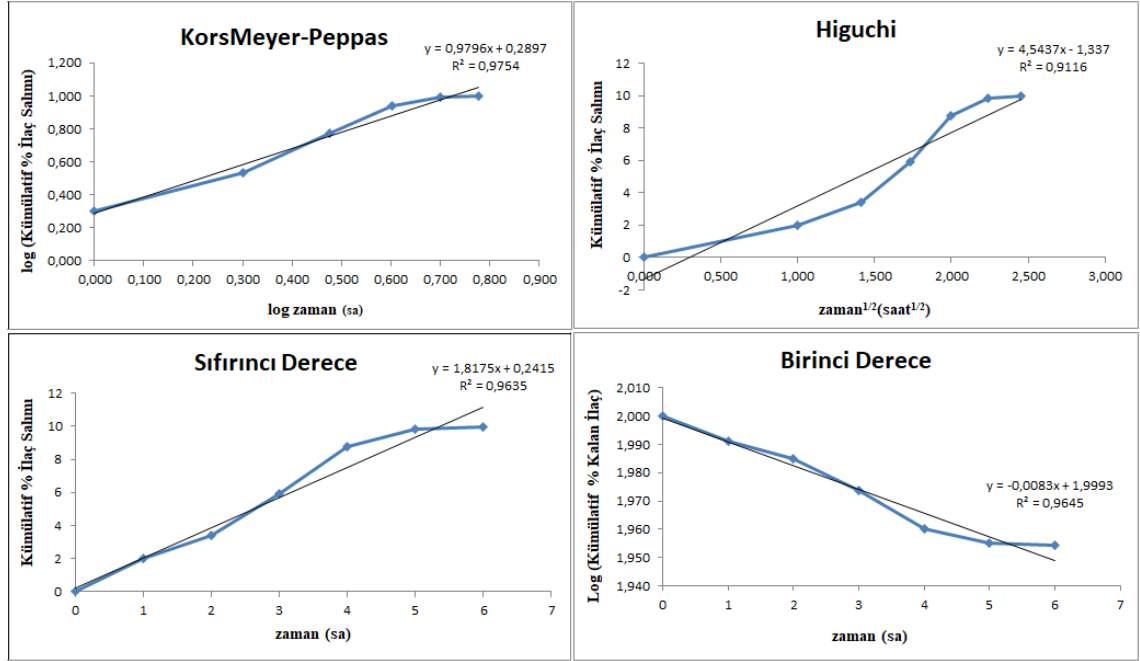
0.2, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 derişimlerinde gerçekleşen *in vitro* salım kinetikleri sıfırıncı derece, birinci derece, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi modelleri ile analiz edilmiş ve salım kinetiklerine ait grafikler elde edilmiştir (Şekil 4.12- 4.16). Bu salım kinetik modellerine ait matematiksel eşitlikler aşağıda verilmiştir.

$$M_t/M = k_m t^n \quad \text{Korsmeyer-Peppas Salım Kinetik Modeli} \quad (4.1)$$

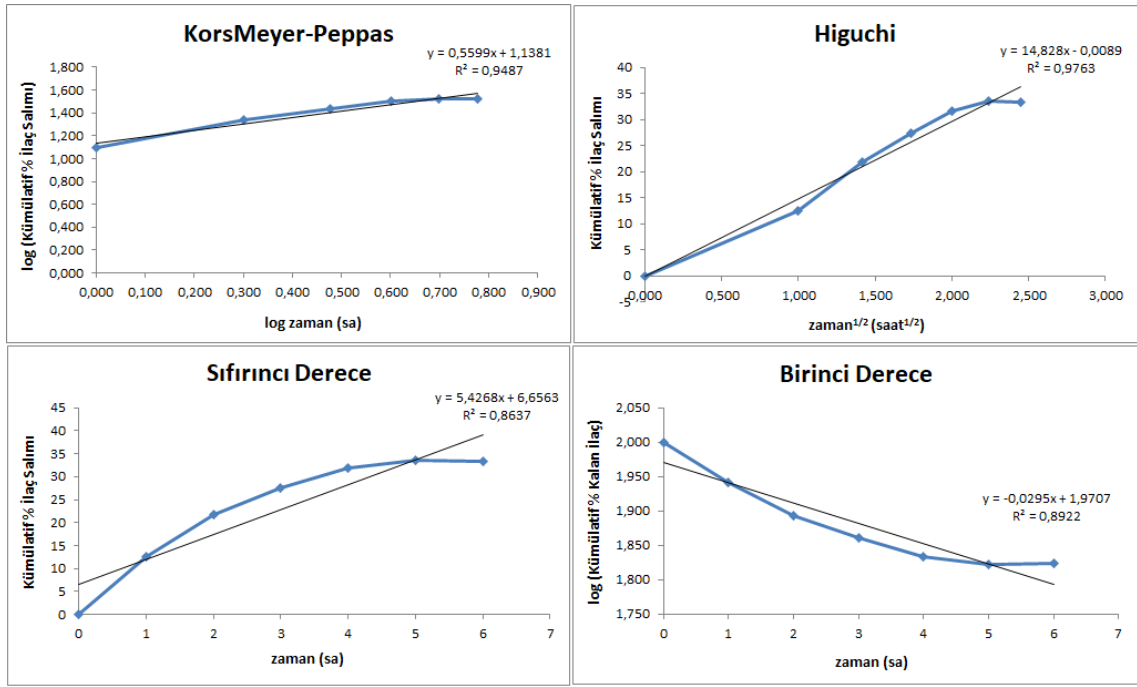
$$Q = A [D (2C - C_s) C_{st}]^{1/2} \quad \text{Higuchi Salım Kinetik Modeli} \quad (4.2)$$

$$C_t = C_0 + k_0 t \quad \text{Sıfıncı Derece Salım Kinetik Modeli} \quad (4.3)$$

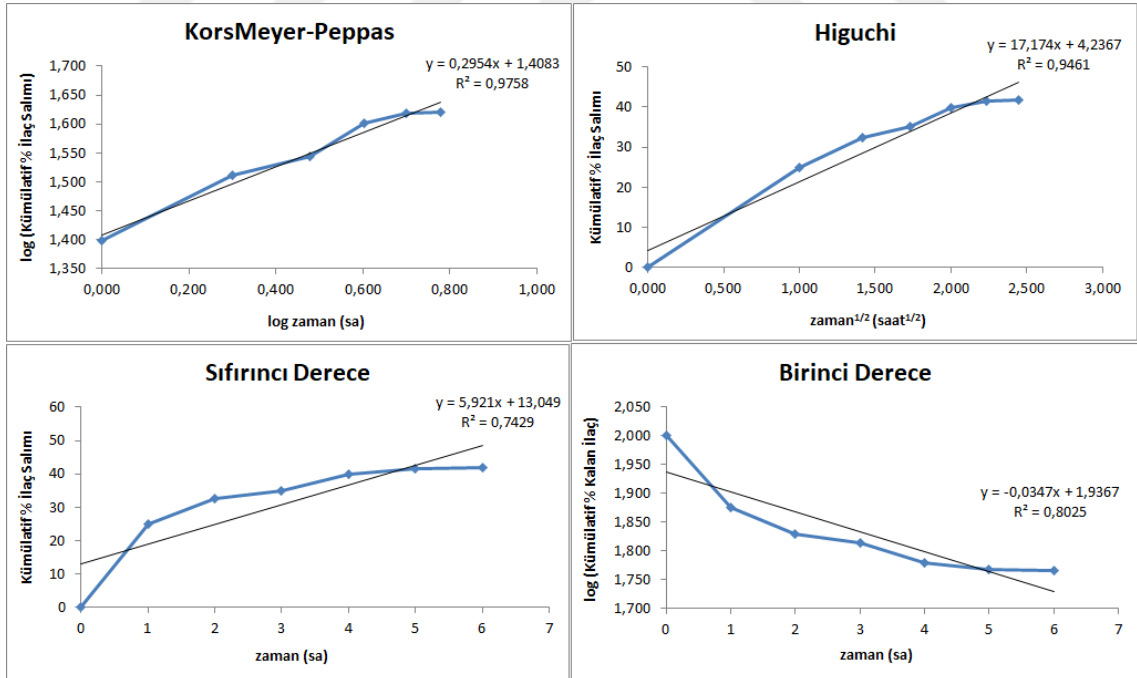
$$\ln C_t = \ln C_0 - k_1 t \quad \text{Birinci Derece Salım Kinetik Modeli} \quad (4.4)$$



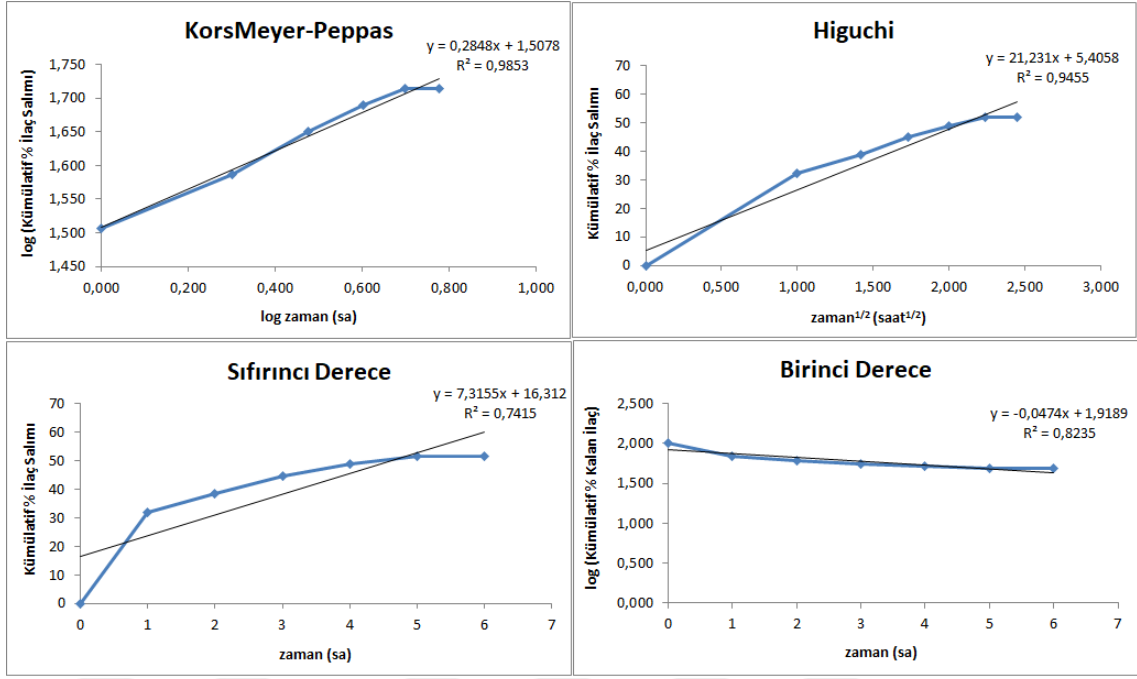
Şekil 4. 12. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 0.2 mg/mL).



