

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLIAZOMETİN ESASLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ

Nermin Saliha TOPUZOĞULLARI

DOKTORA TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Şubat, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POLİAZOMETİN ESASLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Nermin Saliha TOPUZOĞULLARI tarafından hazırlanan tez çalışması 13.02.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emine KAHRAMAN ŞİRİN, Üye
İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Günseli KURT GÜR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Melike ERSÖZ, Üye
Demiroğlu Bilim Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Poliazometin Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Nermin Saliha TOPUZOĞULLARI

İmza



Aileme
ve
eşime

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının tamamlanmasında bana rehberlik eden ve her türlü desteklerini esirgemeyen herkese en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Öncelikle, gösterdiği sabır, sağladığı akademik rehberlik ve desteği ile bu çalışmanın şekillenmesinde büyük role sahip değerli danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na,

Yapıcı eleştirileri, destekleyici önerileri ve en önemlisi süreç boyunca gösterdikleri sabırları için tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Semiha ERİŞEN ve Dr. Öğr. Üyesi Emine KAHRAMAN ŞİRİN'e,

Tez savunma jürime katılarak değerli vakitlerini ayıran Doç. Dr. Melike ERSÖZ ve Dr. Öğr. Üyesi Günseli KURT GÜR'e,

Bilgi ve tecrübesi ile hücre kültürü çalışmalarımda bana destek olan Fatma Şayan POYRAZ'a,

Çalışmanın yürütülmesinde her türlü laboratuvar ve altyapı imkânlarını sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ile Biyomühendislik Bölümü'ne ve bu süreçte sahip oldukları bilgi birikimi ve desteklerini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarıma,

100/2000 YÖK Doktora Burs Programı kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Cumhuriyeti Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK),

Hayatım boyunca yanımda olan, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, dualarıyla destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme; anneme, babama ve kardeşlerime,

Her karamsarlığa düştüğümde, fiziksel olarak yetmediğimde, kaygı bulutları içimi kapladığında hep yanımda olan değerli dostlarım Prof. Dr. Tülin ÖZBEK ile Prof. Dr. Serap ACAR'a ve her birinin adını burada anamasam da tüm değerli dostlarım ve arkadaşlarıma,

Ve elbette ki son olarak hayatlarımız birleştiği günden beri elimi hiç bırakmayan, sevgiyle, sabırla, fedakârlıkla her zaman yanımda olan ve verdiğim bütün kararlara o kocaman yüreğiyle saygı duyan değerli eşim Murat TOPUZOĞULLARI'na ve hayatımız, binbir rengimiz, biricik oğullarımız KEREM'e ve AKIN'a

Ve isimlerini burada anamadığım emeği geçen herkese,

Yürekten teşekkürlerimi sunarım

Nermin Saliha TOPUZOĞULLARI



İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	6
1.3 Hipotez	6
2 GENEL BİLGİLER	8
2.1 Biyobozunur Polimerler	8
2.1.1 Biyoyumluluk ve Biyobozunurluk	13
2.2 Biyobozunur Polimerlerin Bozunma Mekanizmaları	17
2.3 Biyobozunur Polimerlerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Nano Boyutlu İlaç Dağıtım Sistemleri Üzerindeki Etkisi	32
2.4 Blok Kopolimer Miseller	37
2.5 Schiff Bazı ve Poliazometinler	45
2.6 Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)	52
3 GEREÇ ve YÖNTEMLER	54
3.1 Kimyasallar ve Hücre Hatları	54
3.2 Cihazlar	54
3.3 PAM-b-PEG Kopolimerinin Sentezi	55
3.4 Misellerin Hazırlanması	56
3.4.1 PAM-b-PEG Misellerinin Hazırlanması	56
3.4.2 CAPE Yüklü PAM-b-PEG Misellerinin Hazırlanması	56
3.5 Karakterizasyonlar	57

3.5.1 CAPE Kalibrasyon Eğrisi	58
3.5.2 Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi	58
3.5.3 In Vitro Salım Çalışmaları	59
3.5.4 Biyobozunurluk Testi	59
3.6 In vitro Biyolojik Çalışmalar	59
3.6.1 Hücre Kültürü Koşulları	59
3.6.2 Hücre Canlılığı Deneyi	60
4 BULGULAR ve TARTIŞMA	61
4.1 PAM-b-PEG Kopolimeri Sentezi ve Karakterizasyonu.....	61
4.2 PAM-b-PEG Kopolimer Misellerin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	65
4.3 CAPE Yüklü PAM-b-PEG Kopolimer Misellerin Üretimi ve Karakterizasyonu	66
4.4 Hücre Canlılığı Testi	74
5 SONUÇ	77
KAYNAKÇA	79
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	92

SİMGE LİSTESİ

M _w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
Da	Dalton
M _w	Düşük ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
g	Gram
w/v	Hacim içindeki ağırlık
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
m	Kütle
L	Litre
μL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mV	Milivolt
ppm	Milyonda bir birim
n	Mol
M	Molar
nm	Nanometre
°C	Santigrat
cm	Santimetre
M _n	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
M _w	Yüksek ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
ATCC	American Type Culture Collection
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
cmc	Kritik misel konsantrasyonu
DLS	Dinamik ışık saçılması
DMEM	Dulbecco's modifiye Eagle medyum
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOX	Doksorubisin
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
ED	Etilendiamin
EE	Enkapsülasyon etkinliğini
EPR	Arttırılmış geçirgenlik ve alıkonma
FBS	Fetal sıgır serumu
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GA	Glutardialdehit
GI	Gastrointestinal
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
GRT-MG	Astrositoma hücre hattı
HDF	İnsan kaynaklı fibroblast
HT-29 ve 26-L5	Kolon kanseri hücre hatları
KGM-g-AH8	Konjak glukomannan
LCST	Lowest critical solution temperature
MDR	Çoklu ilaç direncinin
MFC-7	Meme kanseri hücre hattı

MPS	Mononükleer fagosit sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
NMR	Nükleer manyetik rezonans
P(3-DBAP)	Poli (3-[[4-(dimetilamino)benziliden]amino]fenol)
PAA	Poli(akrilik asit)
PAM	Poliazometin
PBCA	Poli(butil siyanoakrilat)
PC-3	Prostat kanseri hücre hattı
PCL	Polikaprolakton
PDEAEM	Poli(N,N'-dietil-aminoetil metakrilat)
PDI	Polidispersite indeks
PEG	Poli(etilenglikol)
PGA	Poli(glikolik asit)
PHA	Polihidroksi alkonat
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktit-ko-glikolit)
PMPC	Poli (2-etakrililoksietil fosforilkolin)
PSI	Polispermin imidazol-4,5-imin
PTX	Paklitaksel
RES	Retiküler endotelyal sistem
RNA	Ribonükleik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
siRNA	Kısa [veya küçük] girişimci RNA
STEM	Elektron mikroskobu
TEM	Taramalı elektron mikroskobu
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
TGA	Termo gravimetrik analiz
U-937	Miyeloid lösemi
XRD	X-ışını kırınımı
YK	İlaç yükleme kapasitesi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Aldehit ve aminin kondenzasyon reaksiyonu ile Schiff bazı yapısını oluşturmaları (a) ve asidik ortamda çift bağın kırılması ile gelişen hidrolitik bozunma reaksiyonu (b).	2
Şekil 1.2	Tez çalışmasında sentezlenen PAM-b-PEG blok kopolimerine CAPE yüklenmesiyle misel oluşumunun şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.1	Biyobozunur malzemelerin uygulama alanları	9
Şekil 2.2	Biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması.	10
Şekil 2.3	Hidrolitik olarak hassas olan X-Y bağının su molekülü tarafından kırılması sonucu oluşan X-H ve HO-Y ürünleri	19
Şekil 2.4	Biyolojik olarak parçalanabilir polimerin bozunma mekanizması	20
Şekil 2.5	Polimerlerin hidrolitik bozunmasıyla gerçekleşen ilaç salımının şematik gösterimi.....	22
Şekil 2.6	Biyobozunur polimerlerin omurgalarında en yaygın bulunan pH duyarlı bağlar	29
Şekil 2.7	Pasif ve aktif tümör hedeflemesi	31
Şekil 2.8	pH duyarlı PEG ayrılma mekanizması.....	32
Şekil 2.9	Nano boyutlu ilaç dağıtımı için kullanılan polimerler	33
Şekil 2.10	Farklı mimarilere sahip blok kopolimerler.....	39
Şekil 2.11	İlaç ve gen taşıyıcı olarak blok kopolimer misel oluşumu.....	40
Şekil 2.12	Yaygın olarak kullanılan ilaç yüklü polimerik misel üretim prosedürleri.....	41
Şekil 2.13	Schiff bazlarının genel gösterimi	47
Şekil 2.14	Schiff bazı reaksiyonu	47
Şekil 2.15	CAPE molekülünün kimyasal yapısı.....	53
Şekil 3.1	PAM-b-PEG blok kopolimerinin sentez reaksiyonu.....	55
Şekil 3.2	PAM-b-PEG blok kopolimer misellerinin diyaliz yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi.	56
Şekil 3.3	CAPE yüklü PAM-b-PEG blok kopolimer misellerin diyaliz yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi.	57
Şekil 3.4	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CAPE çözeltilerinin 323 nm'deki absorptans değerlerinden elde edilen konsantrasyon-absorptans grafiği ..	58

Şekil 4.1	Sentezlenen PAM-b-PEG blok kopolimerleri ve PEG'e ait FTIR spektrumları.....	62
Şekil 4.2	Sentezlenen PAM-b-PEG blok kopolimerleri ve PEG'e ait ¹ H-NMR spektrumları.....	63
Şekil 4.3	PAM-b-PEG kopolimer misellerin şiddete bağlı hidrodinamik boyut dağılımları.	65
Şekil 4.4	N2 kodlu PAM-b-PEG kopolimeriyle üretilen ve farklı $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}$ oranlarında üretilmiş CAPE yüklü misellerin hidrodinamik boyut dağılım grafikleri.	67
Şekil 4.5	$m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}$ oranına bağlı olarak CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin hidrodinamik boyut ve PDI değişimi.	68
Şekil 4.6	Boş ve CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin şiddete bağlı hidrodinamik boyut dağılımları.....	69
Şekil 4.7	CAPE yüklü PAM-b-PEG miselinin farklı büyütmelede STEM görüntüleri.	71
Şekil 4.8	CAPE, boş PAM-b-PEG miseli ve CAPE yüklü PAM-b-PEG miselinin FTIR spektrumları.	72
Şekil 4.9	pH 5,0 ve 7,2'deki CAPE yüklü misellerin zamana bağlı bağlı ışık saçılımı şiddeti oranlarının değişimi.	73
Şekil 4.10	pH 5,0 ve 7,2'de PAM-b-PEG kopolimer miselinden CAPE molekülünün kümülatif salım profili.....	75
Şekil 4.11	HDF hücrelerinin CAPE, boş misel ve CAPE yüklü misellerle 24 (A) ve 48 (B) saatlik inkübasyon sonrası canlılık oranları.....	76

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	En yaygın kullanılan sentetik biyobozunur polimerler ve uygulama alanları, avantajları, dezavantajları ve kimyasal yapıları.....	11
Tablo 2.2	Vücut içerisindeki farklı bölgelerdeki pH değerleri.	26
Tablo 3.1	PAM-b-PEG blok kopolimer sentezinde kullanılan bileşen oranları ve örnek kodları	56
Tablo 4.1	Üretilen PAM-b-PEG kopolimerlerinin ¹ H-NMR spektrumları kullanılarak elde edilen molekül ağırlığı (M _n) değerleri.	64
Tablo 4.2	PAM-b-PEG blok kopolimerlerden üretilen misellerin hidrodinamik çap (şiddet) ve polidispersite indeks (PDI) değerleri.	66
Tablo 4.3	Boş ve CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	70

Poliazometin Esash İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve Sitotoksik Etkisinin İncelenmesi

Nermin Saliha TOPUZOĞULLARI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Biyobozunur polimerler, ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılan temel bileşenlerden birisi haline gelmiştir. Özellikle poliester yapılı biyobozunur polimerler bu alanda en çok kullanılan polimer sınıfıdır. Ancak, pH gibi çevresel etmenlere bağlı olarak ilaç salımının gerektiği durumlarda farklı polimerlerin kullanımı ve geliştirilmesi gerekmektedir. Poli(azometin) yapılı polimerler, omurgalarında bulunan tekrarlayan Schiff bazı gruplarından dolayı asidik pH değerlerinde monomerlerine ayrışabilmektedir. Bu durum poliazometinleri pH'a duyarlı ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılabilecek bir polimer haline getirmektedir.

Bu çalışmada, antikarsinojenik, immünomodülatör, antiinflamatuvar, antioksidan özellikleri olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) salımı için poli(azometin) esash miseller geliştirilmiştir. Bir poliazometin-PEG blok kopolimerinden sentezlenen bu miseller, pH'a duyarlı biyolojik olarak parçalanabilir doğası nedeniyle ilaç salım sistemlerinde önemli bir potansiyel göstermektedir. SEM ile karakterizasyon, ortalama çapı 135,5 nm olan küresel miselleri ortaya çıkarmıştır. Misellerin ilaç salım davranışı fizyolojik (pH 7.2) ve lizozomal (pH 5.0) pH

seviyelerinde incelenmiştir. Bulgular CAPE'nin miselden pH'a duyarlı olarak salındığını göstermiştir. 24 saatlik salım çalışması gerçekleştirildiğinde, CAPE'nin miselden pH 7.2'de sadece %2.14'ü salınırken, pH 5.0'de %38.8'i salınmıştır. İnsan kaynaklı fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan in vitro hücre canlılığı deneyleri, CAPE yüklü misellerin 48 saat sonra serbest CAPE ve boş misel ile karşılaştırıldığında minimal toksisite sergilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, poliazometin bazlı misellerin terapötik amaçlar için hedeflenmiş ilaç dağıtımı için etkili taşıyıcılar olarak potansiyelini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ilaç taşıyıcı, misel, pH-duyarlı, poliazometin, poliimin



ABSTRACT

Development of Polyazomethine-based Drug Delivery Systems and Evaluation of Their Cytotoxic Effect

Nermin Saliha TOPUZOĞULLARI

Department of Molecular Biology and Genetics

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Biodegradable polymers have become fundamental components in the development of drug delivery systems. Among these, biodegradable polyesters represent the most commonly utilized class of polymers in this field. However, in cases where drug release is required to respond to environmental factors such as pH, the use and development of alternative polymers are essential. Polymers with poly(azomethine) structures can dissociate into their monomers under acidic pH conditions due to the repeating Schiff base groups in their backbone. This characteristic makes polyazomethines promising candidates for the development of pH-sensitive drug delivery systems.

In this study, poly(azomethine)-based micelles were developed for the release of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) with anticarcinogenic, immunomodulatory, anti-inflammatory, antioxidant properties. These micelles, synthesized from a polyazomethine-PEG block copolymer, demonstrate significant potential for drug delivery systems due to their pH-sensitive and biodegradable nature. Characterization by scanning electron microscopy (SEM) revealed spherical micelles with an average diameter of 135.5 nm. The drug release behavior of the

micelles was examined at physiological (pH 7.2) and lysosomal (pH 5.0) pH levels. The findings indicated that CAPE release from the micelles was pH-responsive. After 24 hours, only 2.14% of CAPE was released at pH 7.2, while 38.8% was released at pH 5.0. In vitro cell viability assays using human-derived fibroblast cells showed that CAPE-loaded micelles exhibited minimal toxicity after 48 hours compared to free CAPE and empty micelles. These results demonstrate the potential of polyazomethine-based micelles as effective carriers for targeted therapeutic drug delivery.

Keywords: drug carrier, micelle, pH-sensitive, polyazomethine, polyimine



1.1 Literatür Özeti

Biyobozunur polimerler, işlevlerine hizmet ettikten sonra parçalanabilme ve organizmadan atılabilme özelliğine sahip polimerlerdir. Bu tip polimerler, ilaç taşıyıcı sistemleri cerrahi iplikler, implantlar, doku iskeleleri, yara örtü malzemeleri gibi tıbbi olarak yüksek öneme sahip birçok malzemenin üretiminde kullanılmaktadır. Geniş bir aileye sahip biyobozunur polimerler doğal olabildiği gibi sentetik olarak da üretilmektedir [1]. Polifosfazenler, polianhidridler, poliasetal, poliamid, poli(orto ester), polifosfoesterler, poliester, poliüretan ve polikarbonatlar sentetik biyobozunur polimerlerin bir kısmıdır [2].

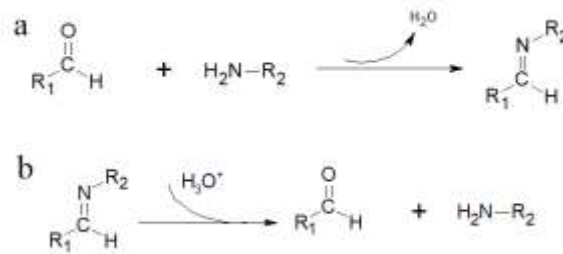
En yaygın olarak kullanılan biyobozunur sentetik polimerler ise, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından da onaylı olan poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktit-ko-glikolit) kopolimerleri (PLGA) ve polikaprolaktonlardır (PCL) [3]. Bu polimerler hidrolitik ya da enzimatik olarak bozunabilmektedir [4].

Hidrofobik özellikteki biyobozunur polimerlerin poli(etilenglikol) (PEG) ile blok kopolimerleri yapılarak biyobozunur özellikli miseller elde edilebilmektedir [5]. Hidrofobik polimer miselin çekirdeğini oluştururken, hidrofilik PEG bloğu ise miselin suyla etkileşen dış kabuğunu oluşturmaktadır ve her iki polimer bloğu da biyoyumludur. PEG de FDA tarafından onaylanmış bir polimerdir [6].

PLA, PGA ve PCL içerikli biyomedikal malzemeler çok geniş kullanım alanlarına karşılık özellikle belli doku veya hücre içi kompartımanlarda etkiye duyarlı olarak ani ilaç salımı yapma kabiliyetleri kısıtlıdır. Bu sebeple, etkiye duyarlı olarak hedefli ilaç salımına ihtiyaç duyulan çalışmalarda ilgili çevresel etmene duyarlı polimerlerin kullanılması gerekmektedir. Bu noktada pH ile bozunan polimerler

özellikle kanserli dokular ve hücrelere ilaç hedeflemede kullanılan önemli bir biyobozunur aile sınıfıdır. Birçok farklı pH duyarlı olarak bozunabilen polimer mevcut olsa da poliazometin yapılı polimerlerin bu amaçla ilaç salım sistemlerinde kullanımının oldukça kısıtlı olduğu görülmüştür.

Ana zincirinde Schiff bazı ($-\text{CH}=\text{N}-$) grupları (Şekil 1.1a) bulunan polimerler literatürde poliazometinler (PAM) veya poli(imin)ler olarak adlandırılmaktadır [7]. Bu polimerin ana zincirinde bulunan $-\text{CH}=\text{N}-$ fonksiyonel grubunun [8] pH değerine karşı duyarlı olması bu polimerlerin en önemli özelliklerinden birisidir [9]. Schiff bazları alkalilere karşı dayanıklı olmalarına karşın düşük pH değerlerinde çift bağın kırılması ile hidroliz olurlar ve kendilerini oluşturan amin ve karbonil bileşiğine ayrılırlar (Şekil 1. 1). 6,5'in altındaki bir pH değerinde sulu çözelti içinde gerçekleşen bu ayrışma, poliazometinlerin biyolojik sistemlerde pH duyarlı uygulamalarda kullanımını mümkün kılmaktadır [9]. Schiff bazı gruplarını içeren PAM polimerler de biyolojik sistemde nötral pH değerlerinde bozunmayarak asidik pH değerlerinde bozunması birçok avantajı beraberinde getirmektedir. En önemli avantaj ise, pH'ın, ilaç salımının spesifik organlarda (mide, bağırsak sistemi veya vajina) ya da hücre içi organellerde (endozom veya lizozom) kontrol edilmesine olanak sağlamasıdır [10].



Şekil 1. 1 Aldehit ve aminin kondenzasyon reaksiyonu ile Schiff bazı yapısını oluşturması (a) ve asidik ortamda çift bağın kırılması ile gelişen hidrolitik bozunma reaksiyonu (b).

Poliazometinler genel olarak dialdehid ve diaminlerin kondenzasyon reaksiyonu ile üretilen polimerlerdir. Aldehit ve amin gruplarını aynı anda yapısında içeren monomerler de ayrıca kullanılabilir. Ayrıca kullanılabilmektedir.

Poliazometinler üzerine farklı alanlarda birçok çalışma bulunmaktadır. Mehmet Saçak ve arkadaşları sentezledikleri fenol grubu içeren bir Schiff bazı polimeri olan poli (3-[[4-(dimetilamino)benziliden]amino]fenol) P(3-DBAP) polimerinin

1200 °C'ye kadar termal dayanım gösterebildiğini ve ayrıca monomer ve polimerin antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir [8].

Bir başka çalışmada ise yine Schiff bazı temelli pH duyarlı polispermim imidazol-4,5-imin (PSI) polimeri sentezlenerek katyonik bir polimer elde edilmiştir. Bu polimerin siRNA ile kompleks oluşturması sağlanarak, polimerin pH duyarlılığı sayesinde siRNA'nın endozomdan sitoplazmaya salınabileceğini göstermişlerdir [11].

Fruktoz türevi bir dialdehitte poliamin yapılı molekülün reaksiyonuyla çapraz bağlı bir polimer elde edilmiştir [12]. Aynı bir çalışmada ise fenolik bir dialdehit ile poliamin yapılı bir molekülün Schiff bazı reaksiyonuyla gözenekli nanopartiküller üretilmiştir [13].

Dialdehitler, amin içeren polimerlerin çapraz bağlanmasında da kullanılmaktadır. Örneğin kitosandaki amin grupları glutaraldehitte çapraz bağlanarak ilaç taşıyıcı mikrojeller üretilmiştir [14]. Aynı bir çalışmada ise aljinatın aldehit türevi ile jelatin Schiff bazı reaksiyonu ile çapraz bağlanarak doku mühendisliğinde kullanılacak mikrojeller elde edilmiştir [15].

Schiff bazının polimer zincirinin ana yapısında bulunmasının yanında bu grup moleküllerin konjugasyonu amacıyla da kullanılmaktadır. Polimer bloklarını birbirine veya polimer zincirini küçük moleküllere bağlamakta Schiff bazı grubu sıkça kullanılmaktadır. Örneğin He, Zhu ve arkadaşları, Schiff bazıyla iki polimer bloğunun birbirine bağlı olduğu çift bloklu PS-r-PEG polimerini üretmişler ve ilaç yüklü misel haline getirerek ilaç salımı yapabilen, stabil ve pH'a duyarlı bir ilaç taşıyıcı sistem elde etmişlerdir [16].

Bir başka çalışmada ise, doksorubisin (DOX) ve paklitaksel (PTX)'in birlikte salımı için aktif bir hedefleme ve pH'a duyarlı polimerik misel sistemi geliştirilmiş, DOX ile polimerler ise pH'a duyarlı Schiff bazı grubuyla konjuge edilmiştir. Hem DOX hem de PTX in salım hızı böylelikle zayıf asidik koşullar altında hızlandırılmıştır [17].

Ma, Zuang ve arkadaşları ise yaptıkları bir çalışmada, bir benzoil imin bağlantısı ile poli (2-etakrililoksietil fosforilkolin) (PMPC) bloğu ve PLA bloğu Schiff bazı ile bağlanarak biyouyumlu ve pH'a duyarlı bir kopolimer sentezlemiş, elde ettikleri miselleri, PTX taşıyıcısı olarak kullanmışlardır. Benzoil imin

bağlantısının asidik koşullar altında hızlı kırılması nedeniyle, misel yapısının, hızlandırılmış PTX salımı ile bozulduğunu göstermişlerdir [18].

Schiff bazının polimer ana zincirinin dışında kullanılması da birçok açıdan incelenmiştir. Luan, Wu ve arkadaşları hidrofobik modifiye edilmiş konjak glukomannan bazlı pH duyarlı ilaç dağıtım sistemi üzerine çalışmış, bunun için model ilaç olarak kurkumini amfifilik alifatik aminler aşılansmış konjak glukomannan (KGM-g-AH8) misellerine enkapsüle etmiştir. pH 5,0'da kurkumin yüklü misellerin in vitro kurkumin salımı, ana polimerin yan zincirlerinde bulunan pH'a duyarlı Schiff bazının hidrolizi nedeniyle pH 7,4'ten çok daha hızlı olduğunu ve misel sisteminin pH duyarlılığı olduğunu göstermiştir [19].

Kısacası, Schiff bazının mevcut yapısı polimer yapısına pH'a duyarlılık özelliği katmakta ve birçok farklı grubun biraraya getirilmesinde etkili olarak kullanılabilmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda PAM polimerinin PEG ile kopolimerleri kullanılarak pH'a duyarlı ilaç taşıyıcı misel sistemleri üretilmiş ve antikarsinogenik, immünomodülatör, antiinflamatuvar, antioksidan özellikleri olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) [20, 21] taşınması amacıyla kullanımı araştırılmıştır.

Üretilen bu misel sisteminin olası uygulamalarından birisi de kanser hastalıklarını tedavisidir. Bunun en önemli sebeplerinden birisi, kanser hücrelerinin sahip oldukları tümör mikro ortamıdır. Kanser hücreleri, hipoksi durumunda oksijen varlığının azalmasına karşı koymak üzere glikoliz sürecini güçlendirmektedir [22]. Bu hücrelerde glukoz alımıyla birlikte glikolizdeki artış, büyük miktarda laktik asit oluşumuna ve ardından Warburg etkisi olarak adlandırılan fermentasyona neden olmaktadır [23]. Dolayısı ile malignitenin farklılaşmış bu metabolik profilinden dolayı normal dokulara göre önemli farklılıklar sergilemektedir. Örneğin, tümörjenez, yukarı regüle edilmiş glikolitik metabolizma, artan laktik asit üretimi ve daha sonra düşük hücresel pH değerleri nedeniyle normal dokulardan daha asidiktir [24, 25]. Zayıf perfüzyon nedeniyle tümörden türetilen protonları uzaklaştırma kabiliyetinin azalması ile kombinasyon halinde glikoliz yoluyla laktik asit oluşumunun artması, pH<6,0'ya kadar belirgin hücre dışı asidoza yol açar [26].

Tez çalışmasında üretilen kopolimerden bir nanotaşıyıcı tasarlanmasının nedeni ise cerrahi ve radyoterapi gibi kanser tedavisi için etkili tedavi yöntemleri olmasına karşın kanser metastaz yaptığında bu yöntemlerin yetersiz kalmasıdır. Böyle durumlarda tercih edilen tedavi yöntemi olan kemoterapi ise kanserli hücre ve dokuların yanında sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir [27]. Bunu önlemek amacı ile kullanılan nanotaşıyıcılar, kanser ilaçlarının belirli dokularda kontrollü salımını yaparak, ilacın yan etkilerinin azaltılması ve ilaç moleküllerinin suda çözünürlüğünü arttırılması gibi çok önemli iki etkisi sebebiyle tercih edilmektedir [28]. Ayrıca polimer nanoparçacıkların yüzeyinin işlevselliği, sadece parçacıklara aktif hedefleme özellikleri sağlamakla kalmaz, aynı zamanda sitotoksik ilaçların terapötik etkinliğini arttırır ve çoklu ilaç direncinin (MDR) üstesinden gelir [29, 30]. Nanotaşıyıcılar, hücreye giriş yaptığında genellikle endozomlar tarafından kuşatılırlar, böylece hücrenin ilaca karşı olan direnç mekanizması by-pass edilmiş olur [31].

Çalışmamızda sentezlenmiş olan polimerik miseller, amfifilik blok kopolimerlerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşmuş, dış kısmında hidrofilik bir kabuk ve iç kısmında hidrofobik bir çekirdek barındıran nano boyuttaki küresel yapılardır. [32]. Yapılan birçok çalışma polimerik misel sisteminin, kanser kemoterapisi için umut verici bir platform olduğunu göstermektedir [17]. Polimerik miseller, ilaçların suda çözünürlüğünü arttırmakta, yüksek miktarda ilaç taşıyabilmekte, nano boyutta (20-80 nm) üretilmekte, taşıdıkları kargo molekülü immün sistemden koruyabilmektedir [33]. Polimerik misellerin bu özellikleri; kanda uzun süre sirküle olmalarını, EPR (arttırılmış geçirgenlik ve alıkonma) etkisiyle kanserli dokulara pasif hedeflenmelerini ve ilaç moleküllerinin olumsuz yan etkilerini azaltabilmelerini sağlamaktadır [34]. Ayrıca üretilen misellerin yüzeyinde bulunacak olan PEG zincirleri, yoğun bir hidrofilik bariyer oluşturulmasını, sirkülasyon süresinin artmasını, retiküler endotelial sistem (RES) ile etkileşimlerin azalmasını, ilaç salım sistemlerinin hidrodinamik boyutunun artırılarak vücuttan atılmasının azaltılmasını sağlamaktadır [35].

Literatürde birçok biyobozunur ilaç taşıyıcı sistem olmasına karşın poliazometin-PEG esaslı polimerik misel taşıyıcı sistemler bulunmamaktadır. Tez çalışmasında, bu amaçla ve yukarıda belirtilen avantajlarından da faydalanmak üzere etilen

diamin ve glutardialdehit kullanılarak PAM-b-PEG blok kopolimerleri üretilerek ilaç salım kapasiteleri ve sitotoksiteleri incelenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Tez çalışmasında; etilen diamin ve glutardialdehit monomerleri kullanılarak PAM ve PEG blokları içeren pH'a duyarlı olarak bozunabilir bir blok kopolimerin sentezlenmesi, bu kopolimer kullanılarak CAPE yüklü misellerin üretilmesi ve bu sistemlerin sitotoksitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Önerilen sistem, taşıdığı etken maddeyi kanser hücrelerinin asidik tümör mikroçevresinde kontrollü bir şekilde salımına olanak tanıyacak şekilde tasarlanmıştır.

Bu kapsamda, ilk olarak, biyolojik sistemde asidik ortamlarda bozunabilme özelliğine sahip Schiff bazı temelli poli(azometin)-PEG blok kopolimerinin etilen diamin ve glutaraldehit monomerleri ile zincir ucunda amin grubu bulunan COOH-PEG-NH₂ kullanılarak sentezlenmesi hedeflenmiştir. Bu blok kopolimerden CAPE yüklü polimerik misel eldesi ise tezin ikinci hedefidir. Bir sonraki hedef ise yüklü misellerin karakterizasyon çalışmalarının ardından salım davranışlarının gözlemlenmesi ve bu bulgular ışığında da sistemin hücre kültürü testi ile sitotoksitesinin incelenmesidir (Şekil 1.2).

1.3 Hipotez

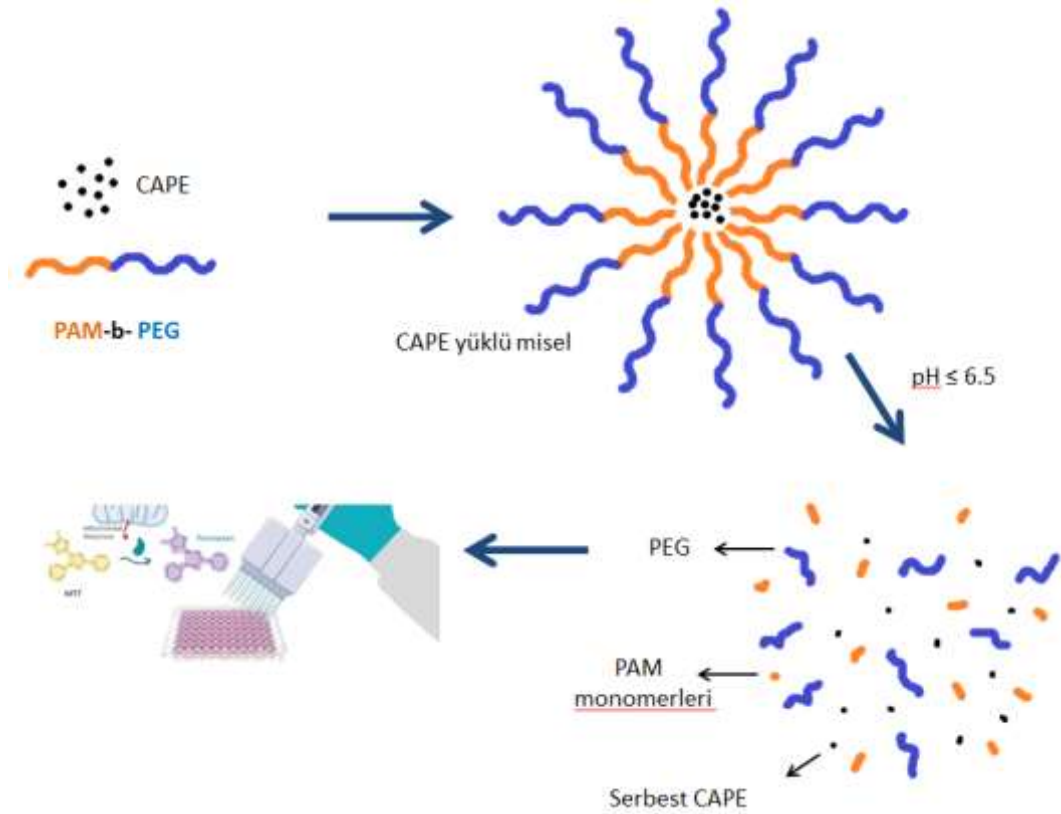
Tez çalışmasında üretilen PAM-b-PEG blok kopolimerinin PAM bloğunun hidrofobik, PEG bloğunun hidrofilik yapıda olmasından ötürü bu kopolimerin sulu çözelti içerisinde misel yapısı oluşturabileceği ve hidrofobik çekirdeğine yine hidrofobik özellikli CAPE molekülünün yüklenebileceği öngörülmüştür (Şekil 1.2).

Çalışmamızda üretilmiş olan blokopolimerdeki PAM bloğu nötr veya bazik pH değerlerinde stabil olmasına karşın sahip olduğu Schiff bazı gruplarından ötürü pH 6,5'ten düşük değerlerde hidrolitik olarak bozunacağı ve bu sebeple de tümör mikro ortamın asidik koşulları içinde CAPE yüklü miselin taşıdığı ilacı serbest bırakacağı, ayrıca hücresel düzeyde endozomların asidifikasyonu (pH ~ 5-6) ve

bunların lizozomlarla füzyonu (pH ~ 4-5) sebebiyle etkili hücre içi ilaç salımı gerçekleştirebileceği düşünülmüştür [10].

Misel sisteminin yapısında bulunan PEG dolaşımda sirkülasyon süresinin artmasını, RES ile etkileşimlerin azalmasını, ilaç salım sisteminin hidrodinamik boyutunun artırılarak vücuttan atılmasını azaltacaktır.

Üretilcek miselin boyutunun özellikle 300 nm gibi bir değerden düşük olmasıyla pasif hedefleme yaparak kanser dokularına ulaşacağı ve olası yan etkileri azaltacağı öngörülmüştür.



Şekil 1. 2 Tez çalışmasında sentezlenen PAM-b-PEG blok kopolimerine CAPE yüklenmesiyle misel oluşumunun şematik gösterimi.