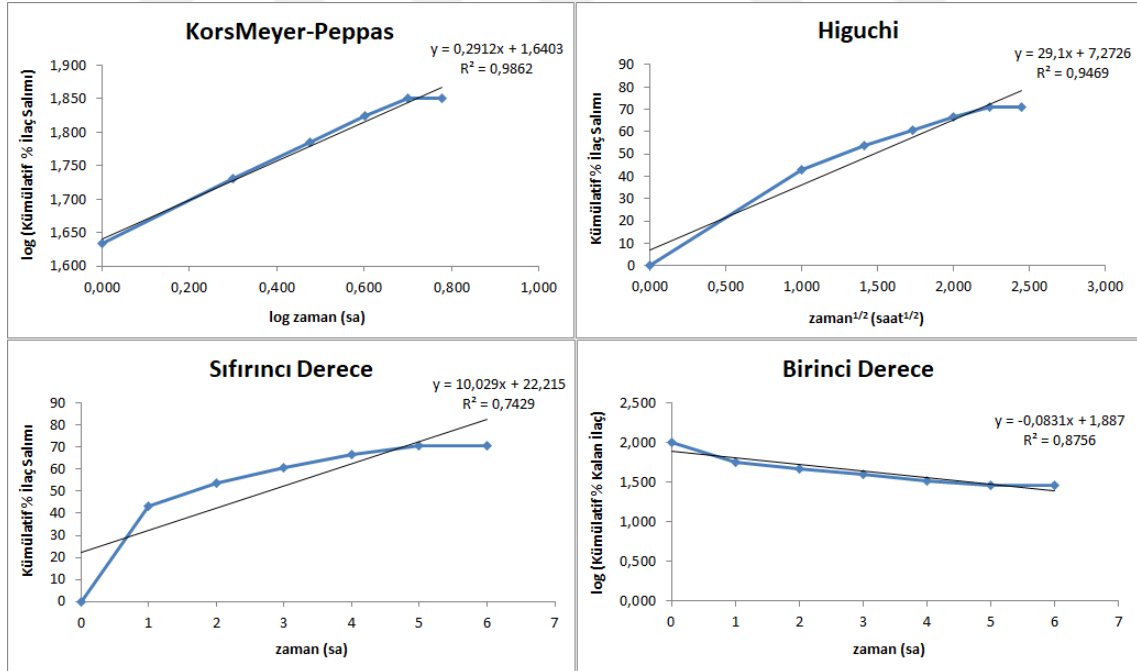
Şekil 4. 13. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 0.5 mg/mL).



Şekil 4. 14. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 1.0 mg/mL).



Şekil 4. 15. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 1.5 mg/mL).



Şekil 4. 16. RTV yüklü nanopartikülün salım kinetik grafikleri (Derişim: 2.0 mg/mL).

Beş farklı derişim için gerçekleştirilen incelemelere ait, her bir kinetik model için elde edilen R^2 değerleri ve ayrıca Korsmeyer-Peppas modeli için n değerleri Çizelge 4.2’ de mevcuttur.

Çizelge 4. 2. RTV yüklü nanopartiküllere ait kinetik analiz sonuçları.

Derişim	KorsMeyer-Peppas		Higuchi R^2	Sıfıncı Derece R^2	Birinci Derece R^2
	n	R^2			
0.2 mg/mL	0.980	0.975	0.911	0.963	0.964
0.5 mg/mL	0.560	0.948	0.976	0.863	0.892
1.0 mg/mL	0.295	0.975	0.946	0.742	0.802
1.5 mg/mL	0.285	0.985	0.945	0.741	0.823
2.0 mg/mL	0.291	0.986	0.946	0.742	0.875

Çizelge 4.3’ de küresel formda olan nanopartiküller için Korsmeyer-Peppas denklemindeki n değerine göre uygun olduğu salım mekanizmaları belirtilmiştir.

Çizelge 4. 3. Küresel formdaki nanopartiküller için Korsmeyer-Peppas denkleminde bulunan n değerine göre salım mekanizmaları.

İlaç Salım Mekanizması	Cisim Geometrisi	Salım Kuvveti (n)	n’in zamana karşı fonksiyonu
Fickian Difüzyonu	Küre	$n \leq 0.5$	$t^{0.5}$
Fickian Olmayan Difüzyon	Küre	$0.43 < n < 0.85$	$t^{0.43 < n < 0.85}$
Durum I	Küre	0.85	$t^{0.85}$
Süper Durum II	Küre	$n > 0.85$	$t^{n > 0.85}$

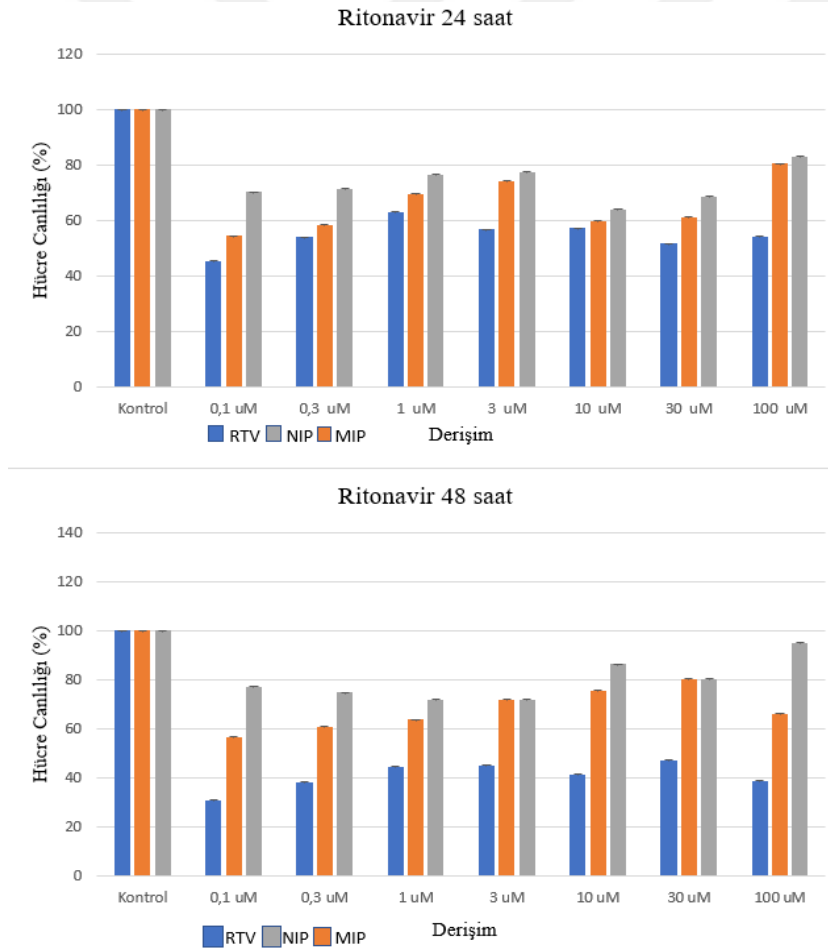
Çizelge 4.2’ de sentezlenen nanopartikül için elde edilen ilaç salım katsayılarına (n) ait sayısal değerler görülmektedir. Bu çizelgeye göre, yüklenen ilaç derişimleri (0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL) için n değerleri sırasıyla 0.98, 0.56, 0.29, 0.28 ve 0.29 olarak verilmiştir. Çizelge 4.3’e bakılarak salım mekanizmasının, yüklenen ilaç derişimi 0.2 mg/mL olduğunda Süper Durum II’ye ($n > 0.85$), diğer tüm derişimlerde ise Fickian difüzyonuna uygun salım davranışı gösterdiği anlaşılmaktadır. Süper Durum II salım davranışı şişebilen polimerlerde gözlenmesi beklenen bir davranıştır ve aynı zamanda difüzyon etkisinin varlığını da gösterir. Salım kinetik modellerine ait, Çizelge 4.2’de verilen regresyon katsayıları (R^2) karşılaştırıldığında, yüklenen ilaç salım hızı kinetiğinin en fazla Korsmeyer-Peppas salım davranışına uygun olduğu söylenebilir. Yüklenen ilaç derişimi arttıkça R^2 değerlerinde hem Higuchi, hem de Korsmeyer-Peppas modelinde yükselme gözlenmektedir. Yukarıdaki eşitliklerde verilmiş olan, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi modeline ait denklemlere bakıldığı zaman yüklenen ilaç miktarının artmasıyla salınan ilaç miktarının artacağı matematiksel ifadelerle desteklenmiştir. Sistem Korsmeyer-Peppas salım davranışına daha uygun olmasına rağmen, Higuchi salım kinetiğini de aynı anda desteklemektedir.

Korsmeyer-Peppas modelinin Higuchi modeline göre daha destekleyici olmasının nedeni, Higuchi salım davranışında difüzyonun tek yönlü olması ve polimerin şişme özelliğinin ihmal edilebilir düzeyde olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat bu tez çalışmasında sentezlenen nanopartiküllerde difüzyon her yöndedir ve nanopartiküller küresel formdadır. Buna ilaveten, sentezlenen nanopartiküllerin ihmal edilemeyecek düzeyde şişme özelliği gösterdiği, SEM ve Zeta boyut analizleriyle kanıtlanmıştır. Bu sebeplerden ötürü, Korsmeyer-Peppas salım kinetik modelinin daha elverişli olması beklenen bir durumdur. Sonuç olarak tüm bu kinetik modellere uygun davranış göstermesi, sentezlenen nanopartiküllerden kontrollü olarak ilaç salımının gerçekleştiğinin bir kanıtıdır.

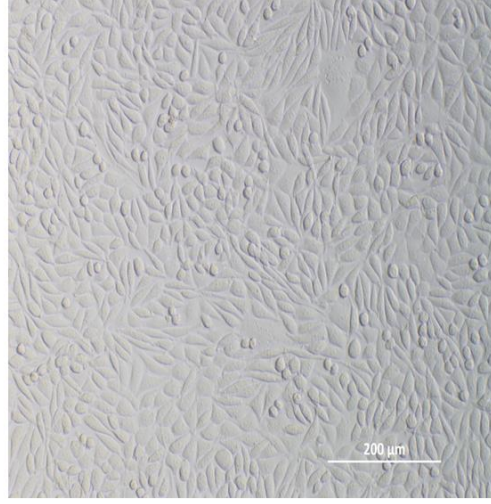
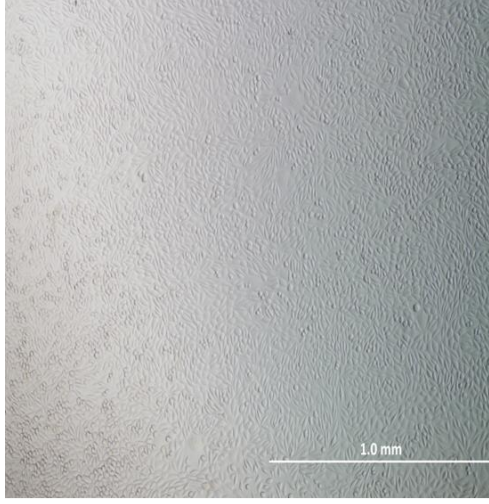
4.4. Sitotoksite Analizleri

Bu tez çalışması kapsamında sentezlenen RTV baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) ile RTV ilacının hücreler üzerindeki sitotoksiteleri L929 fare fibroblast hücre hattında MTT analizi (canlılık testi) ile belirlenmiştir. Test dört kez tekrar edilmiştir.