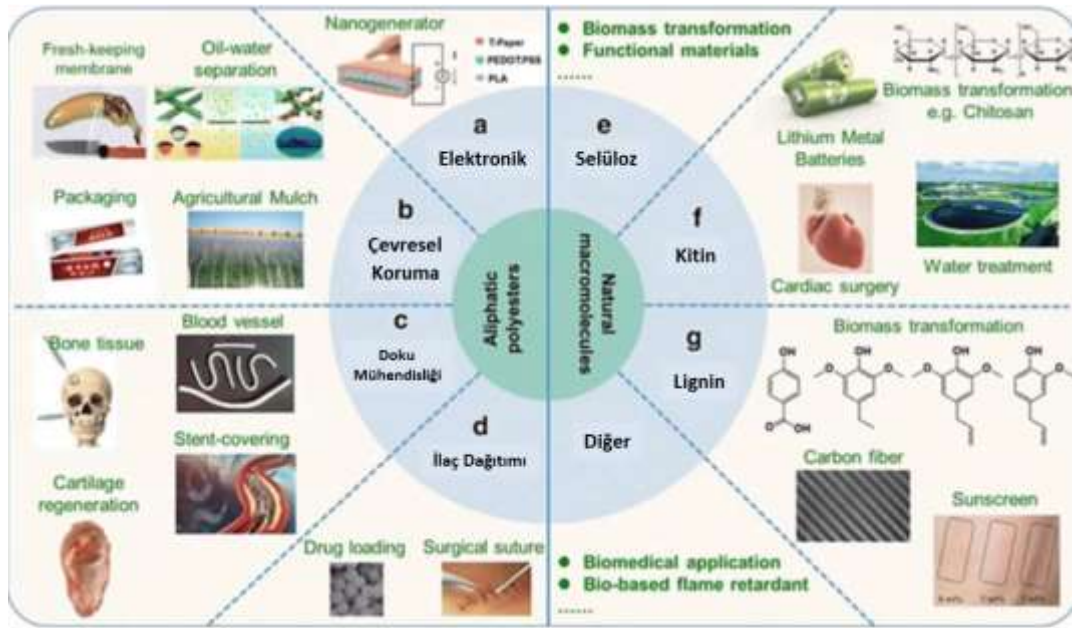
2 GENEL BİLGİLER

2.1 Biyobozunur Polimerler

Biyolojik yapılar veya sistemlerle uyum içinde hareket eden ve vücudun herhangi bir birimini tedavi eden, destekleyen veya değiştiren polimerler, biyouyumlu polimerler olarak adlandırılır. Biyouyumlu polimerler, uygun konakçı cevabı oluşturan polimerler olarak da tanımlanabilir. Biyolojik olarak kabul edilebilir moleküllere ayrılan polimerler ise biyolojik olarak parçalanabilir, biyobozunur polimerler olarak sınıflandırılır [36] ve bu polimerler, işlevlerine hizmet ettikten sonra parçalanabilme ve organizmadan atılabilme gibi önemli bir avantaj sağlar [1].

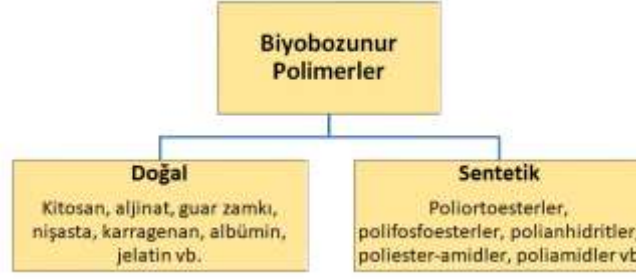
Dünya genelinde birçok araştırmacı, biyolojik olarak parçalanabilir polimerik malzemelerin geniş bir terapötik uygulama yelpazesinde potansiyel kullanım alanlarını incelemektedir. Son yirmi yıl bize gösteriyor ki, biyobozunur polimerik malzemelerin biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda geliştirilmesinde önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Bu polimerlerin biyouyumlu, kolayca modifiye edilebilir ve biyobozunur olmaları bu sonucu doğrulamaktadır. Bu polimer sınıfı kimya endüstrisinde 100 yıldan fazla bir süredir bilinmesine rağmen, normal çevresel koşullar altında bozulma eğilimleri nedeniyle çok fazla ilgi görmemiştir. İlginç bir şekilde, bu durumun, metalik implantlarda olduğu gibi, önceki bir implantın kalıntıları çıkarmak için gerekli olan ve ikinci bir cerrahi müdahaleyi gerektirmeyen biyobozunur bir implant tasarımı için bir avantaj olduğu sonradan fark edilmiştir. İlk FDA onaylı biyobozunur ürün, 1970 yılında Davis ve Geck tarafından tanıtılan ve biyobozunur bir polimer olan poli(glikolik asit)ten (PGA) üretilen Dexon® isimli dikiş ipliğidir [37].

Günümüze kadar birçok farklı monomer, sentetik ve doğal polimerler kullanılarak üretilen biyobozunur polimerlerin nanotaşıyıcılardan doku iskelelerine, implantlardan cerrahi ipliklere kadar geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır [1]. Geçmişten bugüne kullanımına bakıldığında biyobozunur polimerlerin ambalaj sanayisi, kozmetik, dikiş materyalleri, yapay diş ve dolgu macunları gibi diş hekimliği uygulamaları, fotoğrafçılık, malzeme üretimi, gıda ve içecek sanayileri gibi çeşitli ticaret ve sanayi alanlarında köklü uygulama alanları bulunmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1 Biyobozunur malzemelerin uygulama alanları [38]

Geniş anlamda, biyobozunur polimerler doğal veya sentetik olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.2). Doğal kaynaklı biyobozunur biyopolimerler, bitki, hayvan, mikrobiyal ve deniz kaynakları gibi yenilenebilir veya biyolojik kaynaklardan elde edilen polisakkaritler, polinükleotidler ve proteinler gibi polimerlerdir. Biyobozunur sentetik polimerler ise, polyesterler ve alifatik polimerler gibi kimyasal olarak sentezlenmiş polimerlerdir ve insan vücudunda kolayca hidroliz olan ester, amid, üre, üretan veya anhidrit gibi hidrolize edilebilir bağları polimer omurgasında içermektedirler. PLA, PGA, PLGA, PCL gibi polyesterler, polianhidritler, poliamid, polihidroksi alkonat (PHA) türevleri gibi polimerler biyobozunur sentetik polimerlere örnek olarak verilebilir [36, 37].



Şekil 2. 2 Biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması [39].

Proteinler, bazı biyofiberler ve polisakaritler en çok kullanılan biyobozunur doğal polimerler olarak öne çıkmaktadır. Bu polimerlerin kullanımı, saflıklarının sorgulanabilirliği ve daha yüksek maliyetleri nedeniyle sınırlı olsa da birçok farklı alanda kullanıma sunulmuşlardır. En çok kullanılan doğal biyobozunur polimerlerden birisi olan kitosan, toksik olmaması ve immün yanıt oluşturma potansiyelinin bulunmaması nedeniyle biyomedikal ve farmasötik alanda dikkate değer bir ilgi görmüştür. Kitosanın kaderini büyük ölçüde etkileyen önemli bir özellik, asetilasyon derecesi ve çeşitli yan zincirlerle türevlenme düzeyidir. Ayrıca, geniş bir kullanım alanına sahip olması da bu yaygınlığının nedenlerinden biridir [40]. Bei ve çalışma arkadaşları, norcantharidini kitosan nanopartiküllerine enkapsüle ederek bu ilacın oral biyoyararlanımını iyileştirmiştir [41]. Ayrıca, kitosan nanopartiküllerinin yüzeyine galaktoz grupları bağlanarak karaciğere hedefli bir sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Serbest ilaçla karşılaştırıldığında norcantharidin yüklü nanopartiküllerin karaciğerdeki konsantrasyonunun çalışma amacına uygun olarak diğer dokularla kıyaslandığında daha yüksek olduğu gözlenmiştir [40]. Nanopartiküllerin kitosan ile kaplanması sonrasında tümör hücrelerine alımı daha iyi olmakta ve ilacın dolaşım yarı ömrünü artırarak makrofajlar tarafından tanınmasını azaltmaktadır [42]. Ayrıca, pozitif yüzey yükü nedeniyle birçok ilacın oral biyoyararlanımını artırmak amacıyla geniş ölçüde araştırılmıştır; bu, negatif yüklü mukin ile bağlanma yeteneği ile ilişkilidir. Kitosan içerikli ilaç dağıtım sistemlerinin farmasötik ve biyolojik etkinliği, polimerin fizikokimyasal özelliklerine (moleküler ağırlık, hidrofiliklik, yüzey yükü vb.) bağlıdır.

Biyobozunur sentetik polimerler arasında ise polyesterler, polianhidritler, poliamidler, poli(siyanoakrilatlar), poliüretanlar gibi polimerler yer almaktadır. Bunlar arasında, termoplastik alifatik polyesterler, yani PCL, PLGA, PLA ve

poli(butil siyanoakrilat) (PBCA) gibi polimerler en yaygın olarak incelenen sentetik biyobozunur polimerlerdir. Tablo 2.1’de en yaygın kullanılan sentetik biyobozunur polimerler özetlenmektedir.

Tablo 2. 1 En yaygın kullanılan sentetik biyobozunur polimerler ve uygulama alanları, avantajları, dezavantajları ve kimyasal yapıları [1].

Polimer	Uygulamalar	Avantajlar	Dezavantajlar	Yapı
Polifosfazenler	Doku mühendisliği; Aşı adjuvanı	Sentetik esneklik; Kontrol edilebilir mekanik özellikler	Karmaşık sentez	$\left(\begin{array}{c} R_1 \\ \\ P=N \\ \\ R_2 \end{array} \right)_n$
Polianhidritler	İlaç taşıma; Doku mühendisliği	Önemli monomer esnekliği; Kontrol edilebilir bozunma hızları	Düşük moleküler ağırlık; Zayıf mekanik özellikler	$\left(\begin{array}{c} O \\ \\ C-R-C-O \\ \\ O \end{array} \right)_n$
Poliasetaller	İlaç taşıma	Ilıman pH bozunma ürünleri; pH'ya duyarlı bozunma	Düşük moleküler ağırlık; Karmaşık sentez	$\left(\begin{array}{c} R_2 \\ \\ R_1-O-C-O \\ \\ R_3 \end{array} \right)_n$
Poli(orto esterler)	İlaç taşıma	Kontrol edilebilir bozunma hızları; pH'ya duyarlı bozunma	Zayıf mekanik özellikler; Karmaşık sentez	$\left(\begin{array}{c} R_2 \\ \\ R_1-O-C-O \\ \\ O \\ \\ R_3 \end{array} \right)_n$
Polifosfoesterler	İlaç taşıma; Doku mühendisliği	Biyomolekül uyumluluğu; Yüksek biyouyumlu bozunma ürünleri	Karmaşık sentez	$\left(\begin{array}{c} O \\ \\ R_1-O-P-O \\ \\ R_2 \end{array} \right)_n$
Polikaprolakton	Doku mühendisliği	Yüksek işlenebilirlik; Birçok ticari tedarikçi mevcut	Sınırlı bozunma	$\left(O-(CH_2)_5-\overset{\overset{O}{ }}{C} \right)_n$

Tablo 2. 1 En yaygın kullanılan sentetik biyobozunur polimerler ve uygulama alanları, avantajları, dezavantajları ve kimyasal yapıları [1]. (devamı)

Poliüretanlar	Protezler; Doku mühendisliği	Mekanik olarak güçlü; Fiziksel streslere dayanıklı	Sınırlı bozunma; Diğer polimerlerle kopolimerizasyon gerektirir	$\left(\text{R}-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right)_n$
Polilaktid	Doku mühendisliği; İlaç taşıma	Yüksek işlenebilirlik; Birçok ticari tedarikçi mevcut	Sınırlı bozunma; Yüksek asidik bozunma ürünleri	$\left(\text{O}-\underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right)_n$
Polikarbonatlar	İlaç taşıma, Doku mühendisliği; Sabitleyiciler	Kimyaya bağlı mekanik özellikler; Yüzeysel aşınma	Sınırlı bozunma; Diğer polimerlerle kopolimerizasyon gerektirir	$\left(\text{R}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O} \right)_n$
Poliamidler	İlaç taşıma	Konjuge edilebilir yan gruplar; Yüksek biyoyumlu bozunma ürünleri	Çok sınırlı bozunma; Yük nedeniyle oluşan toksisite	$\left(\text{R}-\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \right)_n$

PLGA, yüksek biyoyumluluğu, kolay üretimi, çok yönlü bozunma kinetiği, iyi mekanik dayanıklılığı ve insanlarda in vivo uygulamaları için düzenleyici onayı sayesinde biyomedikal alanda sürdürülebilir, kontrollü ve hedeflenmiş ilaç dağıtımı için en iyi bilinen polimerlerden biridir [43]. PLGA, PLA ve PGA polimerlerini oluşturan monomerlerin kopolimeri olduğundan, özellikleri büyük ölçüde bileşen polimerlerinin doğasına ve mol oranına bağlıdır.

PLA, PGA'ya göre daha hidrofobik yapıdadır. Böylelikle PLA içeriği artırılarak ya da PGA içeriği ile azaltılarak PLGA'nın hidrofobikliği artırılabilir. Bu durum, ilaç dağıtım sisteminin bozunma kinetiği ile salım profilini etkilemekte ve ayrıca sistemin bozunma hızına da yön vermektedir. Hidrofobikliğin artması, bozunma hızını düşürmekte, azalması ise bozunma hızını artırmaktadır. Görüldüğü üzere, PLGA kopolimerinin davranışları önemli ölçüde bileşimine ve molekül ağırlığına bağlı olarak değişmektedir [44]. Bu bağlamda, Panyam ve çalışma arkadaşları, katı halde ilaç-polimer çözünürlüğü üzerinde polimerlerin fizikokimyasal özelliklerinin (moleküler ağırlık, % laktid, ve PLGA'nın uç grup

kimyası gibi) etkisini araştırmışlardır; bu da nihayetinde dağıtım sisteminin in vitro ve in vivo özelliklerini değiştirmektedir [45]. Bu nedenle, bir dağıtım sistemi tasarlarırken kullanılan polimer veya kopolimerin fizikokimyasal özelliklerini dikkate almak, in vitro ve in vivo verimliliğini tahmin etmek açısından son derece önemlidir.

Sentetik biyobozunur polimerlerin uygulaması yalnızca 1960'ların sonlarına doğru başlamıştır [46] ve biyostabil malzemelerle karşılaştırıldığında, uzun vadeli biyouyumluluk avantajları, teknik ve etik sorunlar gibi konular göz önüne alındığında, biyobozunur biyomalzemelerin, kalıcı protez cihazları yerine doku onarımı ve yenilenmesine yardımcı olmak için kullanılmasına yönelik araştırmalar son zamanlarda önemli ölçüde artmıştır [47]. Doğal polimerlerin yüksek saflık gereksinimi, mikrobiyal kontaminasyon riski ve ağır metal içeriği gibi faktörler nedeniyle saflaştırma sürecinin zaman alıcı, zahmetli ve maliyetli olması sentetik polimerlerin kullanım alanını genişletmektedir. Ayrıca, sentetik polimerler kolaylıkla üretilebilmekte ve istenilen özelliklerin elde edilmesi için geniş bir skaladaki fonksiyonel gruplarla modifiye edilebilmektedirler [40].

Tüm bunlar, polimerik biyomalzemelerin, çok yönlülüklerinden dolayı metaller, alaşımlar ve seramikler gibi diğer malzeme sınıflarının yerini hızla almasına yol açmıştır [47]. Non-toksik doğaları, biyouyumlulukları, bozunurlukları, sürdürülebilirlikleri ve yüksek hidrofiliteye sahip olabilme potansiyelleri bu polimerleri avantajlı kılmaktadır [48].

2.1.1 Biyouyumluluk ve Biyobozunurluk

Biyomalzemeler, tıbbi uygulamalarda kullanılmadan önce belirli kriterleri ve düzenleyici gereklilikleri karşılamalıdır. Öncelikle, biyomalzemeler geleneksel yöntemlerle kolayca saflaştırılabilir, işlenebilir ve sterilize edilebilir olmalıdır. Biyomalzeme olarak kullanılacak malzemeler, sentez veya üretim süreçlerinden sonra kalan, sızan safsızlıklar, katkı maddeleri ve bileşiklerden arındırılmış olmalıdır. Bu, polimerik biyomalzemelerde özellikle önemli bir sorundur. Başlatıcılar, stabilize ediciler, emülgatörler, tepkimeye girmemiş monomerler veya oligomerler gibi ekstraksiyon maddeleri, polimerik biyomalzemelerin uygulanması sırasında ortaya çıkabilir ve ciddi yan etkilere neden olabilir.

Biyomalzemeler, belirli uygulama için gerekli biyomekanik özellikleri (gerilim, sıkıştırma ve kayma) sergilemelidir. Bu nedenle, istenilen fiziksel yapılara (örneğin, kristalinlik, dolaşım, denge şişmesi) sahip olmalıdır. Kullanıma bağlı olarak, geçirgenlik, elastiklik, elektriksel özellikler gibi diğer beklenen özelliklere de sahip olmalıdırlar.

Biyomalzemelerin yüzey özellikleri, dikkate alınması gereken en önemli konulardan biridir. Hidrofobiklik veya hidrofiliklik, ıslanabilirlik, yüzey yükü, polarite, reaktif kimyasal grupların dağılımındaki heterojenlik, yüzey enerjisi, pürüzsüzlük (pürüzsüz, pürüzlü veya gözenekli) gibi özellikler, biyomalzemelerin önemli yüzey özellikleri olarak kabul edilmektedir.

Tüm bu özellikler zaman, sıcaklık ve çevresel koşullara bağlıdır ve biyomalzemenin uygulanması sırasında fizyolojik ortamda değişebilir. Zamanla değişen özellikler (örneğin, hareket, ayrılma, bozulmalar, adsorpsiyon/adsorpsiyon biyodegradasyonu, çözünme, korozyon), biyomalzemenin toplam başarısızlığına yol açabilir. Biyomalzemenin, istenilen süre boyunca (1 saat, 1 gün, 1 veya 10 yıl vb.) in vivo özelliklerini ve işlevini koruması önemlidir.

Sonuç olarak, biyomalzemeler biyoyumluluk göstermelidir. Diğer bir deyişle, kendileri ve bozulma ürünleri istenmeyen ev sahibi reaksiyonları (örneğin, tromboz, iltihaplı reaksiyonlar, doku nekrozu, toksisite, alerjik reaksiyonlar, kanserojenite) içermemelidir [49].

Biyoyumluluk: İnsan vücudunun çeşitli yerlerinde protezler ve tıbbi cihazlar gibi çok değişik amaçlarla kullanılmakta olan biyomalzemelere baktığımızda, polimerler, en geniş biyomalzeme sınıfıdır ve tüm biyomalzemeler, tıbbi uygulamalar için nitelikli hale gelmeden önce belirli kriterleri ve düzenleyici gereklilikleri karşılamalıdır. Biyoyumluluk, bu bağlamda en önemli gereksinimlerden biridir [49, 50] ve bir malzemenin vücuda zarar vermeden işlevini yerine getirme yeteneğini ifade eder. Biyoyumluluk, malzemenin fiziksel, mekanik ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra, potansiyel sitotoksik, mutajenik ve alerjenik etkiler gibi birçok unsuru kapsayan geniş bir terimdir [51] ve tüm bu unsurlar çerçevesinde sağladığı optimum uyumdur. Dolayısı ile biyoyumluluk, malzemenin vücuda uygun cevap verebilme özelliğidir. Daha

geniş bir tanımla, biyouyumluluk bir biyomalzemenin, söz konusu tedavinin alıcısı veya yararlanıcısında herhangi bir istenmeyen yerel veya sistemik etki yaratmadan, söz konusu özel duruma en uygun yararlı hücresel veya doku yanıtını oluşturarak ve tedavinin klinik olarak ilgili performansını optimize ederek, tıbbi bir tedaviyle ilgili istenen işlevini yerine getirme yeteneği şeklinde tanımlanabilir [52].