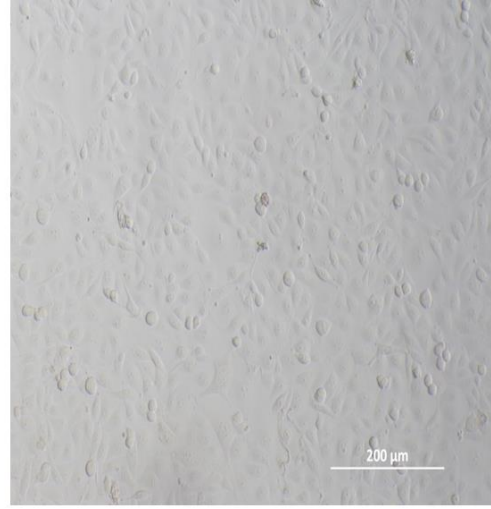
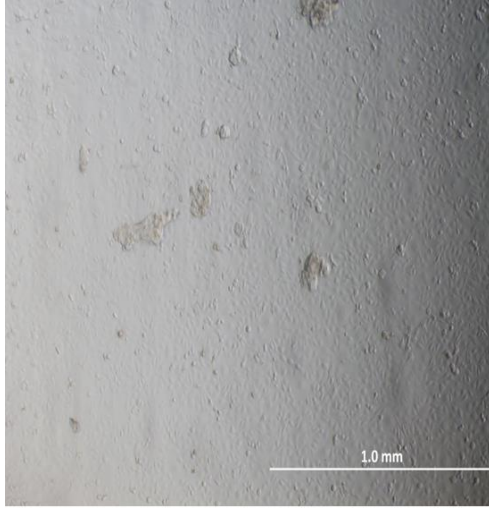
Analizlerde madde bulundurmayan besiyerindeki kontrol grubu (0 µg/mL) %100 canlı olarak alınmıştır. Sitotoksikite çalışmalarında nanopartikülün toksik olmadığı maksimum derişimi belirlemek için farklı derişimlerde nanopartiküller kullanılmıştır. L929 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda, farklı inkübasyon sürelerinin (24 ve 48 saat) ve derişimlerin (0.1, 0.3, 1.3, 10, 30 ve 100 µM) sonunda hücre canlılığı ile ilgili sonuçlar Şekil 4.17-4.20’de verilmektedir. 24 ve 48 saat sonrası hücre canlılıklarına bakıldığı zaman RTV baskılanmış nanopartikül (MIP) derişimleri artırıldığı zaman, % canlılığın en çok saf ilaçta azaldığı görülmüştür. RTV antiviral bir ilaç olduğu için, hücre canlılığındaki bu düşüş beklenmektedir. İlaç nanopartikül içine alındığı zaman, hücre canlılığı çok daha yüksektir. MIP ve NIP karşılaştırıldığında ise, içinde ilaç olduğundan dolayı, MIP nanopartikülde hücre canlılığı daha az gözlenmiştir. NIP’in %80’lere varan hücre canlılığı, sentezlenen nanopartiküllerin toksik olmadığıının en büyük kanıtıdır.



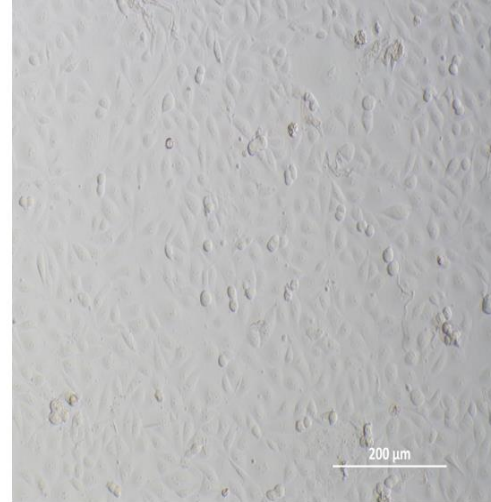
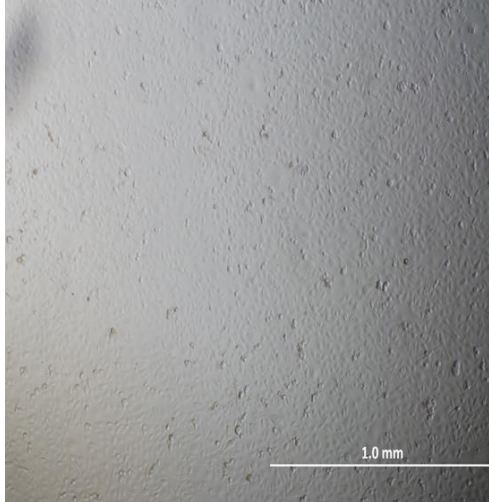
Şekil 4. 17. RTV, NIP ve MIP nanopartikülleri ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş L929 hücrelerinin % canlılık analizlerine ait grafik.



Kontrol

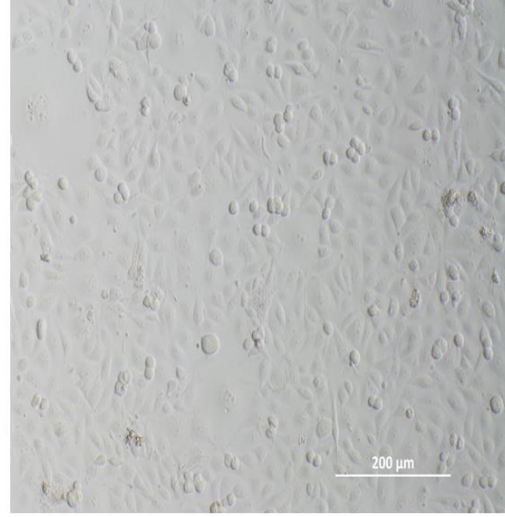
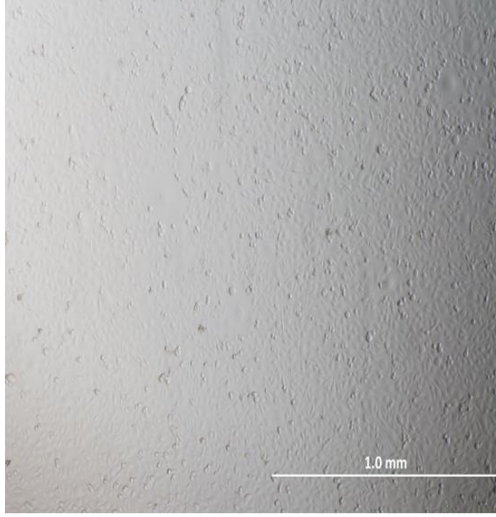


0.1 µM

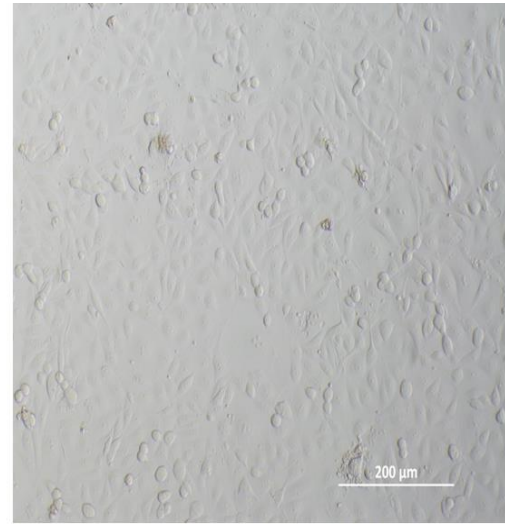
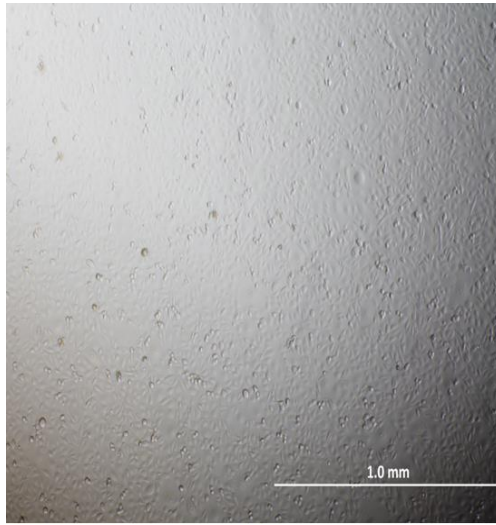


0.3 µM

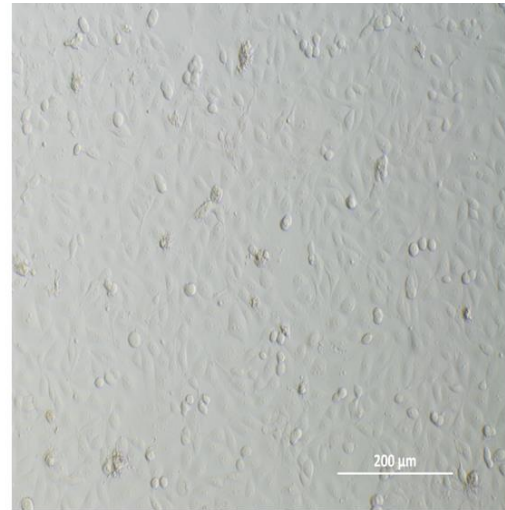
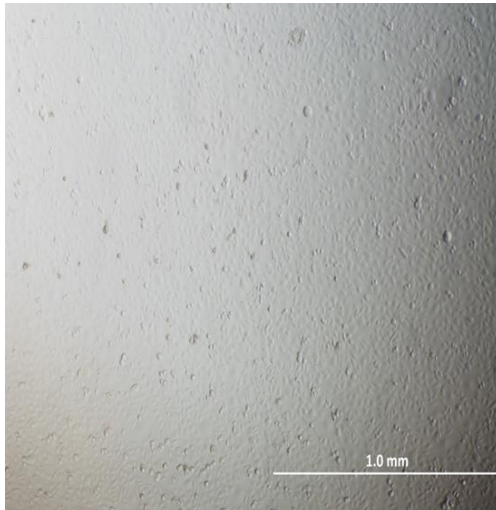
Şekil 4. 18. Ritonavir'e ait hücre canlılığı görüntüleri.



1 µM

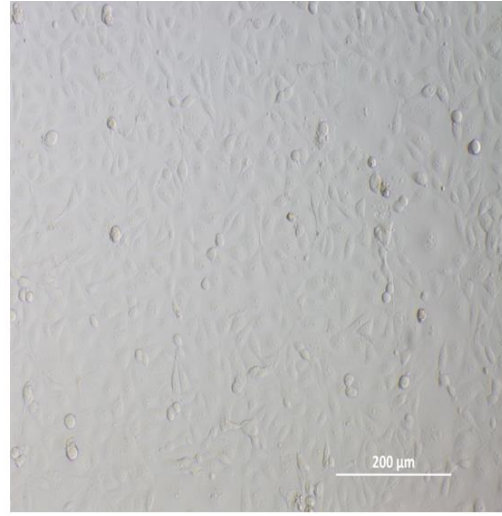
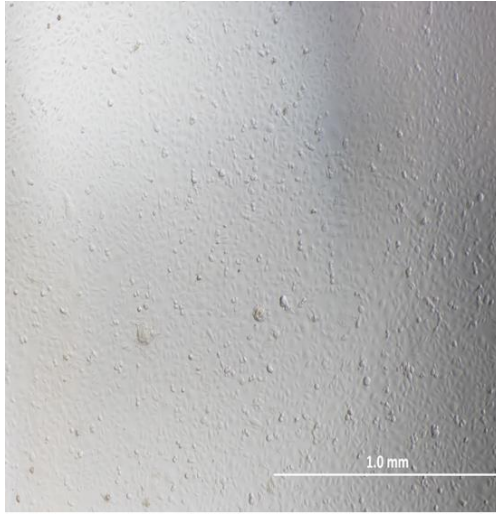


3 µM

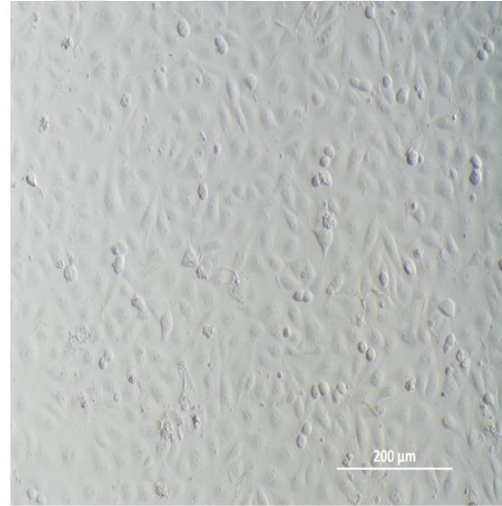
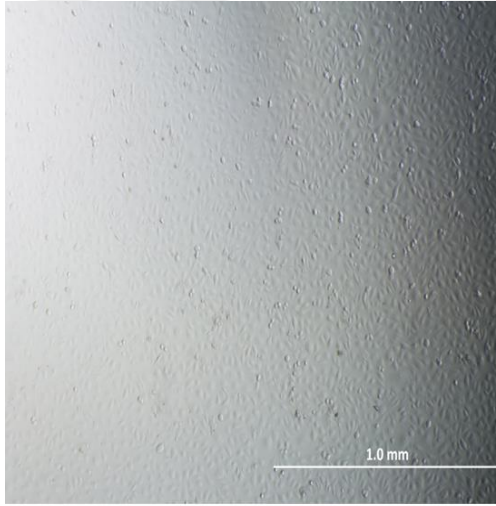


10 µM

Şekil 4. 19. Ritonavir'e ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).

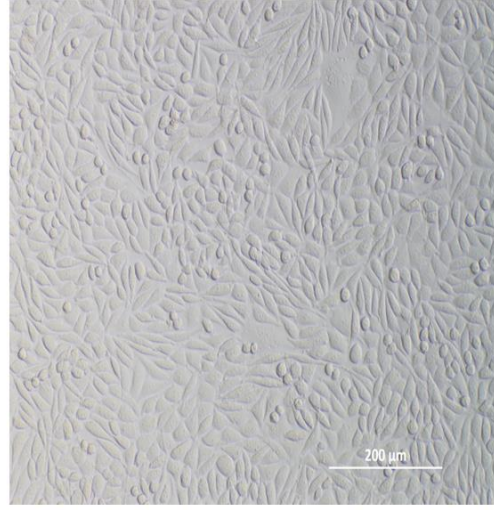
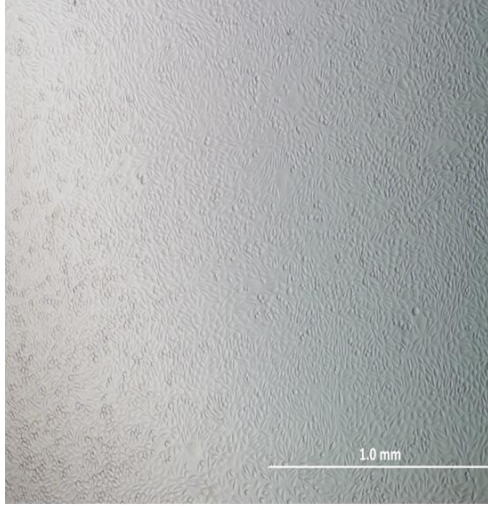


30 µM

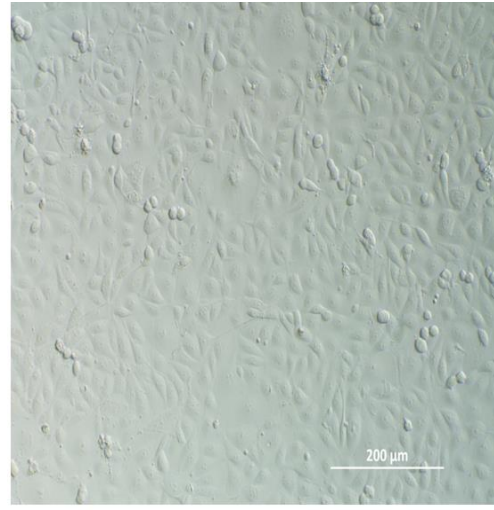


100 µM

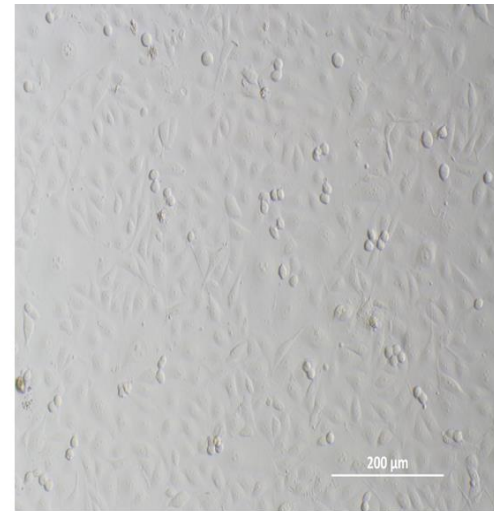
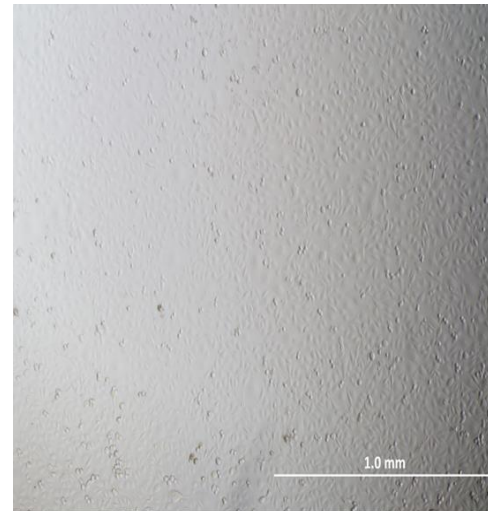
Şekil 4. 20. Ritonavir'e ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).



Kontrol

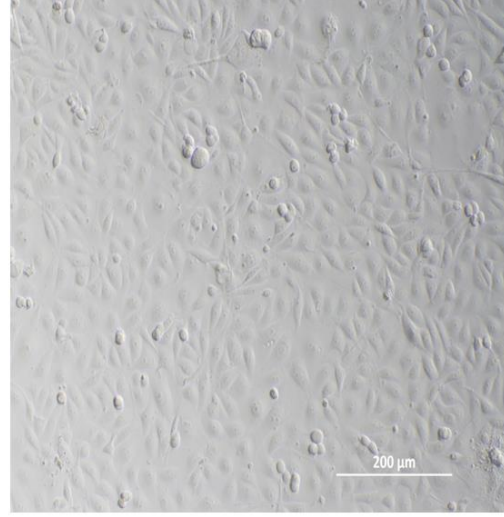
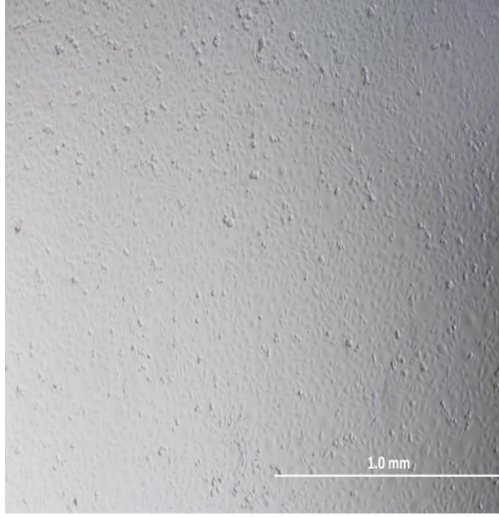


0.1 µM

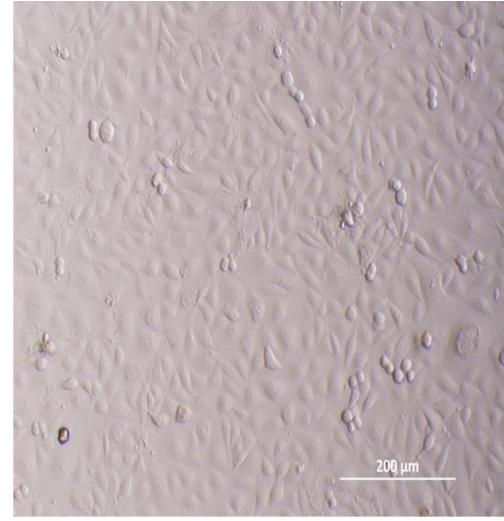
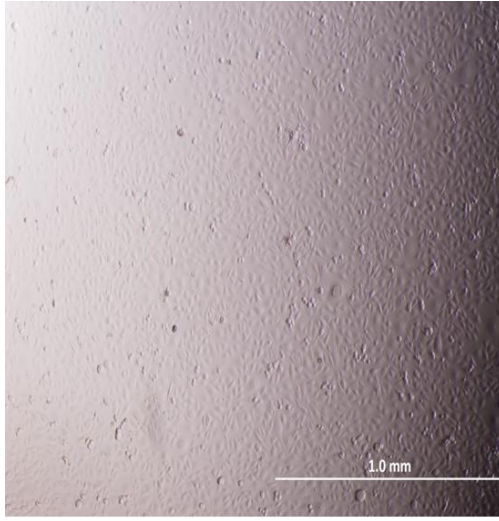


0.3 µM

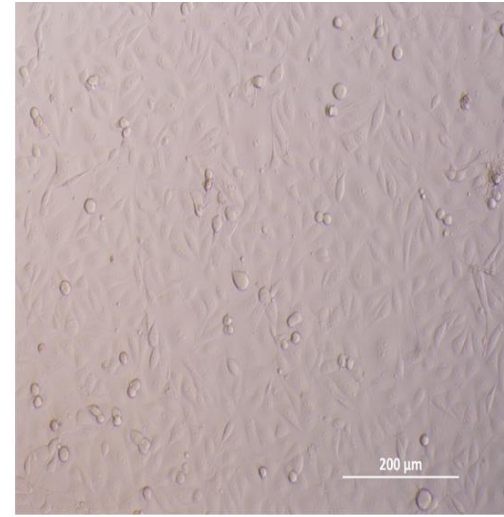
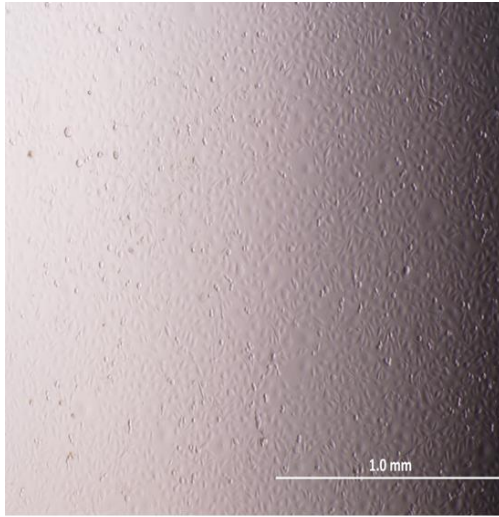
Şekil 4. 21. Ritonavir baskılanmış nanopartiküle (MIP) ait hücre canlılığı görüntüleri.