Biyouyumluluğun ön koşulları aşağıdaki gibidir:

- Toksik olmaması
- Kanserojen olmaması
- Mutajenik olmaması
- Alerjik olmaması
- Kirlenici içermemesi (örneğin, katkı maddeleri, çözücüler ve sentez kalıntıları)
- Biyouyumlu bozunma ürünlerine sahip olması
- Biyorezorbe edilebilir olması
- Olumsuz immünolojik yanıt oluşturmaması

Materyalin yüzey özellikleri, kimyasal yapısı ve bozunma ürünleri biyouyumluluğunu etkileyen önemli faktörlerdir [52].

Vücudun biyomalzemelere karşı verdiği tepkiler oldukça farklılık gösterebilir. Biyomalzemelerden beklenen başlıca özellikler; iyi mekanik dayanım, biyouyumluluk (vücutla uyumluluk), korozyon direnci, üstün sürtünme ve aşınma direnci olarak sıralanabilir. Bunun yanı sıra, alerjik reaksiyonlara neden olmamaları, toksik ürünler salgılamamaları, kolayca şekillendirilebilmeleri ve sterilizasyon süreçlerinde özelliklerini yitirmemeleri de büyük önem taşımaktadır. Biyomalzemelerin üstün mekanik özelliklere ve biyouyumluluğa sahip olması, kullanılacakları yere göre uygun özelliklere sahip olmalarını gerektirmekte ve bu doğrultuda doğru malzeme seçimi kritik bir önem arz etmektedir [53]. Biyomalzemelerin biyouyumlu olması gerektiğinden, implantlar ve protezlerin üretiminde kullanılacak malzemelerin seçimi büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda, biyomalzeme ve doku etkileşimleri üzerine önemli araştırmalar yapılmış

olup ve vücudun doğal dokularının yeniden yapılanmasını destekleyen, vücut sıvılarıyla uyumlu biyomalzemeler geliştirilmiştir [54]. Biyolojik uyumluluk, vücudun biyomalzemeyi kabul edebilme kapasitesini ifade eder. Bu nedenle, hem biyomalzemenin kendisi hem de biyomalzemenin yerleştirileceği vücut ortamı titizlikle incelenmelidir. Seramikler, metaller, polimerler ve kompozit biyomalzemeler, biyomalzeme olarak kullanılmakta ve insan sağlığına uyum sağlamaktadır. Biyomalzemelerin istenen mekanik özelliklere sahip olmalarının yanı sıra, biyoyumlulukları da vücut uzuvları ve organlarının tedavisi veya değiştirilmesinde hayati bir öneme sahiptir. Yeni geliştirilen biyomalzemeler, piyasaya sunulmadan önce vücut içinde istenmeyen bir etki yaratmadıklarından emin olmak amacıyla detaylı biyolojik testlere tabi tutulmaktadır. Bu testler, öncelikle vücut dışında, ardından vücut içinde gerçekleştirilmekte ve son olarak klinik denemelerle malzemenin biyolojik güvenilirliği ve performansı değerlendirilmelidir. Biyomalzeme çevresinden alınan doku örneklerinin morfolojik analizi, malzemenin biyolojik uyumluluğu hakkında önemli ipuçları sunabilir. Özellikle ortopedi ve travmatoloji alanında kullanılan biyomalzemeler, kapsamlı testlerden geçtikten ve biyoyumlulukları onaylandıktan sonra klinik kullanıma girmektedir. Ancak, tüm bu testlere rağmen biyomalzemeler, alerjik, immün, nonimmün, mutajenik, kanserojenik veya inflamatuvar reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, kullanılacak biyomalzemenin test sonuçları büyük önem taşımaktadır [55].

Polimerik yapılar, dendrimerler ve polimerik miseller, ilaç taşıyıcı sistemlerde, doku mühendisliği ve yara iyileşmesi gibi birçok biyomedikal uygulamada kullanılan ve oldukça geniş bir uygulama alanında üstün özellikler sergilemekte olan biyomalzemelerdir. Polimer bazlı malzemeler ve nano ölçekli yapılar, biyolojik olarak uyumlu özellikler göstermedikçe bu sistemlerde etkin bir şekilde kullanılamaz. Ayrıca, biyoyumlu bir polimerin ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılabilmesi için genellikle biyobozunur olması da gerekmektedir. Bozunma sürecinde toksik olmayan alkoller ve asitler gibi zararsız bileşenler ortaya çıkarmalıdır [56].

Bu kapsamda biyoyumlu malzemeler, hücrelerin ve bireylerin biyolojik işlevlerini olumsuz yönde etkilemeden, ciddi yaralanmalara ya da toksik,

immünojenik, trombojenik veya kanserojen gibi etkilere yol açmadan güvenle kullanılabilir [51, 52].

Sonuç olarak; biyouyumluluk, kullanım sürecinde yani biyolojik bir ortamda bulunduğu süre boyunca malzemenin, vücut sistemine uygun cevap verebilme, vücutla uyuşabilir, kendini çevreleyen dokuların normal fonksiyonlarına engel olmama ve iltihaplanma oluşturmama yeteneği olarak tanımlanabilmektedir. Biyouyumlu malzemeler, bağışıklık sistemini uyarmadan, toksik reaksiyonlara neden olmadan ve doku ile etkileşime girerek vücut tarafından kabul edilebilir olmalıdır. Bu özellik, özellikle ilaç salım sistemlerinde ve tıbbi cihazlarda kritik bir rol oynar [52].

Tüm bu süreçlerin sonucu olarak biyouyumluluğun sağlanması ve sürdürülmesi, biyomalzeme biliminin uzun yıllardır odak noktası olmuştur ve malzemeler ve dokular arasındaki etkileşimlerin anlaşılması, en iyi performansı sağlayacak biyomalzemelerin araştırılmasına yönlendirmiştir. Uzun süreli implant cihazları üzerindeki deneyimlere dayanarak, bir tıbbi cihazın biyouyumluluğu için temel gereksinimin, malzemenin dokuya zarar vermemesi olduğu gösterilmiştir [52].

Biyobozunurluk: Polimer bozunması, ana zincir bağlarının kırılmasına neden olan kimyasal reaksiyonlar sonucunda daha kısa oligomerler, monomerler ve/veya diğer düşük moleküler ağırlıklı bozunma ürünlerinin oluşumu olarak tanımlanır [47]. Bozunma süreci ya biyokatalitik işlemlerle (bakteriler, mantarlar, enzimler vb. aracılığıyla) ya da yalnızca kimyasal ve radikal işlemlerle (hidroliz, oksidasyon, UV ışınlaması) gerçekleşir [48] ve polimerler canlı tarafından sindirilebilen veya atılabilen asitler ve diğer bileşenlere parçalanır [42]. Hem doğal (örneğin, kolajen) hem de sentetik (örneğin, poli(α -hidroksi) asitler) biyobozunur polimerler, biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir [49].

2.2 Biyobozunur Polimerlerin Bozunma Mekanizmaları

Biyobozunur polimerlerin bozunma mekanizmaları, polimerin kimyasal yapısına, çevresel koşullara ve bozunma süreçlerine etki eden faktörlere göre farklılık gösterir [57]. Bununla birlikte polimerin kimyasal yapısı, moleküler mimarisi, moleküler ağırlığı ve morfolojisi gibi özellikler başta olmak üzere polimerin biyobozunma hızını etkileyen birçok faktör bilinmektedir [58]. Ayrıca

malzemenin boyutu, geometrisi ve gözenekliliği de önemli faktörler arasında yer alırken, pH ve sıcaklık gibi çevresel koşullar da bozunma hızını etkileyen unsurlar arasındadır [59]. Bozunma süreciyle birlikte polimer özelliklerinde değişiklikler meydana gelir. Bozunmayı izlemek için en önemli parametre, moleküler ağırlığı olmakla beraber mekanik dayanım kaybı, kristalleşme, monomer oluşumu ve pH değişiklikleri de bozunma ile ilişkili diğer olaylardır [59]. Polimer zincirinde bulunan genellikle ester bağları gibi kararsız bağların su ile reaksiyona girmesi sonucu hidrolitik bozunma meydana gelir. Hidrofilik polimerler çok miktarda su tutar ve hidrofobik matrislere göre daha hızlı bozunurlar. Dolayısı ile reaksiyon hızı, polimerin suyu absorbe etme yeteneğiyle de yakından ilişkilidir [60].

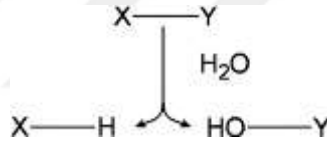
Çeşitli gelişmiş analitik teknikler kullanılarak, polimer bozunma mekanizmaları ayrıntılı olarak incelenebilmektedir. En basit ve etkili yöntem olarak, polimerik malzemenin bozunması sırasında gerçekleştirilen kütle kaybı analizi öne çıkmaktadır. Çoğu durumda bozunmayı izlemek için kullanılan ana parametreler, moleküler ağırlık, kristallik, pH ve çekirdek içindeki termal değişimlerdir.

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak, bozunabilir polimerik sistemlerin bozunma sürecinde dış ve iç morfolojisine dair değişimler takip edilirken jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile de moleküler ağırlık kaybı tespiti yapılabilmektedir. Bozunabilir polimerlerin bozunma sırasında termal özelliklerinde meydana gelen değişimler içinse diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve termo gravimetrik analiz (TGA) yöntemleri kullanılabilmektedir.

Polimer bozunmasının incelenmesinde kullanılan diğer teknikler ise kromatografik analiz ile monomer salımının belirlenmesi ve FT-IR spektroskopisi kullanılarak uç grup analizi sıralanabilir. Raman saçılması ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopileri ile de polimerin kimyasal yapısındaki değişim belirlenebilmektedir. Geniş açılı X-ışını kırınımı (XRD) yöntemi ile de polimerik malzemenin kristalinitesindeki değişim saptanabilmektedir [61].

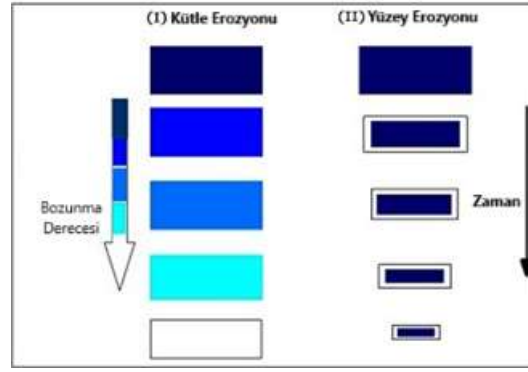
Biyobozunur polimerlerin bozunma mekanizmaları genel olarak hidrolitik, enzimatik ve oksidatif bozunma şeklinde olmak üzere üç ana mekanizma ile açıklanabilir. Bununla birlikte pH, sıcaklık ve su geçirgenliği gibi önemli faktörler polimerlerin bozunma mekanizmasında etkilidir.

Hidrolitik Bozunma: Hidrolitik olarak bozunabilir polimerler, omurgalarında hidrolitik olarak zayıf kimyasal bağlar bulunduran ve dış bir etkiye gerek kalmadan parçalanabilen malzemelerdir. Kırılan bağ sonucunda, ürünlerden biri bir hidrojen atomu, diğeri ise bir hidroksil grubu kazanır (Şekil 2.3). Esterler, anhidritler, asetaller, karbonatlar, amidler, üreanlar ve fosfatlar dahil olmak üzere birçok bozunabilir polimer, hidrolize duyarlı bağlar içerir. Bu polimerik ailelerin biyomalzeme olarak işlev görebilme kapasitesine önemli ölçüde etki eden temel özelliklerden biri, bozunma hızları ve erozyon mekanizmalarıdır. Polifosfazenler gibi bazı bozunabilir polimerler hidrolitik olarak çok kararsızdır, poliamidler gibi bazıları ise hidrolitik olarak son derece stabildir [2]. Bazı ailelerin (polifosfazenler ve polianhidritler) bozunma hızı, bu aileler için, malzeme özelliklerinde önemli esneklik sağlayan polimer kimyasına bağlı olarak, büyük ölçüde değiştirilebilmektedir. Bozunma hızları, su difüzyonu, monomer çözünürlüğü ve difüzyonu, malzeme geometrisi ve boyutu gibi diğer faktörlerle birleştirilerek, bozunabilir bir polimerik biyomalzemenin nasıl erozyona uğrayacağı belirlenmektedir [62].



Şekil 2. 3 Hidrolitik olarak hassas olan X-Y bağının su molekülü tarafından kırılması sonucu oluşan X-H ve HO-Y ürünleri [1]

Bozunma genellikle polimerik malzemenin dış yüzeyinden başlayarak iç kısımlarına doğru ilerleyen yüzey erozyonu (surface erosion), tüm kütlede eşit bir dağılımla gerçekleşen kütle erozyonu (bulk erosion) şeklinde gerçekleşebildiği gibi ikisinin bir kombinasyonu olarak da gerçekleşebilir [2, 62] ki bu kategorizasyon, istenen uygulama için hangi malzemenin en iyi olduğunu belirlemede son derece önemlidir [1]. Dolayısı ile biyolojik olarak parçalanabilir polimerler, hücre ortamında kütle erozyonu ve yüzey erozyonu ile hidrolize veya enzimatik bozunmaya duyarlı olan hidrolize edilebilir bir omurga içerir. İlki, su penetrasyonu nedeniyle tüm kesitte bozunmayı ve ardından uzun polimer zincirlerinin yavaş kopmasını içerirken, ikincisi ise bir yüzey olayıdır (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4 Biyolojik olarak parçalanabilir polimerin bozunma mekanizması [37]

Yüzey erozyonu oranı, polimerin yüzeyinde meydana gelen erozyon, polimerin hidrolitik (suyun etkisiyle meydana gelen kimyasal tepkimeler) bir ortama maruz kalan yüzey alanına bağlıdır. Başka bir deyişle, yüzey alanı ne kadar genişse, suya maruz kalan bölge o kadar fazla olacak ve erozyon oranı artacaktır. Kütle erozyon oranı ise polimerin genel yapısındaki bozunma oranı, kristal yapı ve gözeneklilik olmak üzere iki ana faktöre bağlanmıştır. Kristal yapı, polimer matrisindeki düzenlilik düzeyidir ve daha kristalize yapılar genellikle bozunmaya daha dirençli olurken, amorf yapılar daha hızlı bozunabilir. Polimerin içinde bulunan boşluklar veya gözenekler, suyun polimer içine daha kolay nüfuz etmesini sağlayarak kütle erozyonunu hızlandırabilir.

Mikroküreler ve implantlar gibi ilaç salım sistemlerinde, ilacın polimer matrisinden salınma mekanizması üç adımda anlatılabilir:

İlk Ani Salım: Polimer matrisinin yüzeyine yakın olan ilaç molekülleri, su ile temas ettiğinde hızla çözünür ve serbest kalır. Bu durum, ilacın başlangıçta yüksek bir konsantrasyonda salınmasına neden olur ve genellikle "başlangıç salımı" olarak adlandırılır.

Yavaş Salım (Ağ Gevşemesi ile İlişkili): Polimer matrisinin yapısı, bozunma sırasında gevşemeye başlar. Bu süreç, ilaç moleküllerinin çözünmesi için matris içinde daha fazla serbest hacim oluşturur. Bu aşamada ilaç salımı daha kontrollü ve yavaş bir şekilde gerçekleşir.

Hızlandırılmış Salım: Polimer matrisi bozunarak oligomer ve monomerlerine ayrılır ve bu süreç, polimerin içinde yer alan mikroçevrenin kimyasal özelliklerini değiştirir. Bu mikroçevre, kalan ilacın hızla salınmasını tetikleyebilir.

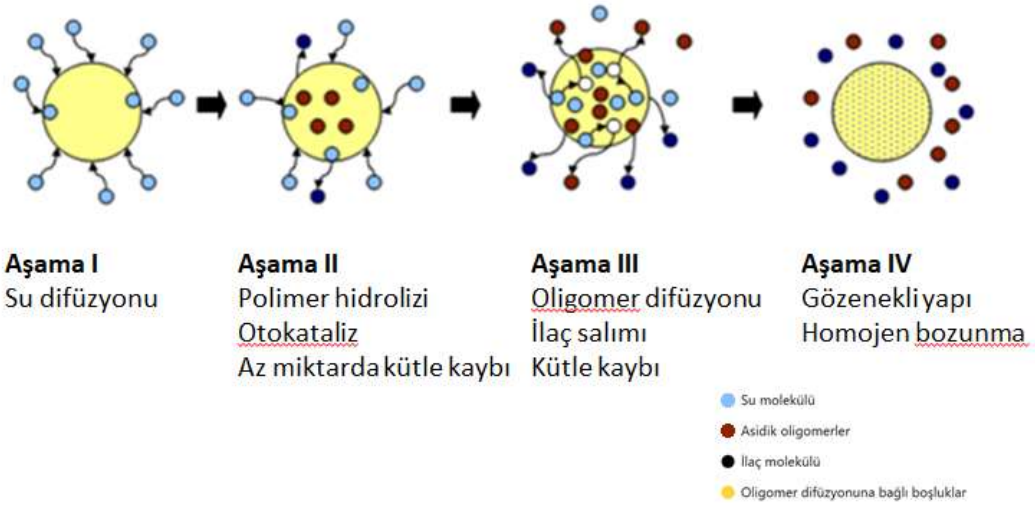
Salım profilini etkileyen en önemli faktörler şunlardır:

- İlacın kimyasal ve fiziksel özellikleri (örneğin, suda çözünürlük).
- Polimerin bozunma hızı (yavaş bozunan polimerler, daha uzun süre salım sağlar).
- Polimerin su geçirgenliği (su, polimere kolayca nüfuz eder ve salım hızı artar).
- İlaç ile polimer matrisi arasındaki etkileşim (güçlü etkileşimler, salım hızını yavaşlatabilir).

Örneğin, kontrollü bir salım profili isteniyorsa, bu faktörlerin dikkatlice optimize edilmesi gerekir.

Bir kez bozunduğunda, oluşan momerler/oligomerler böbrek tarafından atılabilir ya da son olarak trikarboksilik asit (Krebs) döngüsü gibi çeşitli metabolik yollara katılarak farklı metabolitlere dönüşebilirler [59, 61, 63].