1 µM

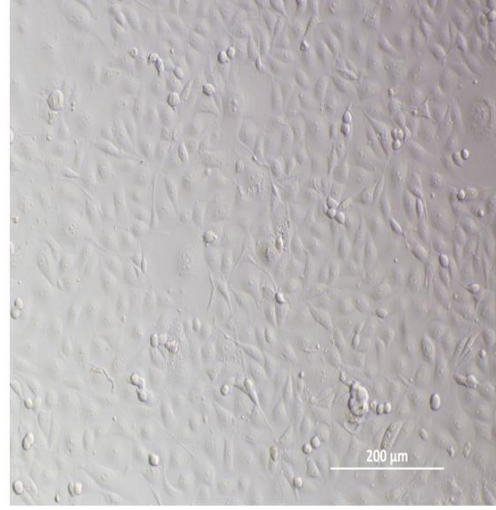
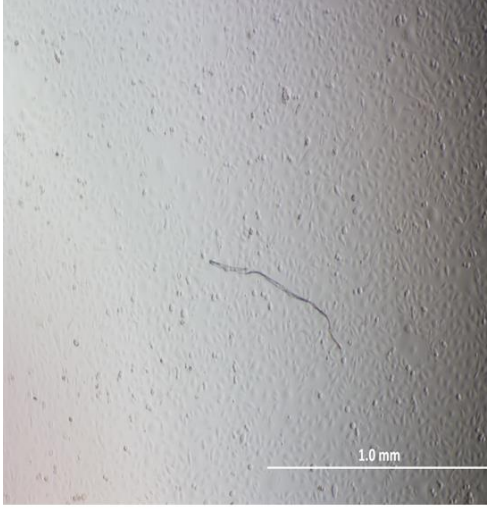


3 µM

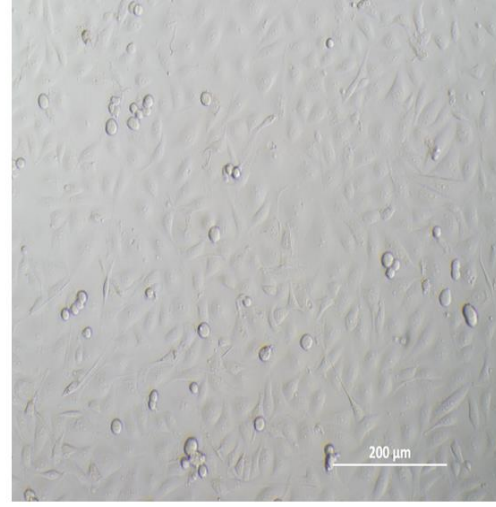
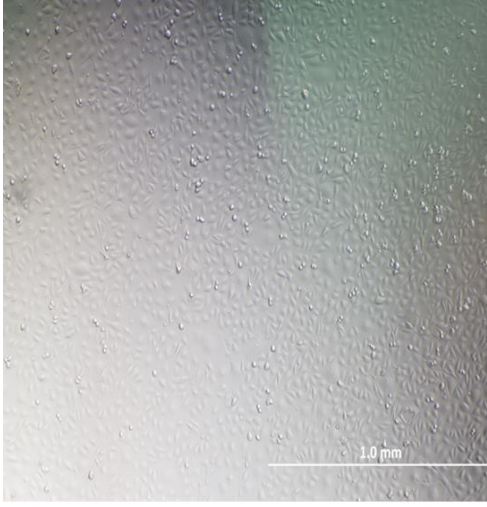


10 µM

Şekil 4. 22. Ritonavir baskılanmış nanopartiküle (MIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).

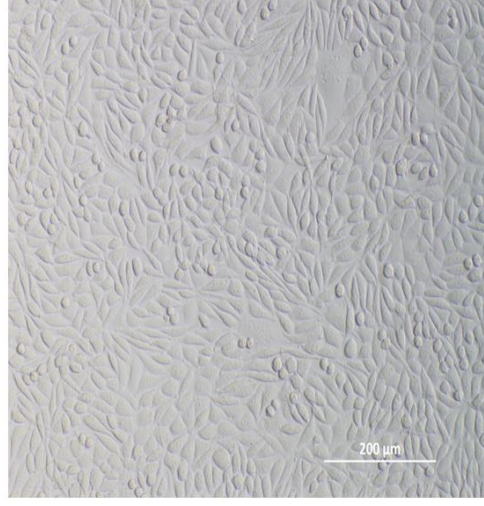
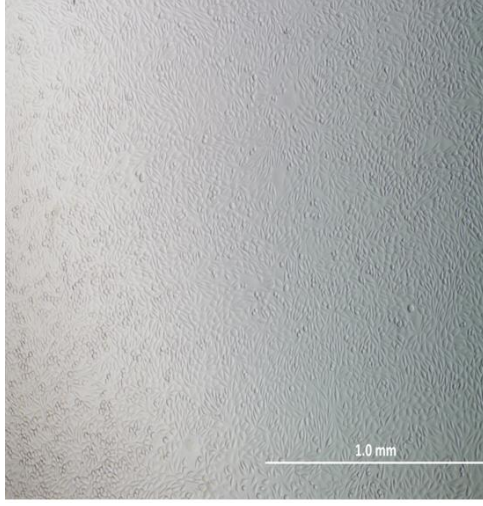


30 µM

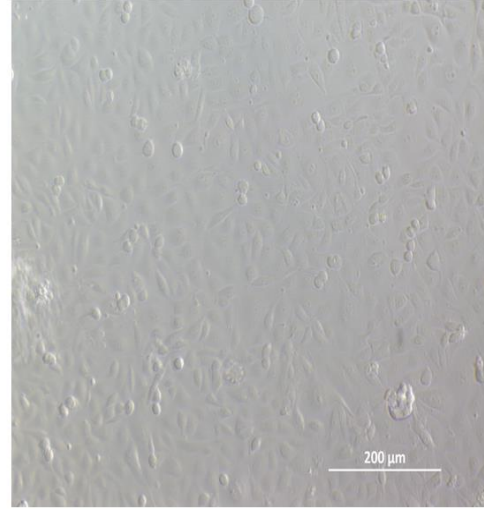


100 µM

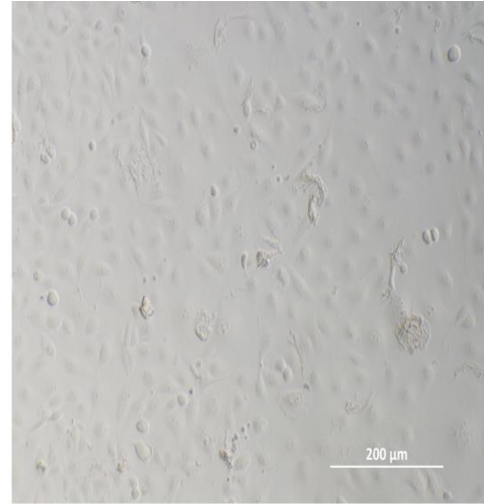
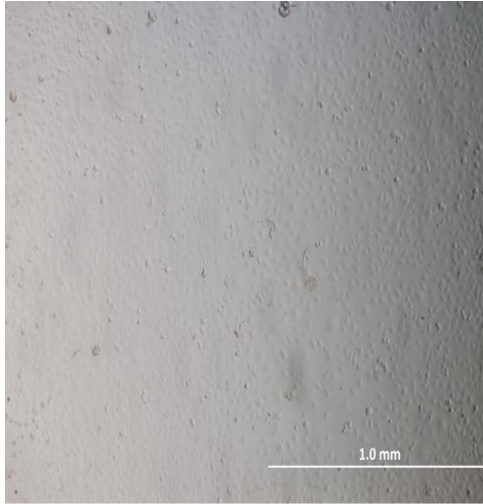
Şekil 4. 23. Ritonavir baskılanmış nanopartiküle (MIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).



Kontrol

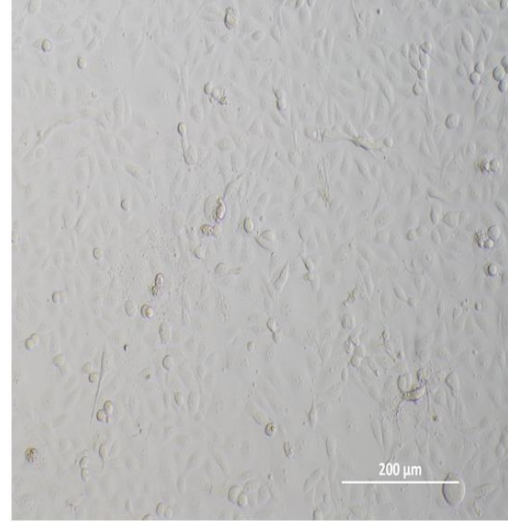
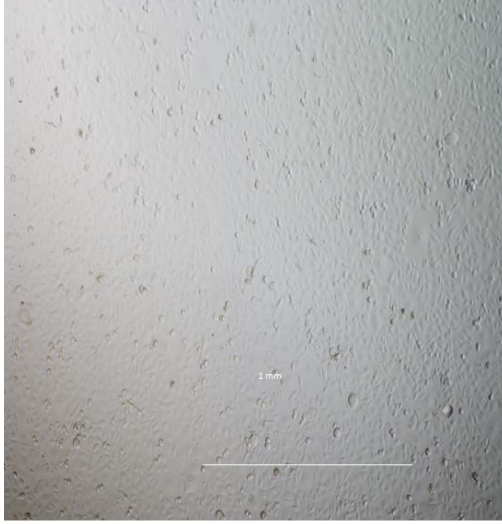


0.1 µM

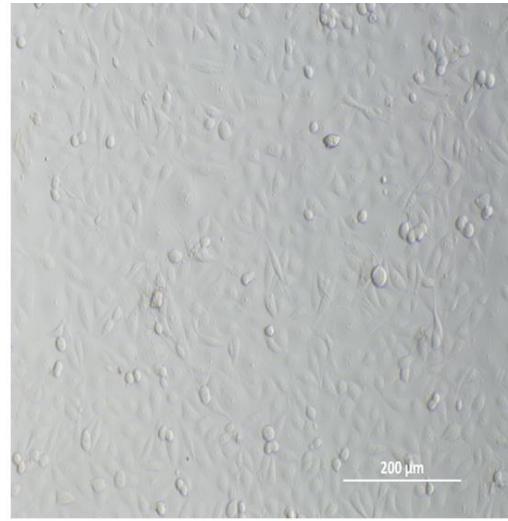
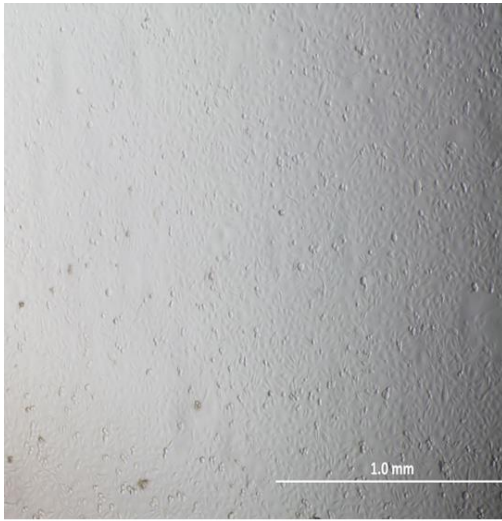