Polilaktik asit (PLA) ve poliglikolik asit (PGA) gibi polimerler, kütle erzyonuna tipik örneklerdir [1]. Polilaktid/glikolid ailesinin üyelerinin hidrolitik bozunması, Şekil 2.5'te gösterildiği gibi dört aşamada ilerler. Su difüzyonu ilk aşamadır. Bunu asidik uç gruplara sahip oligomerlerin hidroliz reaksiyonunu otokatalize ettiği ikinci aşama takip eder. Üçüncü aşamada kritik bir moleküler ağırlığa ulaşılır ve oligomerler polimerden dışarı doğru yayılmaya başlar. Su molekülleri, oligomerlerin uzaklaşmasıyla oluşan boşluğa yayılır ve bu da oligomerlerin difüzyonunu teşvik eder. İlaç gözenekli bölgelerden yayılırken polimer kütleinde belirgin bir azalma ve ilaç salım oranında keskin bir artış meydana gelir. Dördüncü aşamada ise, polimerik matris oldukça gözenekli hale gelir ve bozunma homojen olarak daha yavaş ilerler [64, 65].



Şekil 2. 5 Polimerlerin hidrolitik bozunmasıyla gerçekleşen ilaç salımının şematik gösterimi [61]

Genel olarak baktığımızda polimerlerin hidrolitik bozunması üzerinde etkili önemli faktörleri şu şekilde sıralayabiliriz [49]:

- Su geçirgenliği
- Kimyasal yapı
- Moleküler ağırlık
- Morfoloji
- Cam geçiş sıcaklığı
- Katkı maddeleri
- Cihaz boyutları
- Hidroliz mekanizması
- Çevresel faktörler
- İmplantasyon veya enjeksiyon yeri
- Bozulma ortamının pH'ı, iyonik gücü ve sıcaklığı

Enzimatik Bozunma: Enzimatik olarak parçalanabilir polimerler, teknik olarak hidrolitik olarak hassas olsa da, fizyolojik koşullar altında anlamlı bir bozunmaya uğramak için gerçekte kataliz gerektiren bağlara sahip polimerlerdir. Bu polimerlerin çoğu, hidrolitik bozunmada bahsedilen polimerlerden çok daha düşük hidrolitik bozunma oranlarına sahip olan eter veya amid bağlarını içerir [1]. Enzimatik bozunma, enzimlerin polimer zincirlerini hedef alarak parçalamasıyla ortaya çıkar. Bu mekanizma genellikle doğada bulunan biyopolimerlerde ve biyolojik olarak uyumlu sentetik polimerlerde görülür [60]. Mikroorganizmalar

veya vücut içinde bulunan enzimler, bu tür bozunmayı tetikleyebilir. Örneğin, poliester bazlı polimerlerin enzimler tarafından parçalanması yaygındır [1].

Çevresel faktörler veya biyolojik ajanların etkisiyle gerçekleşebilen enzimatik bozunma, organizmalarda bulunan enzimlerin polimer zincirlerini parçalayarak, daha küçük moleküller ya da monomerler haline getirdiği bir süreçtir. Bu süreç, özellikle biyomedikal uygulamalarda, örneğin ilaç salım sistemlerinde, polimerin kontrollü bir şekilde bozunmasını sağlamak amacıyla önemlidir [66, 67].

Enzimatik bozunma mekanizması, polimerin kimyasal yapısına ve ortamda bulunan enzim türüne bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Özellikle ester bağları içeren polimerlerde, esteraz gibi enzimler ester bağlarını hidroliz ederek polimer zincirlerini parçalar. Bu durum, polimerlerin su içinde çözünürlüğünü artırarak daha hızlı bozunmasına yol açar [68]. Örneğin, PLGA gibi yaygın kullanılan biyobozunur polimerler, ester bağları içerdikleri için enzimatik olarak hidroliz edilebilirler [69]. Biyobozunur polimerlerin enzimatik bozunması, sıcaklık, pH ve enzim konsantrasyonu gibi çevresel koşullardan da etkilenir. Özellikle pH değeri, enzimlerin optimum aktivite gösterdiği aralıkta olmalıdır; örneğin birçok hidrolitik enzim, nötr veya hafif asidik pH'da daha etkili çalışır [69].

Sonuç olarak, biyobozunur polimerlerin enzimatik bozunması, ilaç salım sistemlerinde ve doku mühendisliğinde polimerlerin kontrollü bir şekilde parçalanmasını sağlamak açısından kritik öneme sahiptir. Bu mekanizma sayesinde ilaç salım hızları ve polimerin vücut içinde kalma süreleri ayarlanabilir [70].

Oksidatif Bozunma: Oksijen, serbest radikaller veya peroksit gibi reaktif oksijen türleri polimer yapısındaki bağları kırarak oksidatif bozunmaya neden olabilir. Bu mekanizma, inflamatuvar süreçlerde polimerlerin bozunmasına katkıda bulunabilir.

Polimerik biyomalzemeler vücut sıvılarına ve dokularına maruz kaldığında kimyasal ve enzimatik oksidasyonla parçalanabilir. Vücut, enfeksiyon, doku hasarı veya yabancı maddelere karşı savunma mekanizması olarak inflamatuvar yanıt başlatır. Bu yanıt sırasında, lökositler ve makrofajlar gibi bağışıklık sisteminin bazı hücreleri, iltihap bölgesinde aktif hale gelir. Bu hücreler, savunma amaçlı olarak yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Bu türler şunlardır:

- Süperoksit (O_2^-): Oldukça reaktif bir moleküldür, mikroorganizmaları öldürmekte rol oynar.
- Hidrojen Peroksit (H_2O_2): Süperoksitten türeyen bir moleküldür ve antimikrobiyal etkiye sahiptir.
- Nitrik Oksit (NO): Hem mikroorganizma öldürücü hem de damar genişletici etkileri olan bir gazdır.
- Hipokloröz Asit (HOCl): Özellikle bakteri ve virüslerin yok edilmesinde etkili bir bileşiktir [71].

Bu türlerin oksidatif etkisi polimer zincirinin kopmasına neden olarak polimerin parçalanmasını sağlayabilmektedir.

Diğer Faktörler: pH, sıcaklık, ışık, manyetik alan, redoks potansiyelleri, enzimler, iyonik kuvvet, ultrason vb çevresel faktörler gibi küçük değişikliklere karşı yanıt olarak önemli konformasyonel değişiklikler geçirebilen polimerler, “Uyaranlara duyarlı”, “akıllı” veya “çevresel duyarlı” olarak da adlandırılmaktadır. Bu yanıt, genellikle polimerlerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerinde moleküler, mikroskobik ve makroskobik olabilen önemli değişikliklerle sonuçlanır [72].

Bu polimerler özellikle kontrollü ve kendiliğinden düzenlenen ilaç dağıtımında, fizyolojik ihtiyaçlara göre optimum ilaç salımını sağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır [73].

Sıcaklık: Uyaranlara duyarlı polimerler arasında sıcaklığa duyarlı olanlar en çok araştırılan sınıftır ve ilaç dağıtım teknolojisinin nasıl modüle edilebileceğini ve akıllı ilaç dağıtım sistemi kavramına nasıl öncülük edilebileceğini gösteren başarılı bir model olarak önemli bir rol oynamıştır [73].

Biyobozunur polimerlerin bozunma mekanizmaları, özellikle sıcaklık etkisi altında oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Bu polimerler, ortamın sıcaklık değişikliklerine bağlı olarak yapısal bozulmalar gösterebilirler [74]. Yüksek sıcaklıklar genellikle bozunma hızını artırır [59]. Sıcaklığın artışı, polimer zincirlerinin kinetik enerjisini artırarak moleküler hareketliliği hızlandırır, bu da zincir kopmasına neden olabilir [75].

Sıcaklık artışı ile biyobozunur polimerler, özellikle ester bağları içeren polimerler, hızla hidrolize olabilir ve monomerlerine ayrılabilir. Hidroliz hızı, polimerin

kristallik derecesi ve amorf yapısına bağı olarak da değişir; amorf bölgeler daha hızlı hidrolize uğrar çünkü su molekülleri bu bölgelere daha kolay nüfuz eder [61]. Ayrıca, yüksek sıcaklıklar oksidatif bozunmayı da hızlandırabilir, bu da polimerlerin yapısında radikal reaksiyonların başlamasına yol açar [76].

Bununla birlikte fizyolojik vücut sıcaklığı olan 37 °C'nin, ilaç salımı için uygun bir tetikleyici olabileceği düşüncesinden hareketle, terapötik ajanların vücut sıcaklığında salımını sağlayabilen polimerik nanokapsüller, etkili bir ilaç taşıyıcı ortam olarak değerlendirilmektedir. Bu tür sıcaklığa duyarlı yapılar, sıcaklık değişimiyle faz geçişi, su tutma kapasitesi gibi özellikler sergilemektedir [77]. Örneğin, negatif sıcaklık duyarlı hidrojel yapılar, belirli bir limit sıcaklığın altında su tutma (şişme) özelliği göstermektedir. Ancak, bu limit sıcaklığın üzerine çıkıldığında, hidrofobik özellik kazanarak su moleküllerini itmeye başlar. Diğer bir ifadeyle, limit sıcaklığın altında polimerik yapı su içinde çözünürken, limit sıcaklığın üzerinde çözünmez hale gelmektedir. Literatürde, termal geçişin gerçekleştiği en düşük limit sıcaklık değeri "en düşük kritik çözelti sıcaklığı" (lowest critical solution temperature, LCST) olarak tanımlanmaktadır. Daha ayrıntılı incelemeler, LCST değerinin altında polimer zincirleri ile su molekülleri arasında hidrojen bağlarının baskın olduğunu, LCST'nin üzerinde ise bu hidrojen bağlarının bozulduğunu ve hidrofobik özelliklerin baskın hale geldiğini ortaya koymuştur [78, 79].

Biyobozunur polimerlerin bozunma mekanizması, aynı zamanda polimerin yapısına, ortamın pH'ına ve çevresel koşullara da bağlıdır [57]. Örneğin, polilaktik asit (PLA) gibi polimerler, yüksek sıcaklıklarda hızla bozulurken, düşük sıcaklıklarda daha stabil kalabilir [80]. Bununla birlikte, ortamda bulunan enzimler de sıcaklık etkisiyle aktif hale gelerek biyobozunma sürecini hızlandırabilir [81].

Sonuç olarak, sıcaklık etkisi biyobozunur polimerlerin bozunma hızını ve mekanizmasını büyük ölçüde etkiler ve bu mekanizmaların anlaşılması, özellikle ilaç salımı gibi uygulamalarda oldukça önemlidir.

Su Geçirgenliği: Polimerin su geçirgenliği, bozunma mekanizmasını doğrudan etkiler. Hidrofobik polimerler yüzey erozyonuna, hidrofilik polimerler ise kütle erozyonuna eğilim gösterir [60].

pH: pH, oldukça ilginç bir uyaran olup, patolojik ve anatomik farklılıklara bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu durum, organlar, dokular, hücreler ve hücre içi bölmelerde (Tablo 2.2) pH duyarlı ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır [82].

Tablo 2. 2 Vücut içerisindeki farklı bölgelerdeki pH değerleri [82].

Vücut Bölgesi	pH Değeri
Kan	7,35 – 7,45
Mide	1,0 – 3,0
Duodenum	4,8 – 8,2
Kolon	7,0 – 7,5
Endozomal	6,0 – 6,5
Lizozomal	4,5 – 5,0

Fizyolojik pH değerlerindeki değişimlere bakıldığında (Tablo 2.2), pH'ın biyomedikal uygulamalarda önemli bir sinyal mekanizması olarak ele alınması gerektiği açıkça görülmektedir.

Zayıf asitler ve bazlar, pH'daki değişimlere bağlı olarak farklı iyonlaşma durumları göstermektedir.

Bu tür zayıf polielektrolitler, pH değişikliklerine bağlı olarak iyonlaşma durumlarında farklılık gösterdiğinden, konformasyonlarında değişimler (şişme veya büzülme) meydana gelir ve bazı polimerlerde faz geçişleri gözlemlenebilir. Zayıf polielektrolitlerin bu özelliği, etkili bir şekilde kontrollü ilaç salımı ve gen transferinin gerçekleştirilmesine olanak tanımaktadır [83].

İlk çalışmalarda gastrointestinal (GI) sistemdeki büyük pH dalgalanmalarıyla (pH 1~8) ilgilenilmiş ve oral uygulamalar için kontrollü salım formülasyonları üzerinde yoğunlaşmıştır [84]. Son zamanlarda, daha hassas pH duyarlılığı ve ayarlanabilirliğe sahip yeni pH-duyarlı polimerler geliştirilmiş ve özellikle kanser ilaç taşıyıcıları olarak dikkat çekmiştir. Bu polimerler, pH ile tetiklenen salım, yük koruma/açığa çıkarma, PEG atılımı ve ligand/hücre geçirgen peptitlerin sunulması gibi özellikleri sayesinde, pH duyarlı ilaç taşıma sistemleri için önemli avantajlara sahiptirler [85].

pH duyarlı polimerler, çözünebilirlikleri veya sulu çözelti içindeki konformasyonları çevresel pH ile geri dönüşümlü ya da geri dönüşümsüz olarak değişebilen polimerlerdir. Örneğin tipik anyonik ve katyonik pH-duyarlı polimerler olan poli(akrilik asit) (PAA) ve poli(N,N'-dietil-aminoetil metakrilat) (PDEAEM), pH'ya bağlı faz geçiş davranışlarını gösterir. PAA, bazik pH'da çözünürken, PDEAEM asidik pH'da iyonize olur ve çözünür hale gelir [86].

Polimerin pH duyarlılığı, yapısında bulunan iyonlaşabilir grupların (örneğin, asidik veya bazik gruplar) özelliklerine bağlıdır. Bu gruplar, belirli bir pH seviyesinde protonlanabilir (H^+ alabilir) veya deprotonlanabilir (H^+ kaybedebilir). pH duyarlılığı, hem polimerin yapısal özelliklerine hem de çevresel koşullara göre optimize edilebilir. Bu faktörler:

- İyonlaşabilir grupların yapısı: Asidik gruplar (örneğin, karboksilik asit) veya bazik gruplar (örneğin, aminler) farklı pH aralıklarında duyarlılık gösterir.
- Polimerin bileşimi: Polimerin bileşimindeki monomerlerin türü ve oranı duyarlılığı etkiler.
- İyonik güç: Çevredeki çözeltinin tuz konsantrasyonu polimerin iyonlaşma davranışını değiştirebilir.
- Hidrofiliklik/hidrofobiklik: Polimerin ana zincirinin ve yan gruplarının hidrofiliklik veya hidrofobiklik özellikleri, pH duyarlılığına katkıda bulunur.

Kimyasal veya fiziksel olarak çapraz bağlanmış pH-duyarlı polimerlerin yapıları, genellikle şişme/büzüşme davranışı gibi özellikler sergiler [85]. Eisenberg ve arkadaşlarının 1950'de PAA bazlı hidrojelilerin pH duyarlı şişme/büzüşme davranışını raporlamasından bu yana, çok sayıda pH duyarlı polimerik sistem geliştirilmiş ve farmasötik uygulamalar (enterik kaplama malzemeleri, spesifik hedefleme, tümör spesifik dağıtım), kendiliğinden düzenlenen insülin dağıtım sistemleri ve biyosensörler gibi biyomedikal alanlarda araştırılmıştır [87].

Geleneksel pH duyarlı polimerler, geniş bir pH aralığında kademeli geçiş gösterirler ve hassasiyetleri genellikle fizyolojik pH seviyesinin dışında kalır. Bu durum, biyomedikal uygulamalardaki kullanım alanlarını sınırlamaktadır. Bae ve ekibi, sülfonamid grupları kullanarak fizyolojik koşullara yakın dar bir pH

aralığında geçiş yapabilen yeni pH-duyarlı polimer sistemleri geliştirmiştir. Sulfonamid bazlı bu polimerler ilaç taşıyıcı olarak çeşitli yapılar içinde uygulanmakta ve hedef bölgelerde terapötik etkinliği artırmak için kullanılmaktadır [88].

Ana zincirinde asit/baz-duyarlı bağlar bulunduran polimerler de pH'a duyarlı polimerler olarak adlandırılabilir. Bu polimerler de, çevresel pH değişikliklerine yanıt verme yeteneğine sahiptir. Bu yanıt, ilgili bağın kopması ve polimerin bozunması yoluyla gerçekleşmektedir. Örneėin, pH dřüşő, asit-duyarlı kovalent bağların (hidrazon gibi) tersinir şekilde kopmasını tetikleyerek polimer zincirlerinin hidrolizi/bozunması veya polimer agregatlarının ayrışmasına neden olabilir. Asit-duyarlı bağlara sahip polimerler, genellikle kanser tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcılarının tasarımında nerildikleri için ilaç salımında en sık kullanılan polimerlerdir. Bu amaçla en yaygın kullanılan asit-duyarlı bağlar arasında hidrazon, asetal, ketal ve boronat ester bulunur. Bu bağların yapısı, bozunma mekanizması ve kopma sonrası oluşan yan ūrőnler şekil 2.6'da sunulmaktadır.