0.3 µM

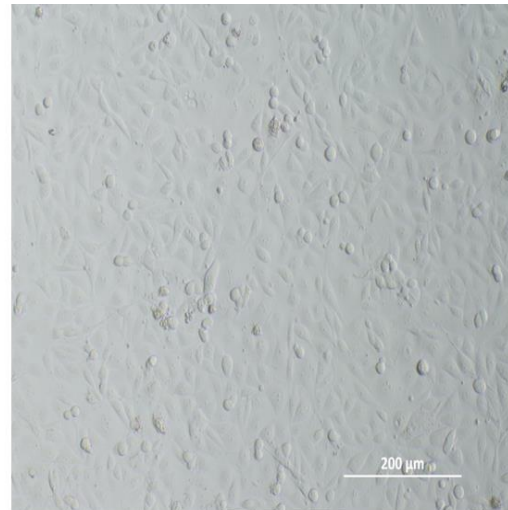
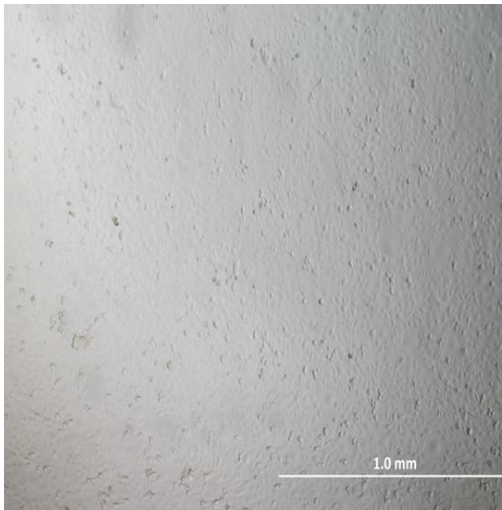
Şekil 4. 24. Ritonavir baskılanmamış nanopartiküle (NIP) ait hücre canlılığı görüntüleri.



1 µM

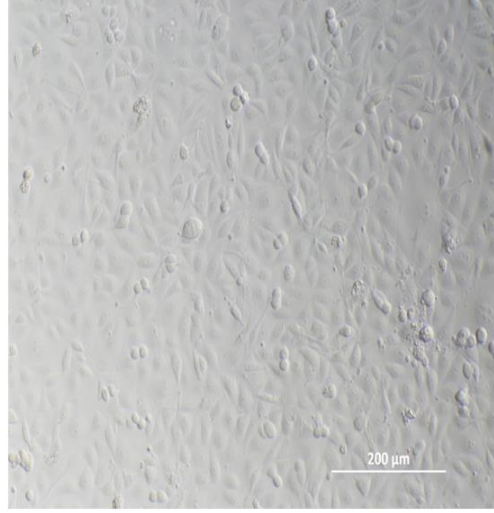
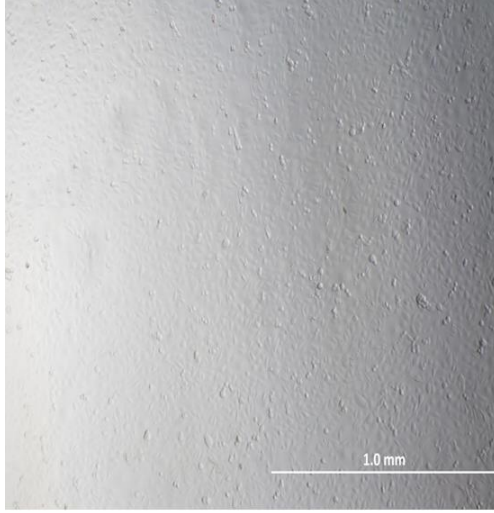


3 µM

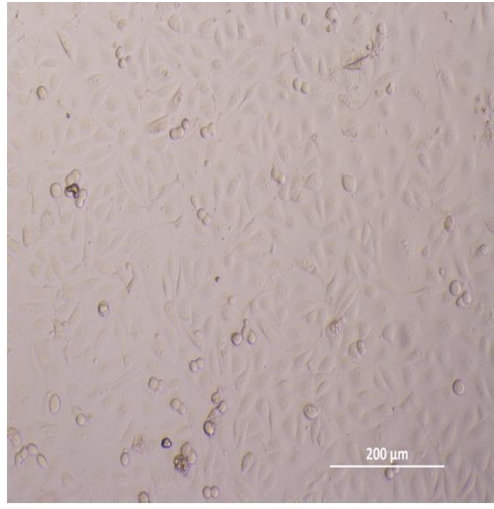
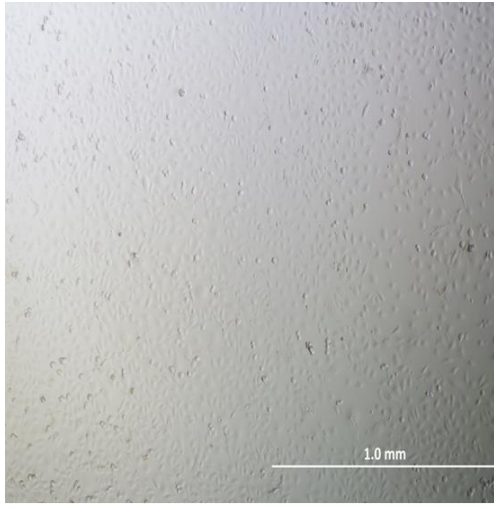


10 µM

Şekil 4. 25. Ritonavir baskılanmamış nanopartiküle (NIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).



30 µM



100 µM

Şekil 4. 26. Ritonavir baskılanmamış nanopartiküle (NIP) ait hücre canlılığı görüntüleri (devamı).

5. YORUM

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir:

- RTV baskılanmış poli(HEMA-MATrp) nanopartiküller, mini-emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır.
- Sentezlenen nanopartiküller, FTIR, SEM, Zeta boyut analizi ve yüzey alanı kullanılarak karakterize edilmiştir.
- Baskılanmış (RTV-MIP) ve baskılanmamış (NIP) nanopartiküllerin ve RTV'in yapısını belirlemek amacıyla, FTIR spektrofotometresi kullanılmıştır. MIP ve NIP nanopartiküller, aynı koşullarda sentezlendiği ve aynı fonksiyonel gruplara sahip olduğu için FTIR spektrumları benzerdir. Karboksilik asit grubunun neden olduğu O-H bükülme bandından kaynaklanan pik 1391-1392 cm^{-1} dalga boyunda görülmüştür. 1218 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen pik 2-HEMA'nın ester grubundaki C-O gerilmelerinden kaynaklanır. MIP nanopartiküldeki RTV'e ait spesifik pikler 2900 cm^{-1} civarında gözlenmektedir. Bu spesifik pik N-H gerilmesine aittir ve ilacın nanopartikülün içerisinde olduğunun bir göstergesidir.
- MIP nanopartikülün morfolojik özellikleri SEM yardımı ile gözlemlenmiştir. RTV yüklü nanopartiküllerin ortalama büyüklüklerinin ortalama 40-45 nm olduğu, küresel formda ve gözeneksiz yüzeye sahip oldukları anlaşılmaktadır.
- Zeta boyut analizi sonucunda, MIP nanopartikülün boyutu ortalama 88.46 nm'dir ve polidispersitesi ortalama 0.279 olarak bulunmuştur. NIP nanopartikülün boyutu ortalama 69.53 nm'dir ve polidispersitesi ortalama 0.195 olarak bulunmuştur. Sentezlenen MIP nanopartiküllerin PDI değeri 0.7'den küçük olduğu için, homojen bir dağılımın söz konusu olduğu söylenebilir.
- Matematiksel ifadeler kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda 1 mL'deki partikül sayısı 3.93817×10^{14} , kürenin yüzey alanı 2.4571×10^{-14} , nanopartikülün spesifik yüzey alanı ise 628.34 m^2/g bulunmuştur.
- İn vitro koşullarda, farklı derişim, pH ve sıcaklık değerlerinde RTV salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RTV yükleme miktarının artması, baskılanmış nanopartikülden salınan RTV miktarını artırmıştır. 2.0 mg/mL derişimde gözlemlenen kümülatif RTV salım miktarı 10 saatin sonunda yaklaşık %71 olarak belirlenmiştir ve 5. ölçümden itibaren sabit değerler göstermiştir.

- Kümülatif % RTV salım miktarı pH 4.0'de en az salımın gerçekleştiğini gösterirken (%26), pH 7.4'de (%32) en fazladır. İlaç salım hızı beşinci saate kadar yüksek iken, beşinci saatten sonra salım hızının azaldığı ve salımın sabit kaldığı görülmektedir.
- Sıcaklığın artması, baskılanmış nanopartikülden salınan RTV miktarını artırmıştır. 37°C ve 40°C'da kümülatif % RTV salım miktarları %43 civarındadır. 25°C'de gözlemlenen ilaç salım miktarı ise %28 bandındadır. 37°C ve 40°C'daki kümülatif RTV salım miktarının benzer olmasından ve 25°C'de gözlenen salım miktarından oldukça fazla olmasından 37-40°C bandında RTV salımı için optimum koşulların sağlandığı söylenebilir.
- 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 derişimlerinde gerçekleşen *in vitro* salım kinetikleri sıfırıncı derece, birinci derece, Korsmeyer-Peppas ve Higuchi modelleri ile analiz edilmiş ve salım kinetiklerine ait grafikler oluşturulmuştur. Yüklenen ilaç derişimleri (0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL) için n değerleri sırasıyla 0.98, 0.56, 0.29, 0.28 ve 0.29 olarak bulunmuştur. Bu verilere göre salım mekanizmasının, yüklenen ilaç derişimi 0.2 mg/mL olduğunda Süper Durum II'ye ($n > 0.85$), diğer tüm derişimlerde ise Fickian difüzyonuna uygun salım davranışı gösterdiği anlaşılmaktadır. Süper Durum II salım davranışı şişebilen polimerlerde gözlenmesi beklenen bir davranıştır ve aynı zamanda difüzyon etkisinin varlığını da gösterir. Salım kinetik modellerine ait regresyon katsayıları (R^2) karşılaştırıldığında, yüklenen ilaç salım hızı kinetiğinin en fazla Korsmeyer-Peppas salım davranışına uygun olduğu söylenebilir. Yüklenen ilaç derişimi arttıkça R^2 değerlerinde hem Higuchi, hem de Korsmeyer-Peppas modelinde yükselme gözlenmektedir. Korsmeyer-Peppas modelinin Higuchi modeline göre daha destekleyici olmasının nedeni, bu tez çalışmasında sentezlenen nanopartiküllerin difüzyonunun her yönde oluşu ve nanopartiküllerin sahip olduğu küresel geometridir. Sentezlenen nanopartiküllerin ihmal edilemeyecek düzeyde şişme özelliği gösterdiği, SEM ve Zeta boyut analizleriyle kanıtlanmıştır.

Bu nedenle, Korsmeyer-Peppas salım kinetik modelinin daha elverişli olması beklenen bir durumdur. Bu bulgular, kontrollü ilaç salımının gerçekleştiğini göstermektedir.