Bağ	Yapı	Parçalanma Koşulları	Parçalanma Ürünleri
Hidrazon		$\xrightarrow{\text{pH} \approx 5.5}$ 200 dakika içinde %100 bozunma, pH 7.5'e kıyasla 10 kat daha hızlı	
İmin		$\xrightarrow{\text{pH} \approx 5, 3 \text{ saat içinde parçalanma}}$	
Sis-akonitil		$\xrightarrow{\text{pH} \approx 4}$	
Asetal		Metoksi sübtüent içeren bisakrilamid asetal, pH ≈ 5 'te yarılanma süresi 5.5 dakika $\xrightarrow{\text{Hafif asidik pH'ta tam hidroliz} < 1 \text{ saat}}$	
Ketal		$\xrightarrow{\text{pH} \approx 5.5, \text{ yarılanma süresi } 2 \text{ saat}}$	
Ortoester		$\xrightarrow{\text{pH} \approx 5-6, 1 \text{ saat}}$	
Oksimler		$\xrightarrow{\text{pH} \approx 5}$	
Boronat Ester		$\xrightarrow{\text{pH} \approx 5, 120 \text{ dakikada parçalanma}}$	

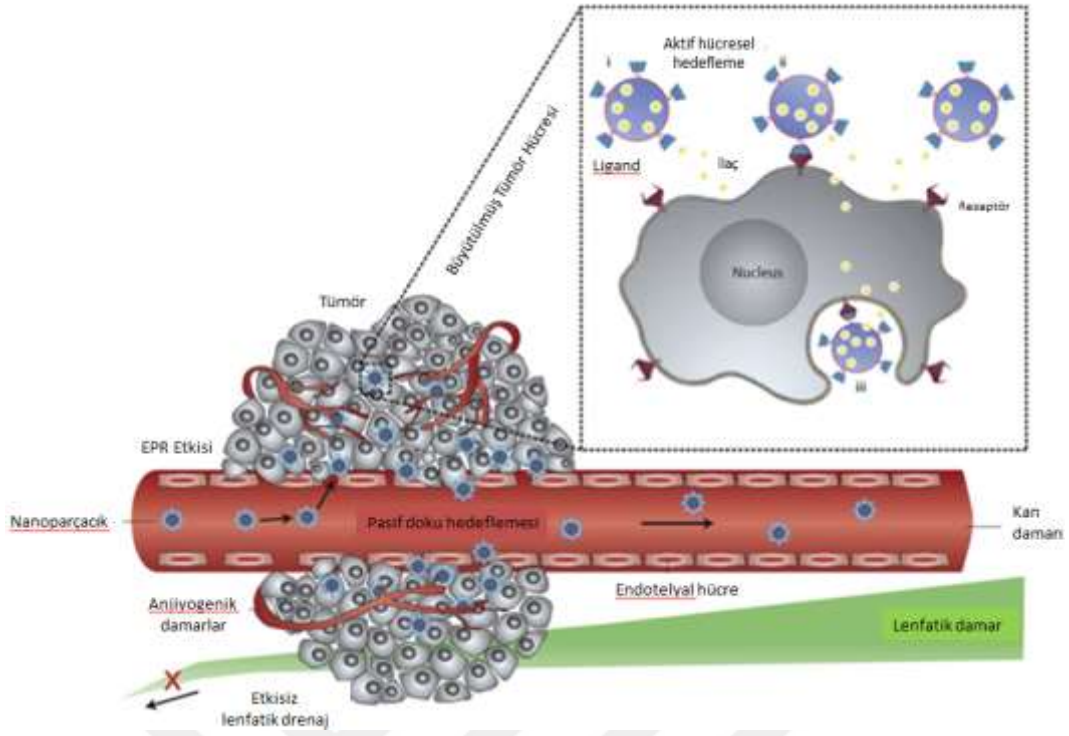
Şekil 2. 6 Biyobozunur polimerlerin omurgalarında en yaygın bulunan pH duyarlı bağlar [89].

pHe (düşük ekstraselüler pH'ı) duyarlı polimerler ise, belirli pH seviyelerine tepki veren ve özellikle tümör bölgelerindeki düşük ekstraselüler pH'ı (pHe) hedef alan kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılır. Bu polimerler, düşük pH koşullarında fizikokimyasal özelliklerini değiştirir ve böylece ilaç salımını tetikler. Bilindiği üzere kontrolsüz hücre büyümesi ve yayılımı ile karakterize edilen bir hastalık grubu olan kanser gibi hastalıkların tedavisinde, özellikle pHe seviyesindeki değişimlerden yararlanarak, hassas ilaç taşıma ve salım mekanizmaları geliştirilmiştir. Kanser hücrelerindeki zayıf perfüzyon nedeniyle tümörden

türetilen protonları uzaklaştırma kabiliyetinin azalması ile kombinasyon halinde glikoliz yoluyla laktik asit oluşumunun artması, $pH < 6,0$ 'ya kadar belirgin hücre dışı asidoza yol açar [26]. pHe duyarlı sistemler, hedeflenen bölgede ilaç etkinliğini artırmayı amaçlar. Kanseri tedavisinde birincil yöntem olarak kabul edilen kemoterapide ilaçların normal hücrelere zarar vermesi (yan etkiler) ve çoklu ilaç direnci (MDR) gibi büyük zorluklar bulunmaktadır [90] ki MDR, hücrelerin birden fazla yapısal benzerliği olmayan ve farklı moleküler hedeflere sahip ilaçlara karşı direnç geliştirdiği durumu tanımlar ve kanser tedavisindeki en büyük zorluklardan biridir [91].

Kanserli dokular, normal dokulara kıyasla fizyolojik olarak bazı farklılıklara sahiptir ve bu farklılıklar hedeflenmiş tedavi sistemleri geliştirme çabalarını desteklemiştir. Son on yıllarda, “geliştirilmiş geçirgenlik ve tutunma (EPR) etkisi” ve “uzun süre dolaşabilen nano-taşıyıcılar” kanser ilaç hedefleme stratejilerinde önemli roller oynamıştır [92]. Pasif doku hedeflemesi, tümör damar yapısının geçirgenliğinin artması ve etkisiz lenfatik drenaj (EPR etkisi) yoluyla nanopartiküllerin ekstrasvazasyonu ile elde edilir. Nanopartiküllerin yüzeyi, hücreye özgü tanıma ve bağlanmayı destekleyen ligandlarla modifiye edilerek aktif hücresel hedefleme sağlanabilir. Bu süreçte nanopartiküller; (i) içeriklerini hedef hücreye yakın bir bölgede serbest bırakabilir, (ii) hücre zarına tutunarak hücre dışı sürekli ilaç salımı sağlayan bir depo gibi davranabilir veya (iii) hücre içine alınıp doğrudan etki gösterebilir (Şekil 2.7).

Bu stratejilere dayalı olarak, “pasif hedefleme” tümör bölgelerinde seçici ilaç birikimini hedefler, ancak ilaç taşıyıcılarının tümör hücrelerine sadece taşınması, başarılı bir hedefleme anlamına gelmez. Tedavi etkinliği için ilaçların hedef hücrelerin sitoplazması, mitokondrisi veya çekirdeği gibi hücre içi bölgelere ulaştırılması gerekebilir. Ayrıca, damarın yakınında kalan bu taşıyıcılar, tümördeki taşıyıcıların ek birikimini sınırlandırabilir (yol tıkanma etkisi) [93].

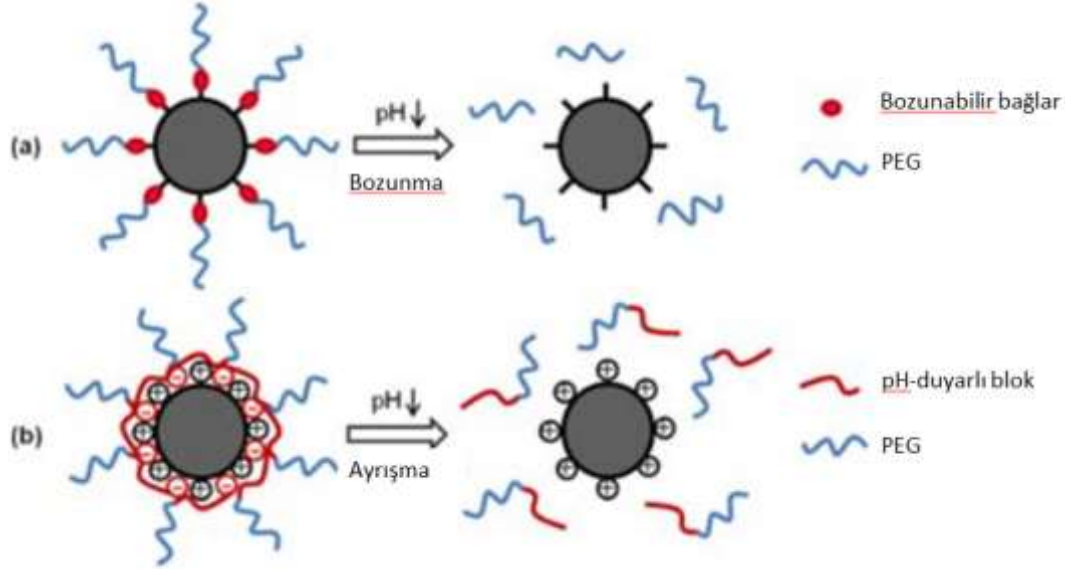


Şekil 2. 7 Pasif ve aktif tümör hedeflemesi [94]

Nanopartiküller kan dolaşımında yüzey özelliklerine bağlı olarak birkaç dakika içinde opsonize edilip dolaşımdan uzaklaştırılarak karaciğer, dalak gibi retiküloendotelyal organlarda tutulur. Yüzey özelliklerini iyileştirme amacı ile yapılan kaplama için en çok tercih edilen strateji, protein adsorpsiyonunu önleyen ve dolaşımdaki istenmeyen etkileşimleri azaltan PEG kullanımıdır. Ancak PEG, sterik bir engel görevi görebilir ve nanopartiküllerin hedef hücrelere girmesini engelleyebilir, hatta endositozdan sonra endozomal kaçışa neden olabilmektedir [95]. PEG'in nanopartikülden ayrılabilir olarak tasarlanması, dolaşım süresi tamamlandığında PEG'nin negatif etkilerini önlemek amacıyla yapılabilmektedir [96].

PEG ayrılması, genellikle bozunabilir kimyasal bağların kırılması ve iyonik etkileşimlerin çözülmesi şeklinde olmak üzere iki mekanizma ile sağlanabilir. PEG'nin ayrılabilirliği için yaygın olarak kullanılan pH-duyarlı kimyasal bağlar arasında hidrazon, asetal, maleik asit ve süksinat bağları bulunur [85]. Gao ve arkadaşları, hedeflenmiş bir PLGA-PEG nanopartikül model sistemine uygulanan disülfid bazlı FRET (Floresan Rezonans Enerji Transferi) taşıyan bir PEG molekülü sentezleyerek endositoz sırasında endozomal PEG atımını doğrudan gözlemlemişlerdir (Şekil 2.8) [97]. Gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmamızda

da ileride bahsedileceği üzere PEG, sisteme Schiff bazı ile adapte edilmiş olup asidik ortamda sistemden ayrılmakta ve bu tip bir sisteme örnek teşkil etmektedir.



Şekil 2. 8 pH duyarlı PEG ayrılma mekanizması [97]

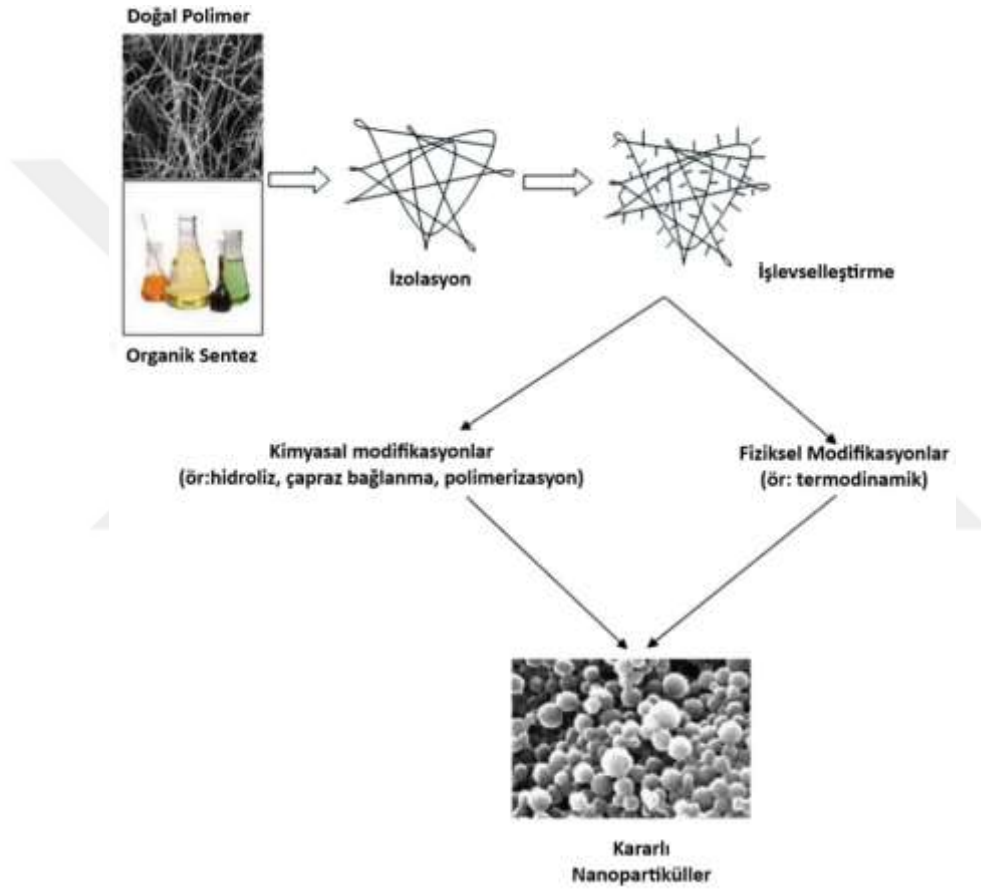
Endozomal pH'a bağlı salım mekanizması, özellikle ilaçların istenmeyen bölgelerde salımını önlemek için büyük önem taşır. Erken endozomal pH'a (pH 6,0) duyarlı birçok pH-duyarlı polimer, sitozolik yüksek dozlu ilaç salımı sağlamak amacıyla geliştirilmiştir [85]. Bae ve ekibi, pH 6,0'da optimize edilmiş, sitozolde yüksek doz DOX salımı yapan ve MDR durumuna karşı etkili olan polimerik miseller geliştirmiştir. Geliştirilen bu miseller, poli(His-co-Phe)-b-PEG ve PLLA-b-PEG karışımı olup, pH 6,0'da hızlandırılmış DOX salımı göstermiş ve folat reseptör aracılı endositoz ile birleştiğinde hem duyarlı hem de çoklu ilaç dirençli hücre hatlarını etkili bir şekilde öldürmüştür [98].

Çevresel pH değeri, özellikle hidrolitik bozunmayı hızlandırabilir. Asidik veya bazik ortamlar polimerin daha hızlı bozunmasına neden olabilir [59].

Bununla birlikte, bu polimerlerin mekanik, kimyasal ve termal özelliklerinin ekstraksiyon, sentez veya modifikasyon yöntemleri sırasında kolayca şekillendirilebilmesi ek bir avantajdır [36].

2.3 Biyobozunur Polimerlerin Fizikokimyasal Özelliklerinin Nano Boyutlu İlaç Dağıtım Sistemleri Üzerindeki Etkisi

Biyobozunur polimerler; proteinler, peptitler, makromoleküller, genler, hormonlar, görüntüleme ajanları ve diğer biyoaktif moleküller için potansiyel taşıyıcı olarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Bu kapsamda, nano boyutlu farklı partiküler taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Şekil 2.9’da böyle bir sistem geliştirilmesi için göz önünde bulundurulması gereken faktörler özetlenmiştir. Biyobozunur polimerler kullanılarak üretilen bu tip taşıyıcılar ile plazmadaki ilaç konsantrasyonunu sabit tutarak doz, doz sıklığı ve ilaçların yan etkileri azaltılabilmektedir [99].



Şekil 2. 9 Nano boyutlu ilaç dağıtımı için kullanılan polimerler [40]

Biyobozunur polimerlerin fizikokimyasal özellikleri, polimerik taşıyıcılarda terapötik bileşenin farmasötik ve farmakokinetik özelliklerini değiştirerek in vitro ve in vivo biyolojik aktivitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu özellikler arasında molekül ağırlığı, hidrofobik yapı, yüzey yükü, kristalinlik düzeyi, polimerin bileşimindeki farklılıklar, camsı geçiş sıcaklığı ve yüzey karakteristikleri gibi faktörler öne çıkmaktadır [40].

Molekül ağırlığı (Mw), bozunma davranışını etkileyen önemli bir faktördür ve dolayısı ile ilaç salım kinetiğini önemli ölçüde etkiler. Polimerin yüksek moleküler ağırlığı (HMw), daha uzun zincir uzunluğuna sahip monomerler/oligomerlerle ilişkilendirilir; bu durum, başlangıçtaki ani salım etkisini ve bozunma hızını azaltarak ilacın sürdürülebilir salımını sağlar. HMw polimerler, biyoyararlanımı ve ilaç yüklemesini artırabilmektedir. Ancak, salım sistemi boyutu ve enkapsülleme verimliliği (EE) üzerinde ters orantılı etki gösterebilmektedir [100]. Düşük moleküler ağırlığa sahip polimerler, daha küçük boyutlu parçacıklar ile birlikte kapsülleme verimliliğinde bir azalmaya yol açmaktadır [101]. Bununla birlikte, bu durum her polimer için geçerli değildir. Çok yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerlerin büyük parçacıklar oluşturması ve dolayısıyla emilimi azaltan gözenekli parçacıklar oluşturması nedeniyle olabildiği de öne sürülmektedir [102].

Polimerin hidrofobikliği, polimerik sistemin in vitro ve in vivo davranışını etkileyen en önemli ikinci özellik olup, organik faza ve su fazına karşı olan afinitesini temsil etmektedir. Hidrofobiklik, polimer zincirinin uzunluğunun ve polimeri oluşturan monomerlerin kimyasal yapısının bir göstergesidir [42] ve salım sisteminin emilim profilini ve bozunma kinetiğini büyük ölçüde belirlemektedir [103]. Bozunma kinetiği, ilaç salımının hızını ve süresini belirler; yani, bozunma daha yavaş ise, salım da daha uzun süreli olacaktır. Bu da hidrofobik bir polimerin daha yavaş bozunduğu sonucuna ortaya çıkarmaktadır [42].

Yüzey kaplama, polimerik taşıyıcı sistemin in vivo davranışını belirlemede kritik bir öneme sahiptir. Dağıtım sisteminin uygulanabilirliği, ilgili ilaç salım sisteminin yüzeyini belirli ligandlarla kaplama veya bağlanma yoluyla değiştirilerek modifiye edilebilir. Bu, ilaç dağıtım sisteminin karaciğer, kanserli hücreler gibi belirli patolojik alanlara hedeflenmesine yardımcı olur. Kaplama işlemi, ilaç dağıtım sistemlerinin etkinliğini artırmak için kullanılan bir stratejidir. Hem ilacın doğru hedefe yönlendirilmesini sağlar hem de vücutta daha uzun süre dolaşmasına yardımcı olur. Bu özellikler, tedavi etkinliğini artırırken yan etkileri azaltabilir. Hidrofobik polimerler kullanılarak hazırlanan geleneksel taşıyıcı sistemler, retikülo-endotelyal sistem (RES) tarafından kolayca tanınarak kandan hızla temizlenmektedir. Ayrıca, kandaki opsonin proteini bu yapılara bağlanarak

makrofajlar tarafından fagositoza uğramalarına yol açmaktadır. Tüm bu süreçler, hidrofobik parçacıkların sistemik dolaşımdan karaciğer ve dalak yoluyla uzaklaştırılmasına neden olarak, vücutta kalma sürelerini kısaltmaktadır. Yüzey modifikasyonu, mononükleer fagosit sistemi (MPS) tarafından ilgili salım sisteminin vücuttan atılmasını önlemenin en kolay yoludur. Hidrofobik parçacıkların yüzey özelliklerini değiştirmek amacıyla, aşılama (grafting), konjugasyon ve adsorpsiyon gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Kullanılan hidrofilik malzemeler, PEG, kitosan veya poli(etilenimin) gibi polimerler veya çeşitli yüzey aktif maddeler olabilir [102, 104, 105]. PEG, yüksek biyouyumluluğa sahip olmasından dolayı yüzey modifikasyonu için sıklıkla tercih edilen bir polimerdir ve non-iyonik ve hidrofilik özellikleri MPS tarafından tanınmasını engelleyerek dolaşım yarı ömrünü uzatmaktadır. MPS açısından zengin organların dışında bulunan kanserli hücelere terapötik ajanların hedeflenmesinde yüksek derecede önerilmektedir [106].

Parçacıkların yüzeyindeki hidrofilik kaplama, hedeflenen bölgelere ilaç yönlendirilmesi, kan dolaşımındaki yarı ömrünün uzatılması, sürdürülebilir ve kontrollü salım, biyoyararlanımın artırılması ve toksisitenin azaltılması gibi birden fazla işlevi yerine getirebilir. Bu etkiler, hidrofilik bileşenin karaciğer makrofajları tarafından tanınmaması sonucu azaltılmış alım ve polimerik dağıtım sisteminin karaciğer hücrelerinde düşük birikim sağlamasıyla ilişkilidir; böylece daha uzun dolaşım yarı ömrü ve azaltılmış toksisite elde edilmektedir. İyileştirilmiş biyoyararlanım, hidrofilik bileşiklerle (örneğin: galaktoz, PEG) kaplanmış parçacıkların bağırsaklardan daha etkin bir şekilde emilmesiyle bağlantılıdır. Tüm bu etkiler ayrıca, dağıtım sisteminin yüzey yük dağılımından da etkilenmektedir [40].

Polimerik bir taşıyıcı sistemin yüzey yükü, yüzey modifikasyonu için etkinliğini belirlemede önemli bir parametredir [107]. Birincil amin grupları ile kaplanmış nanopartiküller, sülfat, hidroksil veya karboksil gruplarıyla kaplanmış nanopartiküllere göre daha yüksek fagositik alım göstermektedir. Pozitif yüklü nanopartiküller, zıt yüklü hücre zarı ile etkileşim kurarak, hücre içselleştirme hızını artırmakta ve nihayetinde ilacın farmakokinetik profilini iyileştirmektedir [108]. Günümüzde, esas olarak RES'in (karaciğer, dalak, akciğerler vb.) makrofajlarına saldıran birçok hücresel hastalık yaygındır. Nanopartiküllerin,

asidik endolizozom bölmesine endositoz yoluyla hızlı alımı sonucu aktif bileşenin bozulmasına neden olan erken ilaç salımı dikkate alındığında, yüzey yükü, ilaç yüklü nanopartiküllerin sitozole hedeflenmesinde kritik bir rol oynayabilmekte ve endolizozomlardan hızlı bir şekilde kaçış sağlamaktadır [109].

Polimer bileşimi, malzemenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemede kritik bir rol oynamaktadır. Bileşimin içeriği, polimerin mekanik dayanıklılığını, hidrofobikliğini, bozunma hızını ve biyouyumluluğunu etkileyebilir. Örneğin, laktid ve glikolid oranları, PLGA kopolimerinin özelliklerini doğrudan etkileyerek, salım profili ve biyolojik etkinliği üzerinde önemli değişikliklere yol açabilir. Düşük glikolid içeriği, nanopartiküllerin hidrofobikliğini artırarak, suya karşı dirençlerini artırabilir ve bu da ilaç salım profilini değiştirebilir [110].

Camsı geçiş sıcaklığı (Tg), bir polimerin camsı (katı, sert) halden amorf (esnek, düzensiz) hale geçmeye başladığı sıcaklık ya da sıcaklık aralığıdır. Bu geçiş, polimerin fiziksel özelliklerini değiştirir. Tg, polimerin yapısal özelliklerine ve stereokimyasına (moleküler düzen ve konfigürasyon) bağlıdır. Esnek zincirler, daha kolay hareket edebildikleri için daha düşük Tg değerine sahip olurken, sert zincirler daha zor hareket ettikleri için daha yüksek Tg değerine sahip olurlar. Tg, amorf polimerlerin işlenmesi için minimum sıcaklığı da belirtir [40, 111].

Tg değeri bir polimerin biyolojik etkinliği ve ilaç salım profili gibi birçok özelliğine etki edebilir. Örneğin, PLGA'nın Tg değeri fizyolojik sıcaklık olan 37 °C'den daha yüksek olduğundan bu sıcaklıkta camsı yapıda olduğu kabul edilir. Bu da, PLGA kullanılarak elde edilen dağıtım sistemlerinin özellikle bozunma davranışını etkilemektedir. Tg, polimerin moleküler ağırlığına ve bileşimine bağlıdır [64]. Düşük moleküler ağırlığa sahip hidrofobik polimerler, daha hızlı hidrate olarak polimer zincir segmentlerinin hareketini artırarak bozunmaya yol açar [42]. Benzer şekilde, PLGA'nın laktid içeriği ve moleküler ağırlığındaki azalma ya da PLGA ko-polimerindeki yüksek glikolid içeriği nedeniyle Tg'sinin düşmesine neden olmaktadır [40].

Polimerin kristalin yapısı, dağıtım sisteminin enkapsülasyon etkinliğini (EE) ve bozunma davranışını büyük oranda etkileyen bir faktördür. Yüksek derecede kristalin bir polimer kullanıldığında, dağıtım sisteminin EE'si önemli ölçüde azalır; çünkü terapötik bileşen esasen polimerin amorf bölgesinde hapsolürken,

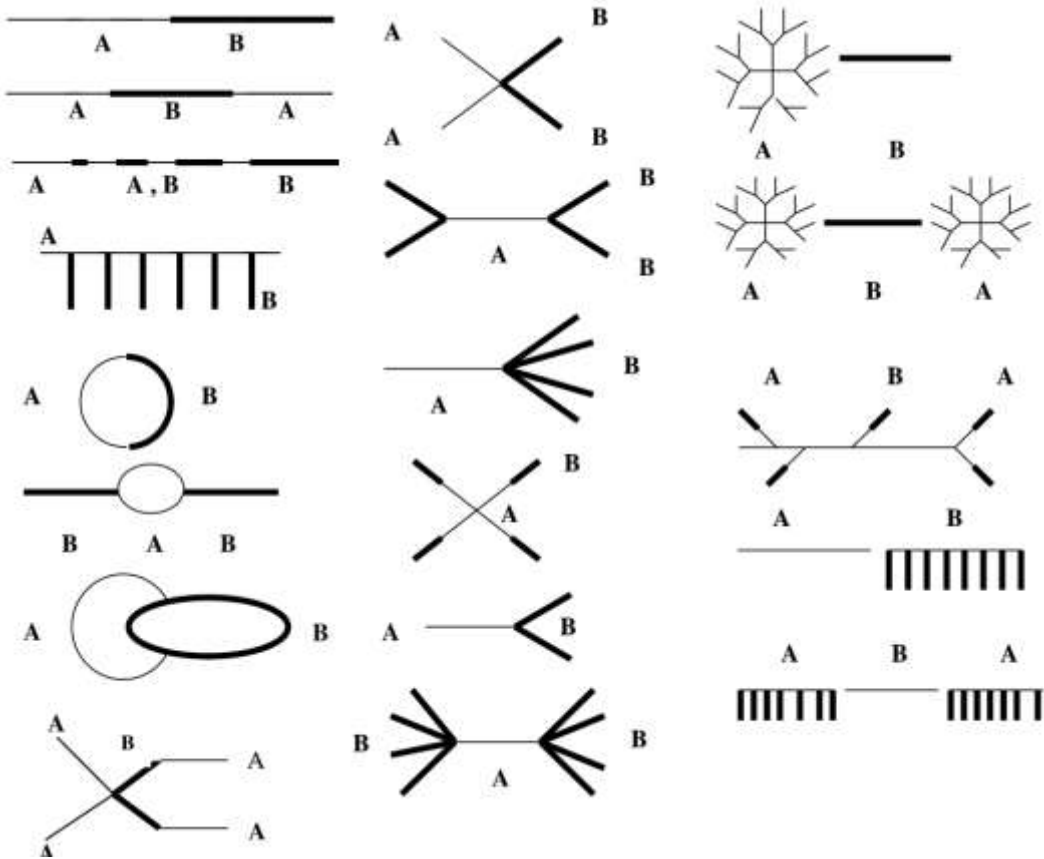
kristalin yapı ilacın girişini engelleyen bir bariyer özelliğine sahip olduğundan suya geçirgen değildir. Bir maddenin kristalinlik derecesi, DSC ve XRD gibi tekniklerle ölçülebilir. Bu yöntemler, maddenin ne kadar düzenli bir kristal yapıya sahip olduğunu belirler. İlaç dağıtım sistemlerinin bozunma hızı, kristalinlik derecesiyle ilişkilidir. Yüksek kristalinlik, polimerin daha düzenli bir yapıya sahip olduğu anlamına gelir ve bu da bozunma sürecini yavaşlatır. Polimerin daha az düzenli (amorf) olması, moleküllerin daha serbest hareket etmesine olanak tanır. Bu durumda, polimer daha hızlı bozunur ve ilaç salımı daha hızlı gerçekleşir. Kristalin yapıya sahip polimerler, daha yavaş bozunur ve dolayısıyla ilaç salımı da daha yavaş olur. Polimerin moleküler ağırlığı, kristalinlik derecesini etkiler. Genellikle daha yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerler daha kristalin yapıda olabilir. Genellikle düşük moleküler ağırlığa sahip polimerler en yüksek kristallik derecesine sahipken, yüksek moleküler ağırlığa sahip polimerler (HMw) düşük kristalinlik göstermektedir. HMw polimerde amorf fazın geniş bir alanı bulunması nedeniyle, EE daha iyi olur ve salım daha hızlı gerçekleşir. Düşük ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (LMw) polimerde ise kristalinlik çok yüksek olduğundan ilacı enkapsülasyon yeteneği azalır. Bu durum, optimum enkapsülasyon sağlamak için her iki faktör arasında uygun bir dengenin korunması gerektiğini göstermektedir [112].

2.4 Blok Kopolimer Miseller

Blok kopolimerler, iki veya daha fazla polimerik bloktan oluşan ve farklı monomer birimlerinin lineer, graft veya dairesel yapılar şeklinde birleşmesiyle meydana gelen polimerlerdir. Bu kopolimerlere yönelik artan ilginin temel nedeni, çözelti içerisinde kendiliğinden organize olarak supramoleküler yapı oluşturmalarıdır. Blok kopolimerlerin bu kendiliğinden birleşme davranışı, farklı, hatta zıt özellikler sergileyen kısımlara sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Blok kopolimerler, segmentlerinden biri çözücü, diğeri ise çöktürücü özellik gösteren bir ortamda çözüldüğünde, tersinir bir şekilde bir araya gelirler. Oluşan misel, çözünmeyen blokların meydana getirdiği bir “çekirdek” ve çözünen blokların meydana getirdiği bir “kabuk” yapısına sahiptir. Genellikle küresel yapıda olan miseller, çözelti veya polimer özelliklerindeki değişikliklere bağlı olarak farklı şekiller alabilmektedir. Blok kopolimer miseller, ilaç veya gen

taşıyıcı olarak kullanıldığında, oluşan yapının çok sayıda parametreye bağlı olarak değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, çalışma amacına uygun olarak öncelikle hangi tür kopolimerin (lineer, graft, dairesel, vb.) tercih edileceğine karar verilmesi, sentez için yöntem belirlenmesi ve ardından kopolimerin çözelti içindeki davranışlarının (misel oluşumu, misel boyutu, dağılımı, şekli, yükü gibi) detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

Blok kopolimerler anyonik, katyonik, hidrofobik ve noniyonik hidrofilik olmak üzere dört farklı temel özellikteki polimerik bloklar kullanılarak oluşturulabilmektedir. Bu polimerik blokların farklı şekillerde ve farklı bileşimlerle birbirlerine bağlanması sağlanarak iki veya daha fazla bloğa sahip blok kopolimerler sentezlenebilmektedir [113]. Şekil 2.10'da A ve B bloklarına sahip olan farklı mimarideki blok kopolimerler gösterilmektedir.



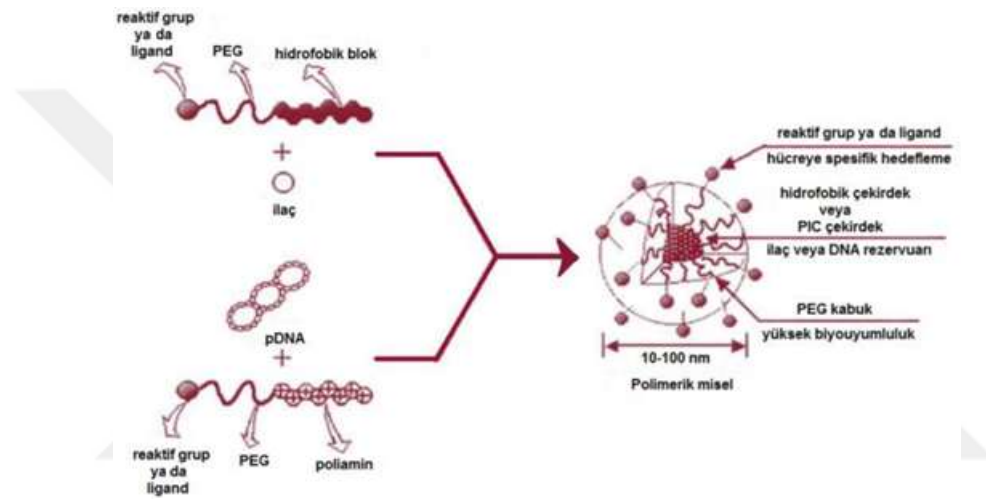
Şekil 2. 10 Farklı mimarilere sahip blok kopolimerler

2.4.1 Blok Kopolimerler ile Misel Oluşumu ve Özellikleri

Blok kopolimerlerden ilaç veya gen taşıma amacıyla kullanılacak bir taşıyıcı misel sistemi elde edebilmek için, taşınacak olan kargo molekülüne uygun şekilde

tasarlanması gerekmektedir. Dolayısı ile, blok kopolimer miseller, taşımış olduğu kargo molekül ile çekirdeği arasındaki etkileşim türüne bağlı olarak çapraz bağlı miseller, hidrofobik etkileşim ile oluşan miseller, hidrojen bağı ile oluşan miseller, metal koordinasyon bağı ile ve elektrostatik etkileşim ile oluşan miseller olarak sınıflandırabilir:

Her misel tipi, taşıyacak olduğu kargo molekülleri açısından farklılık gösterirken, misel oluşum mekanizmaları da birbirinden farklıdır. Farklı yapıdaki blok kopolimerlerin ilaç veya gen taşıma işleviyle misel oluşturma süreçleri, Şekil 2.11’de şematik olarak gösterilmiştir [114].



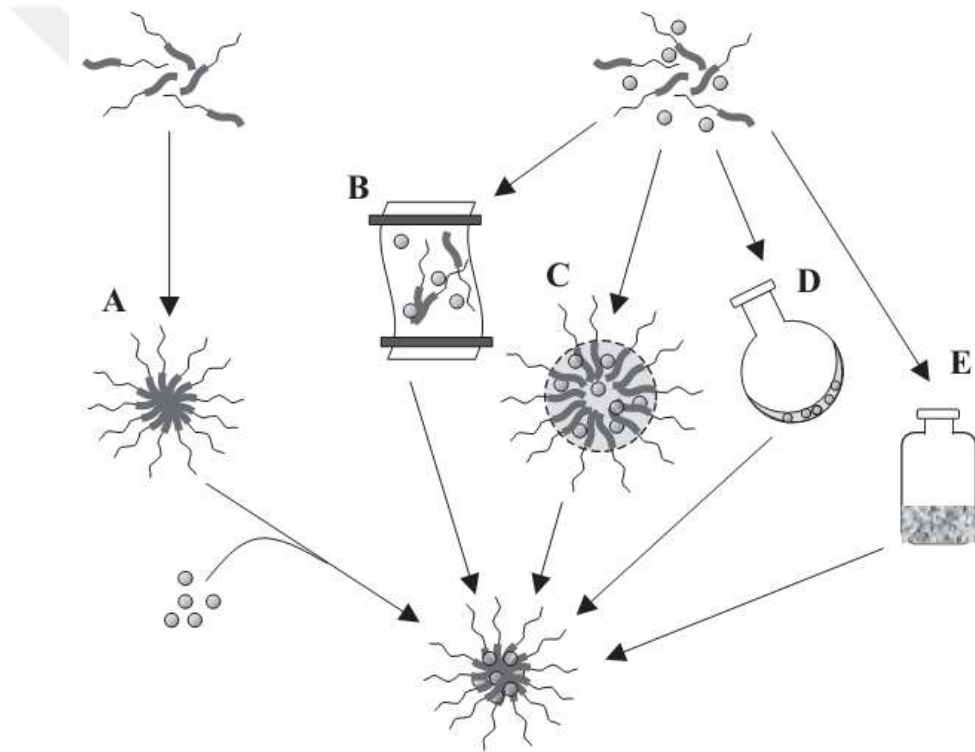
Şekil 2. 11 İlaç ve gen taşıyıcı olarak blok kopolimer misel oluşumu [114]

Hidrofobik etkileşimler sonucu bir araya gelen blok kopolimer miseller, en bilinen polimerik misel yapılarıdır. Bu miseller, amfilik yani hidrofilik ve hidrofobik bloklardan oluşan blok kopolimerlerden oluşur ve genel olarak hidrofobik yapıdaki moleküllerin taşımada kullanılır. Hidrofobik bloklar suda çözünmez ve bir araya gelerek misel çekirdeğini oluştururlar. Hidrofilik bloklar ise dış kabuğu meydana getirirler ve miselin su içinde çözünmesini sağlarlar. Misel oluşumu, kritik misel konsantrasyonunun (cmc) üzerinde gerçekleşir. Oluşan miseller ile misel yapısına dahil olmayan polimerler (unimerler) arasında bir denge mevcuttur. Misel karakterizasyonundaki kriterler şunlardır [113]:

- cmc ve kritik misel sıcaklığı,
- Misel morfolojisi,
- Miseller ile unimerler arasındaki denge,
- Misel molekül ağırlığı,

- Misel agregasyon sayısı veya yapıdaki polimer zincirinin sayısı,
- Misel boyutu,
- Misel çekirdek boyutu,
- Misel kabuk kalınlığı.