- Sentezlenen RTV baskılanmış (MIP) ve baskılanmamış (NIP) ile RTV ilacının hücreler üzerindeki sitotoksiteleri L929 fare fibroblast hücre hattında MTT analizi (canlılık testi) ile belirlenmiştir.

24 ve 48 saat sonrası hücre canlılıklarına bakıldığında RTV baskılanmış nanopartikül (MIP) derişimleri artırıldığı zaman, % canlılığın en çok saf ilaçta azaldığı görülmüştür. RTV antiviral bir ilaç olduğu için, hücre canlılığındaki bu düşüş beklenmektedir. İlaç nanopartikül içine alındığı zaman, hücre canlılığı çok daha yüksektir. MIP ve NIP karşılaştırıldığında ise, içinde ilaç olmasından kaynaklı, MIP nanopartikülde hücre canlılığı daha az gözlenmiştir. NIP'in %80'lere varan hücre canlılığı, sentezlenen nanopartiküllerin toksik olmadığını bir göstergesidir.

- Sonuç olarak, RTV baskılanmış nanopartiküller, RTV'in nazal yol ile taşınması için potansiyel bir salım sistemidir.



6. KAYNAKLAR

- [1] D.J. Porche, Ritonavir (norvirTM), *J. Assoc. Nurses AIDS Care.* 8 (1997) 81–83.
- [2] G. Vlatakis, L.I. Andersson, R. Müller, K. Mosbach, Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting, *Nat.* 1993 3616413. 361 (1993) 645–647.
- [3] J.H. Lee, Y. Yeo, Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers, *Chem. Eng. Sci.* 125 (2015) 75–84.
- [4] H. Calmet, D. Oks, A. Santiago, G. Houzeaux, A. Le Corfec, L. Deruyver, C. Rigaut, P. Lambert, B. Haut, J. Goole, Validation and Sensitivity analysis for a nasal spray deposition computational model, *Int. J. Pharm.* 626 (2022) 122118.
- [5] V.P. Chavda, G. Jogi, N. Shah, M.N. Athalye, N. Bamaniya, L. K Vora, A. Cláudia Paiva-Santos, Advanced particulate carrier-mediated technologies for nasal drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 74 (2022) 103569.
- [6] S.S. Sangolkar, V.S. Adhao, D.G. Mundhe, H.S. Sawarkar, Particle size determination of nasal drug delivery system: A review, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 17 (2012) 66.
- [7] S.P. Kakad, T.D. Gangurde, S.J. Kshirsagar, V.G. Mundhe, Nose to brain delivery of nanosuspensions with first line antiviral agents is alternative treatment option to Neuro-AIDS treatment, *Heliyon.* 8 (2022) e09925.
- [8] S. Ratra, B. Pant, K. Roy, S. Manohar, P. Kumar, S. Singh, K. Tumba, K. Kumari, P. Singh, A review on synthesis of antiviral drugs, in silico studies and their toxicity, *J. Indian Chem. Soc.* 100 (2023).
- [9] S. Kausar, F. Said Khan, M. Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M. Akram, M. Riaz, G. Rasool, A. Hamid Khan, I. Saleem, S. Shamim, A. Malik, A review: Mechanism of action of antiviral drugs, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 35 (2021) 1–12.
- [10] M.K. Powell, K. Benková, P. Selinger, M. Dogoši, I.K. Luňáčková, H. Koutníková, J. Lašíková, A. Roubíčková, Z. Špůrková, L. Laclová, V. Eis, J. Šach, P. Heneberg, Opportunistic Infections in HIV-Infected Patients Differ Strongly in Frequencies and Spectra between Patients with Low CD4⁺ Cell Counts Examined Postmortem and Compensated Patients Examined Antemortem Irrespective of the HAART Era, *PLoS One.* 11 (2016) e0162704.

- [11] L. Menéndez-Arias, R. Delgado, Update and latest advances in antiretroviral therapy, *Trends Pharmacol. Sci.* 43 (2022) 16–29.
- [12] G.A. Ilevbare, H. Liu, K.J. Edgar, L.S. Taylor, Understanding polymer properties important for crystal growth inhibition-impact of chemically diverse polymers on solution crystal growth of ritonavir, *Cryst. Growth Des.* 12 (2012) 3133–3143.
- [13] P.J. Pistell, S. Gupta, A.G. Knight, M. Domingue, R.M. Uranga, D.K. Ingram, I. Kheterpal, C. Ruiz, J.N. Keller, A.J. Bruce-Keller, Metabolic and neurologic consequences of chronic lopinavir/ritonavir administration to C57BL/6 mice, *Antiviral Res.* 88 (2010) 334–342.
- [14] D. Law, E.A. Schmitt, K.C. Marsh, E.A. Everitt, W. Wang, J.J. Fort, S.L. Krill, Y. Qiu, Ritonavir–PEG 8000 Amorphous Solid Dispersions: In vitro and In vivo Evaluations, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 563–570.
- [15] G.C. Williams, P.J. Sinko, Oral absorption of the HIV protease inhibitors: a current update, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 39 (1999) 211–238.
- [16] J. Van Strien, P. Petersen, P. Lappas, L. Yeo, A. Rezk, S. Vahaji, K. Inthavong, Spray characteristics from nasal spray atomization, *J. Aerosol Sci.* 165 (2022) 106009.
- [17] A. Haleem, M. Javaid, R.P. Singh, S. Rab, R. Suman, Applications of nanotechnology in medical field: a brief review, *Glob. Heal. J.* (2023).
- [18] J. Weiss, P. Takhistov, D.J. McClements, Functional Materials in Food Nanotechnology, *J. Food Sci.* 71 (2006) R107–R116.
- [19] Y.-M. Lei, W.-X. Huang, M. Zhao, Y.-Q. Chai, R. Yuan, Y. Zhuo, Electrochemiluminescence Resonance Energy Transfer System: Mechanism and Application in Ratiometric Aptasensor for Lead Ion, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7787–7794.
- [20] A. Singh, M. Suki, R. Sharma, P. Ingle, Applications of Nanotechnology: A Review, *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.* 7 (2020).
- [21] E. Serrano, G. Rus, J. García-Martínez, Nanotechnology for sustainable energy, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13 (2009) 2373–2384.

- [22] X. He, H.-M. Hwang, Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 671–681.
- [23] S.A. Ahire, A.A. Bachhav, T.B. Pawar, B.S. Jagdale, A.V. Patil, P.B. Koli, The Augmentation of nanotechnology era: A concise review on fundamental concepts of nanotechnology and applications in material science and technology, *Results Chem.* 4 (2022) 100633.
- [24] N. Chausali, J. Saxena, R. Prasad, Nanotechnology as a sustainable approach for combating the environmental effects of climate change, *J. Agric. Food Res.* 12 (2023) 100541.
- [25] F. Adams, C. Barbante, Nanotechnology and Analytical Chemistry, *Compr. Anal. Chem.* 69 (2015) 125–157.
- [26] A. Singh, M.M. Amiji, Application of nanotechnology in medical diagnosis and imaging, *Curr. Opin. Biotechnol.* 74 (2022) 241–246.
- [27] C.R. Lankala, M. Yasir, A. Ishak, M. Mekhail, P. Kalyankar, K. Gupta, Application of Nanotechnology for Diagnosis and Drug Delivery in Atherosclerosis: A New Horizon of Treatment, *Curr. Probl. Cardiol.* 48 (2023) 101671.
- [28] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. Vander Elst, R.N. Muller, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications, *Chem. Rev.* 110 (2010) 2574–2574.
- [29] E.C. Dreaden, A.M. Alkilany, X. Huang, C.J. Murphy, M.A. El-Sayed, The golden age: Gold nanoparticles for biomedicine, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2740–2779.
- [30] W.-K. Shin, J. Cho, A.G. Kannan, Y.-S. Lee, D.-W. Kim, Cross-linked Composite Gel Polymer Electrolyte using Mesoporous Methacrylate-Functionalized SiO₂ Nanoparticles for Lithium-Ion Polymer Batteries, *Sci. Rep.* 6 (2016) 26332.
- [31] I. Khan, K. Saeed, I. Khan, Nanoparticles: Properties, applications and toxicities, *Arab. J. Chem.* 12 (2019) 908–931.
- [32] Y. Wang, Y. Xia, Bottom-Up and Top-Down Approaches to the Synthesis of Monodispersed Spherical Colloids of Low Melting-Point Metals, *Nano Lett.* 4 (2004) 2047–2050.

- [33] P.G. Tratnyek, R.L. Johnson, Nanotechnologies for environmental cleanup, *Nano Today*. 1 (2006) 44–48.
- [34] M. Holzinger, A. Le Goff, S. Cosnier, Nanomaterials for biosensing applications: a review, *Front. Chem.* 2 (2014).
- [35] N.C. Mueller, B. Nowack, Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4447–4453.
- [36] D. Guo, G. Xie, J. Luo, Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 47 (2014) 013001.
- [37] A. Ali, H. Zafar, M. Zia, I. ul Haq, A.R. Phull, J.S. Ali, A. Hussain, Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles, *Nanotechnol. Sci. Appl. Volume 9* (2016) 49–67.
- [38] M. Jozefowicz, J. Jozefonvicz, Randomness and biospecificity: Random copolymers are capable of biospecific molecular recognition in living systems, *Biomaterials*. 18 (1997).
- [39] G. Wulff, Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates—A Way towards Artificial Antibodies, *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 34 (1995) 1812–1832.
- [40] B.S.P. Beining Chen, B.S.P. Sergey Piletsky, B.S.P. Anthony P.F. Turner, Molecular Recognition: Design of “keys,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 5 (2012) 409–427.
- [41] D.R. Kryscio, N.A. Peppas, Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomater.* 8 (2012) 461–473.
- [42] K. Haupt, K. Mosbach, Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors, *Chem. Rev.* 100 (2000) 2495–2504.
- [43] M. Trojanowicz, M. Wcisło, Electrochemical and Piezoelectric Enantioselective Sensors and Biosensors, 38 (2007) 523–547.
- [44] B.J. Privett, J.H. Shin, M.H. Schoenfish, Electrochemical sensors, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4723–4741.
- [45] X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, Y. Sun, Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, *Anal. Chim. Acta.* 620 (2008) 8–26.

- [46] D. Meadows, Recent developments with biosensing technology and applications in the pharmaceutical industry, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21 (**1996**) 179–189.
- [47] R.S. Sethi, Transducer aspects of biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 9 (**1994**) 243–264.
- [48] G. Winter, A.D. Griffiths, R.E. Hawkins, H.R. Hoogenboom, Making Antibodies by Phage Display Technology, 12 (**2003**) 433–455.
- [49] P.J. Hudson, Recombinant antibody fragments, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9 (**1998**) 395–402.
- [50] M.P. Byfield, R.A. Abuknesha, Biochemical aspects of biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 9 (**1994**) 373–399.
- [51] T. Vo-Dinh, B. Cullum, Biosensors and biochips: Advances in biological and medical diagnostics, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 366 (**2000**) 540–551.
- [52] K.E. Sapsford, C. Bradburne, J.B. Delehanty, I.L. Medintz, Sensors for detecting biological agents, *Mater. Today.* 11 (**2008**) 38–49.
- [53] E. Verheyen, J.P. Schillemans, M. Van Wijk, M.A. Demeniex, W.E. Hennink, C.F. Van Nostrum, Challenges for the effective molecular imprinting of proteins, *Biomaterials.* 32 (**2011**) 3008–3020.
- [54] G. Wurff, H.-G. Poll, Enzyme-analogue built polymers, 23. Influence of the structure of the binding sites on the selectivity for racemic resolution, *Die Makromol. Chemie.* 188 (**1987**) 741–748.
- [55] K. Mosbach, O. Ramström, The Emerging Technique of Molecular Imprinting and Its Future Impact on Biotechnology, *Bio/Technology* 1996 142. 14 (**1996**) 163–170.
- [56] Q. Fu, H. Sanbe, C. Kagawa, K.K. Kunitomo, J. Haginaka, Uniformly sized molecularly imprinted polymer for (S)-nilvadipine. Comparison of chiral recognition ability with HPLC chiral stationary phases based on a protein, *Anal. Chem.* 75 (**2003**) 191–198.
- [57] Y. Hu, J. Pan, K. Zhang, H. Lian, G. Li, Novel applications of molecularly-imprinted polymers in sample preparation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 43 (**2013**) 37–52.

- [58] S.A. Piletsky, S. Alcock, A.P.F. Turner, Molecular imprinting: at the edge of the third millennium, *Trends Biotechnol.* 19 (2001) 9–12.
- [59] M. Lotierzo, O.Y.F. Henry, S. Piletsky, I. Tothill, D. Cullen, M. Kania, B. Hock, A.P.F. Turner, Surface plasmon resonance sensor for domoic acid based on grafted imprinted polymer, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 145–152.
- [60] K. Mosbach, R. Mosbach, Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their application in column techniques, *Acta Chem. Scand.* 20 (1966) 2807–2810.
- [61] D.A. Spivak, K.J. Shea, Investigation into the scope and limitations of molecular imprinting with DNA molecules, *Anal. Chim. Acta.* 435 (2001) 65–74.
- [62] K. Seidler, P.A. Lieberzeit, F.L. Dickert, Application of yeast imprinting in biotechnology and process control, *Analyst.* 134 (2009) 361–366.
- [63] L.D. Bolisay, J.N. Culver, P. Kofinas, Molecularly imprinted polymers for tobacco mosaic virus recognition, *Biomaterials.* 27 (2006) 4165–4168.
- [64] A. Takácsy, Á. Végvári, S. Hjertén, F. Kilár, Universal method for synthesis of artificial gel antibodies by the imprinting approach combined with a unique electrophoresis technique for detection of minute structural differences of proteins, viruses and cells (bacteria). *Ib. Gel antibodies against proteins (hemoglobins), Electrophoresis.* 28 (2007) 2345–2350.
- [65] T. Takeuchi, T. Hishiya, Molecular imprinting of proteins emerging as a tool for protein recognition, *Org. Biomol. Chem.* 6 (2008) 2459–2467.
- [66] N.W. Turner, C.W. Jeans, K.R. Brain, C.J. Allender, V. Hlady, D.W. Britt, From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 1474.
- [67] N.M. Maier, W. Lindner, Chiral recognition applications of molecularly imprinted polymers: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 2007 3892. 389 (2007) 377–397.
- [68] W.C. Lee, C.H. Cheng, H.H. Pan, T.H. Chung, C.C. Hwang, Chromatographic characterization of molecularly imprinted polymers, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1101–1109.

- [69] Y.P. Huang, Z.S. Liu, C. Zheng, R.Y. Gao, Recent developments of molecularly imprinted polymer in CEC, *Electrophoresis*. 30 (2009) 155–162.
- [70] K. Flavin, M. Resmini, Imprinted nanomaterials: A new class of synthetic receptors, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 437–444.
- [71] M.E. Byrne, K. Park, N.A. Peppas, Molecular imprinting within hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 149–161.
- [72] L. Ye, K. Mosbach, The technique of molecular imprinting - Principle, state of the art, and future aspects, *J. Incl. Phenom.* 41 (2001) 107–113.
- [73] J.Z. Hilt, M.E. Byrne, Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant molecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1599–1620.
- [74] C.F. van Nostrum, Molecular imprinting: A new tool for drug innovation, *Drug Discov. Today Technol.* 2 (2005) 119–124.
- [75] C. Alexander, H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell, N. Kirsch, I.A. Nicholls, J. O'Mahony, M.J. Whitcombe, Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003, *J. Mol. Recognit.* 19 (2006) 106–180.
- [76] Molecular imprinting polymers (All Fields) – 8,580 – Web of Science Core Collection, (n.d.). <https://www.webofscience.com> (Erişim tarihi: 12 Nisan 2023).
- [77] L. Ye, K. Mosbach, The technique of molecular imprinting - Principle, state of the art, and future aspects, *J. Incl. Phenom.* 41 (2001) 107–113.
- [78] L.I. Andersson, Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 745 (2000) 3–13.
- [79] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, *Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications*, Mifflin (2003) 148.
- [80] B. Sellergren, C.J. Allender, Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1733–1741.
- [81] *Handbook of Affinity Chromatography*, Handb. Affin. Chromatogr. (2005).
- [82] P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation, *J. Chromatogr. B.* 804 (2004) 173–182.

- [83] M.P. Davies, V. De Biasi, D. Perrett, Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta.* 504 (2004) 7–14.
- [84] P.A.G. Cormack, K. Mosbach, Molecular imprinting: recent developments and the road ahead, *React. Funct. Polym.* 41 (1999) 115–124.
- [85] Y. Tunc, N. Hasirci, A. Yesilada, K. Ulubayram, Comonomer effects on binding performances and morphology of acrylate-based imprinted polymers, *Polymer (Guildf)*. 47 (2006) 6931–6940.
- [86] M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa, H. Asanuma, Molecular imprinting: from fundamentals to applications, (2003).
- [87] F.L. Dickert, O. Hayden, Imprinting with sensor development - On the way to synthetic antibodies, *Fresenius. J. Anal. Chem.* 364 (1999) 506–511.
- [88] F. Chapuis, V. Pichon, M.-C. Hennion, Molecularly Imprinted Polymers : Developments and applications of new selective solid-phase extraction materials ., *LC GC Eur.* July 2004 (2004) 408–417.
- [89] H. Yan, H.R. Kyung, Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer, *Int. J. Mol. Sci.* 2006, Vol. 7, Pages 155-178. 7 (2006) 155–178.
- [90] T. Takeuchi, J. Haginaka, Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 728 (1999) 1–20.
- [91] A. Katz, M.E. Davis, Investigations into the mechanisms of molecular recognition with imprinted polymers, *Macromolecules.* 32 (1999) 4113–4121.
- [92] X. Dong, H. Sun, X. Lü, H. Wang, S. Liu, N. Wang, Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers—influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance, *Analyst.* 127 (2002) 1427–1432.
- [93] A. Ersöz, A. Denizli, A. Özcan, R. Say, Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2197–2202.

- [94] R. Say, A. Ersöz, H. Türk, A. Denizli, Selective separation and preconcentration of cyanide by a column packed with cyanide-imprinted polymeric microbeads, *Sep. Purif. Technol.* 40 (2004) 9–14.
- [95] P.K. Dhal, F.H. Arnold, Metal-Coordination Interactions in the Template-Mediated Synthesis of Substrate-Selective Polymers: Recognition of Bis(imidazole) Substrates by Copper(II) Iminodiacetate Containing Polymers, *Macromolecules*. 25 (1992) 7051–7059.
- [96] N. Bereli, M. Andaç, G. Baydemir, R. Say, I.Y. Galaev, A. Denizli, Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *J. Chromatogr. A*. 1190 (2008) 18–26.
- [97] F. Tan, D. Sun, J. Gao, Q. Zhao, X. Wang, F. Teng, X. Quan, J. Chen, Preparation of molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective removal of fluoroquinolone antibiotics in aqueous solution, *J. Hazard. Mater.* 244–245 (2013) 750–757.
- [98] E.A. Klausner, S. Eyal, E. Lavy, M. Friedman, A. Hoffman, Novel levodopa gastroretentive dosage form: in-vivo evaluation in dogs, *J. Control. Release*. 88 (2003) 117–126.
- [99] Robinson, J.R., Lee, V.H., Controlled drug delivery–fundamentals and applications - Google Akademik, (n.d.). <https://scholar.google.com> (Erişim tarihi: 5 Nisan 2023).
- [100] N. Peppas, Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review, *J. Macromol. Sci. Part C*. 23 (1983).
- [101] R.A. Siegel, M.J. Rathbone, Overview of controlled release mechanisms, in: *Fundam. Appl. Control. Release Drug Deliv.*, 2012.
- [102] S. He, L. Zhang, S. Bai, H. Yang, Z. Cui, X. Zhang, Y. Li, Advances of molecularly imprinted polymers (MIP) and the application in drug delivery, *Eur. Polym. J.* 143 (2021) 110179.
- [103] Molecular imprinting in drug release system (All Fields) – 189 – Web of Science Core Collection, (n.d.). <https://www.webofscience.com> (5 Nisan 2023).
- [104] S.A. Zaidi, Molecular imprinted polymers as drug delivery vehicles, 23 (2014) 2262–2271.

- [105] D.R. Kryscio, N.A. Peppas, Mimicking biological delivery through feedback-controlled drug release systems based on molecular imprinting, *AIChE J.* 55 (2009) 1311–1324.
- [106] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol. Pharm.* (2010).
- [107] N.A. Peppas, B. Narasimhan, Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems, *J. Control. Release.* 190 (2014) 75–81.
- [108] M.L. Laracuenta, M.H. Yu, K.J. McHugh, Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects, *J. Control. Release.* 327 (2020) 834–856.
- [109] A.A. Noyes, W.R. Whitney, The rate of solution of solid substances in their own solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 19 (1897) 930–934.
- [110] T. Higuchi, Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension, *J. Pharm. Sci.* 50 (1961) 874–875.
- [111] H. Omidian, K. Park, Introduction to Hydrogels, *Biomed. Appl. Hydrogels Handb.* (2010) 1–16.
- [112] P.L. Ritger, N.A. Peppas, 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 or discs, *J. Control. Release.* 5 (1987) 23–36.
- [113] R.W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N.A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *Int. J. Pharm.* 15 (1983) 25–35.
- [114] N.A. Peppas, Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers., *Pharm. Acta Helv.* 60 (1985) 110–111.
- [115] F. Yilmaz, N. Bereli, H. Yavuz, A. Denizli, Supramacroporous hydrophobic affinity cryogels for protein chromatography, *Biochem. Eng. J.* 43 (2009) 272–279.
- [116] E. Feyzioğlu Demir, N. Öztürk Atay, M. Koruyucu, G. Kök, Y. Salman, S. Akgöl, Mannose based polymeric nanoparticles for lectin separation, 53 (2018) 2365–2375.

- [117] Feyzioğlu Demir, E., Göğüs Hastalıklarının Tedavisinde Nanobiyoteknolojik Bir Yaklaşım: Polimerik Nano-Malzemelerin İnhaler Yolla Kullanımının Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, (2019).
- [118] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Cytotoxicity of Nanoparticles, *Small*. 4 (2008) 26–49.
- [119] A.F. Bettencourt, C. Tomé, T. Oliveira, V. Martin, C. Santos, L. Gonçalves, M.H. Fernandes, P.S. Gomes, I.A.C. Ribeiro, Exploring the potential of chitosan-based particles as delivery-carriers for promising antimicrobial glycolipid biosurfactants, *Carbohydr. Polym.* 254 (2021) 117433.