İlaç molekülleri miselin çekirdeğine yüklenebildiği gibi kabuğuna da yüklenebilmektedir. Ancak, kabuğa ilaç yüklemek bazı dezavantajları beraberinde getirmektedir. İlk olarak, kabuğa yüklenen ilaç misellerin birbirleriyle etkileşerek agregasyonuna neden olabilir. İkinci olarak, miselin vücut içindeki biyomoleküllerle etkileşime girerek hedef dokuya ulaşmasını engelleme riski vardır [113].



Şekil 2. 12 Yaygın olarak kullanılan ilaç yüklü polimerik misel üretim prosedürleri [115]

Yaygın olarak kullanılan ve hidrofobik etkileşimlerle elde edilen ilaç yüklü blok kopolimer misellerin eldesi için kullanılan yöntemler Şekil 2.12’de görülebilir. İlaç yükleme işlemi, temel olarak iki farklı yöntemle gerçekleştirilir [115]. Birinci yöntemde, suda çözünebilir kopolimer, ilaç molekülleriyle birlikte suda çözülerek ilaç yüklü misel oluşumu sağlanır (Şekil 2.12A). İkinci yöntem ise suda çözünmeyen kopolimerler ve ilaç molekülleri organik çözücü içinde çözülmesi

sağlanır. Ardından organik çözücü uzaklaştırılır ve ilaç yüklü misellerin su içinde oluşması sağlanır. Diyaliz yöntemi (Şekil 2.12B), yağ-su emülsiyonu yöntemi (Şekil 2.12C), organik çözücünün buharlaştırılarak uzaklaştırılması ve film haline getirilmiş polimer ile ilacın su içinde çözülerek (Şekil 2.12D), ya da liyofilizasyonla (Şekil 2.12E) ilaç yüklü miseller elde edilebilmektedir.

Blok kopolimer misellerin ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmasının başlıca avantajları, 10-100 nm çap aralığında olmaları, yüksek yapısal kararlılık, suda çözünür olabilmeleri, düşük toksisite ve çeşitli fonksiyonel yapılar barındırabilmeleridir. [114]. Bu avantajlar, diğer tür etkileşimlerle oluşan blok kopolimer miseller için de geçerli olabilmektedir. Blok kopolimer misellerinin 10-100 nm çapında olması, pasif hedefleme amacıyla kullanılmalarına olanak tanır. Ayrıca, misellerin boyutu, blok kopolimerlerin blok uzunluklarına ve molekül ağırlığına bağlı olarak ayarlanabilir [116]. Bununla birlikte, bazı durumlarda bimodal boyut dağılımı gözlenebilir, bu durum genellikle ikincil agregasyonlar, yani misellerin birbirleriyle bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkar. Eğer kan dolaşımında büyük misel agregatları, seyreltilmiş ortamda küçük misellere ayrışıyorsa bu durum sorun yaratmaz. Ancak agregatlar ayrılmıyorsa, vücutta oluşturdukları etkiler tek başına misellere göre oldukça farklı olabilir ve bu durum potansiyel istenmeyen etkilere yol açabilir.

Blok kopolimer misellerin ilaç taşıyıcı olarak sağladığı bir diğer avantaj, statik ve dinamik yapısal kararlılığa sahip olmalarıdır [114]. Blok kopolimer misellerinin statik kararlılığı, kritik misel konsantrasyonlarıyla belirlenir ve yüzey aktif maddeler tarafından oluşturulan misellere kıyasla daha düşüktür. Bu da misellerin kan dolaşımında çok düşük konsantrasyonlarda olsa bile yapılarının bozulmadan kalmasını sağlar. Dinamik kararlılık ise düşük dissosiyasyon hızlarıyla ilişkilidir. Misel çekirdeğindeki hidrofobik bloğun büyüklüğü arttıkça miselin kararlılığı da artar. Üstelik bloğun fiziksel durumu, miselin kararlılığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Eğer çekirdeği oluşturan bloğun Tg değeri 37 °C'den yüksek ise, "donmuş" bir çekirdek yapısı oluşur ve bu da miselin kararlılığını önemli ölçüde artırır. Tg değerinin altındaki sıcaklıklarda kristal yapıda bulunan polimerler, misel çekirdeğinde daha sıkı bir düzen oluşturarak kararlılığı artırır. Ayrıca, misel çekirdeğine hidrofobik ilaçların yüklenmesi de miselin kararlılığını artıran önemli bir faktördür [116].

Hidrofobik bir ilacın, suda çözünür bir polimere bağlanarak yani konjüge edilerek taşınması durumunda, oluşan yapı suda çözünmeyebilir. Bu durum, ilacın biyoyararlanabilirliğini (vücuttaki etkin kullanılabilirlik düzeyi) ve etkinliğini azaltabilir. Blok kopolimer misellerde, hidrofilik kabuk suda çözünürlük sağlayarak miselin stabil kalmasına yardımcı olurken, hidrofobik ilaçların çekirdekte taşınması ve böylelikle sudan izole hale getirilmiş olması önemli bir avantaj sağlar. Bu yapı, hidrofobik ilaçların sulu ortamda kararlı bir şekilde taşınmasını sağlayarak biyoyararlanabilirliği artırır. Böylece, ilaçların etkinliği ve vücutta kullanımı iyileştirilmiş olur. Özetle, miseller, hidrofobik ilaçları sudan ayrı tutarken çevrelerinde suda çözünen bir kabuk oluşturarak bu ilaçların biyoyararlanabilirlik sorunlarını aşmalarına yardımcı olur [117, 118].

Blok kopolimer miseller toksisite, biyouyumluluk ve biyolojik süreçlerdeki davranışları açısından değerlendirildiğinde, blok kopolimer misellerin, yüzey aktif misellere kıyasla daha az toksik olduğu görülmektedir. Özellikle PEG kaplı miseller, vücutla uyumlu bir yapı sunarak biyouyumluluğu artırır. Ayrıca bu misellerin molekül ağırlığının uygun şekilde seçilmesiyle, miseller unimerlerine yani tekil polimer zincirlerine ayrıldığında, bu unimerler böbrekler aracılığıyla kolayca vücuttan atılabilmektedir. Bu özellik, biyolojik güvenlik açısından önemlidir. Blok kopolimer misellerin dolaşım süresinin uzun olması, ilaç veya gen taşıma gibi görevlerde kargo moleküllerini hedeflenen dokuya ulaştırmalarına olanak tanır. Miseller hedeflerine ulaştıktan sonra unimerlerine ayrılarak, bu unimerler vücuttan kolayca uzaklaştırılabilir. Sonuç olarak, blok kopolimer misellerin düşük toksisite, yüksek biyouyumluluk, uzun dolaşım süresi ve böbrekten atılabilirlik gibi özellikler ilaç ve gen taşıma uygulamalarında bu tip miselleri neden ideal bir sistem haline getirdiğini göstermektedir [114, 115].

Blok kopolimerlerden elde edilen misellerin en büyük avantajı, her bir bloğun bağımsız bir şekilde modifiye edilebilmesidir. Gerekli özellikler, bu bloklara dağıtılarak ilaç taşınmasına uygun yapı elde edilebilir.

Blok kopolimer misellerin en önemli avantajlarından biri de, ilaç hedefleme ve kontrollü salım sağlamalarıdır. Bu, ilacın doğrudan hedef dokuya ulaşmasını ve istenen dozda salınmasını mümkün kılar. Misellerin genellikle 200 nm'den küçük boyutlarda olması, EPR etkisinden yararlanarak pasif hedefleme sağlamalarına olanak tanır. Bu etki, özellikle tümör gibi anormal damar yapısına sahip

dokularda, misellerin hedef dokuya birikmesini kolaylaştırır. Misellerin dış kabuğunda hidrofilik bir blok (örneğin, PEG) kullanıldığında, kan proteinleri ve hedef dışı hücrelerle etkileşim minimum seviyeye indirilir. Bu, misellerin kan dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlayarak hedefleme ve taşıma etkinliğini artırır.

Misel çekirdeğindeki ilaçların salım hızı, hem ilacın kimyasal özelliklerine (difüzyon ve partiyon katsayısı) hem de polimer çekirdeğinin fiziksel özelliklerine (viskozite ve hidrofobluk) bağlı olarak değişir. Bu faktörler, ilacın kontrollü salımı için tasarım yapılırken dikkate alınır [114]. Taşıyıcı blok kopolimer misel sistemi ilacı hedef dokuya ulaştırma ve kontrollü ilaç salımı açısından optimize edilebilmelidir. İlaç moleküllerinin hedefe ulaşmadan önce salınması, etkinliğini azaltabilir ve yan etkilere yol açabilir. Bu nedenle, misellerin ilaçları güvenli taşıması ve yalnızca hedef dokuya ulaştığında serbest bırakması önemlidir. İlaç taşımada başarılı bir sonuç elde etmek için, doğru özelliklere sahip miseller tasarlanmalıdır. Miselin yapısı, ilacın stabil bir şekilde taşınmasını ve kontrollü bir şekilde salınmasını sağlayacak şekilde optimize edilmelidir. "Stimuli-responsive" (etkiye duyarlı) polimerlerin blok kopolimer yapısına eklenmesiyle, çevresel faktörlere (pH, sıcaklık, enzimler gibi) duyarlı miseller tasarlanabilmekte ve hedef dokunun özel koşullarında (örneğin, tümör dokusundaki düşük pH veya yüksek sıcaklık gibi) ilaç salımı yapabilmektedir.

Hidrofobik ilaçlar, özellikle kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılanlar, doğrudan kan dolaşımına verilemez. Bunun nedeni, düşük çözünürlüklerinin biyoyararlanabilirliklerini sınırlaması ve toksisite gibi yan etkilere yol açabilmesidir. Blok kopolimer miseller, hidrofobik ilaçlar için bir çözüm sunar. Misellerin çekirdeği hidrofobik bir mikroçevre oluşturur ve bu ortam, hidrofobik ilaçların stabilize edilmesini ve çözünür hale gelmesini sağlar. Bu, ilaçların daha etkili bir şekilde taşınmasına ve kullanılmasına olanak tanır. Bu miseller, farmasötik uygulamalarda özellikle bu amaçla kullanılmaya başlanmıştır [114, 115, 119].

Miselin çekirdeği ile ilaç arasındaki etkileşim, ilacın salım kinetiğini, kapsülasyon verimini ve misel kararlılığını doğrudan etkiler [115].

2.4.2 Blok Kopolimer Misellerin Nitelikleri ve Karakterizasyonu

Kritik Misel Konsantrasyonu (cmc): Yüzey aktif maddelerin (amfifilik moleküllerin) veya blok kopolimerlerin belirli bir çözücünde misel oluşturmaya başladığı minimum konsantrasyonu ifade eder.

Taşıyıcı misel, kana verildiğinde, misel konsantrasyonu önemli ölçüde düşmektedir. Miselin hedef dokuya ulaşabilmesi için, düşük konsantrasyonlarda dahi kararlı kalması gerekmektedir ve bu da blok kopolimer misellerinin genel özelliklerinden biridir.

Cmc, misellerin termodinamik kararlılığının bir ölçüsüdür. Hidrofobik-hidrofilik blok oranı, hidrofobik bloğun T değeri ve yüklenmiş ilaç miktarı cmc değerini etkilemektedir [116]. Blok kopolimerin hidrofobik bloğu uzadıkça, miselin çekirdeği daha kararlı hale gelir, moleküllerin misel oluşturmaya olan eğilimini artırır ve cmc değerinin düşmesine neden olur. Daha düşük cmc değeri, misellerin daha az miktarda kopolimerle dahi oluşabileceği anlamına gelir. Blok kopolimerin hidrofilik bloğu uzadıkça, miselin dış kabuğundaki hidrofilik bölge genişler, cmc değerini artırır, çünkü daha fazla molekül, misel oluşturmak yerine çözücünde kalmayı tercih eder [120]. Hidrofobik blok, T_g değerinin altındaki sıcaklıklarda kristalin bir yapı kazanır ve daha sıkı bir şekilde organize olur. Bu sıkı yerleşim, misel çekirdeğinin kararlılığını artırır ve cmc değerini daha da düşürür. Misel çekirdeğine hidrofobik ilaç yüklenmesi, çekirdekteki hidrofobik etkileşimleri ve miselin kararlılığını artırır, cmc değerini düşürerek misellerin daha düşük konsantrasyonlarda bile oluşabilmesini sağlar.

cmc değerinin belirlenmesi için en yaygın olarak kullanılan yöntem, floresans spektrofotometrisidir ve misel çekirdeği ve su ortamında farklı floresans özellikleri gösteren bir molekül kullanılarak cmc ölçülür. Ayrıca dinamik ışık saçılması (DLS) [121], yüzey gerilimi ölçümleri ve iletkenlik ölçümleriyle de cmc değeri tayin edilebilmektedir [122].

Morfoloji: Blok kopolimer miseller küresel, çubuk, vesikül gibi birçok farklı şekilde üretilmektedir. Kopolimer bileşimi ve konsantrasyonu, organik çözücü miktarı, pH ve iyonik şiddet gibi faktörler değiştirilerek misel şekli kontrol edilebilmektedir:

Boyut: Misel boyutu, misel sisteminin kargo molekülü taşıma etkinliğini doğrudan etkiler. Genel olarak, 20-100 nm boyut aralığındaki miseller, en iyi etkinliği göstermektedir. Daha küçük miseller böbrekten atılabilmekte, daha büyük olanların ise makrofajlarca tutulabilmektedir [123]. Misellerin boyutu, her iki bloğu oluşturan polimerlerin uzunluğuna bağlı olarak değiştirilebilmektedir. Taşınacak olan kargo molekülün (örneğin genetik materyal) boyutu ve şekli de miselin boyutu üzerinde etki göstermektedir [124].

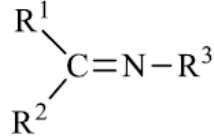
Blok kopolimer miseller, ikincil agregasyonlardan kaynaklı bimodal boyut dağılımı göstermektedirler [116] ve misel çekirdeklerinin hidrofobik olarak birbirleri ile etkileşmesi sonucu bir araya gelmesi ile bu durum gerçekleşebilir. Bu oluşum sistemin etkinliğini olumsuz yönde etkileyebileceğinden istenmeyen bir durumdur ve bu durumun önlenmesi amacıyla, misel kabuğu PEG gibi bir iyonik olmayan hidrofilik blokla kaplanabilmektedir.

Blok kopolimer misellerin boyutu, dinamik ışık saçılması (DLS), taramalı elektron mikroskobu (TEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), boyut eleme kromatografisi (GPC) ve viskozimetri yöntemleri kullanılarak belirlenebilmektedir [113]. Boyut dağılımı ise dinamik ışık saçılması yöntemiyle saptanabilmektedir.

2.5 Schiff Bazı ve Poliazometinler

Schiff bazı bileşikler (Şekil 2.13), kararlı ve kolay sentezlenebilir olmalarıyla dikkat çeken bileşiklerdir. Kimyanın pek çok alanında, endüstride, tıp ve eczacılıkta geniş kullanım alanlarına sahip olmaları, bu bileşiklere olan ilgiyi artırmış ve farklı disiplinlerde yaygın bir şekilde kullanılmalarını sağlamıştır [125]. Schiff bazları, ilk olarak 1864 yılında Nobel ödüllü Alman kimyager Hugo Schiff tarafından sentezlenmiştir. Bu bileşikler, aldehit veya ketonların aminlerle gerçekleştirdiği nükleofilik katılma tepkimesi sonucunda oluşur (Şekil 2.14) ve karakteristik olarak karbon-azot çift bağı ($-\text{CH}=\text{N}-$) içerirler [126]. Aminlerin aldehit ile reaksiyonu sonucu oluşan bağ "azometin" ya da "aldimin" olarak adlandırılırken, keton ile reaksiyonu sonucu "imin" veya "ketimin" adı verilir. Kararlı yapıları ve kolay sentezlenebilir olmaları nedeniyle Schiff bazları (iminler), ilgi duyulan bileşikler arasına girmiştir. Bu bileşiklere duyulan ilgi, birçok biyolojik sistemde, kimyasal kataliz süreçlerinde, tıp ve eczacılık

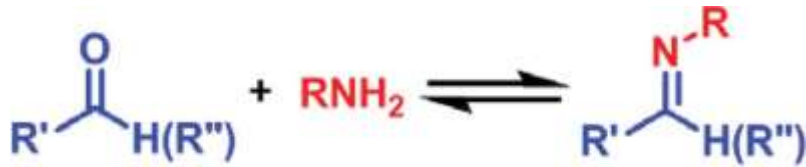
alanlarında, kimyasal analizlerde ve yeni teknolojilerdeki kullanım olanaklarıyla açıklanabilir [125]. Azometin bağı (C=N), antifungal, antibakteriyel, antimalaryal, antienflamatuvar, antiviral, antioksidan, pestisit ve deneysel tümör hücrelerine karşı in vitro inhibitör etki de dahil olmak üzere farklı biyolojik özelliklere sahiptir [127].



$R^1, R^2, R^3 =$ alkil ya da aril

Şekil 2. 13 Schiff bazlarının genel gösterimi [125]

Schiff bazı oluşumu reaksiyonunda, eğer aldehit veya keton alifatik karbonil bileşikleri ise, yan ürün olan suyun sürekli olarak uzaklaştırılması gerekmektedir, çünkü termodinamik denge ters yönde eğilim gösterir. Aksine, reaktanlar aromatik karbonil bileşikleri olduğunda, termodinamik denge ileri reaksiyon yönünde eğilim gösterir. Bu durumlarda, yalnızca iki reaktanın karıştırılması ve karıştırılarak çalkalanması kolay bir reaksiyon meydana getirir ve hedef ürün çok yüksek verimle elde edilebilir. Ayrıca, bir aldehit karbonil grubu, bir keton karbonil grubuna göre çok daha yüksek bir aktiviteye sahiptir [9].



Şekil 2. 14 Schiff bazı reaksiyonu

Schiff baz reaksiyonları, kimya alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ilıman reaksiyon koşulları ve yüksek reaksiyon hızları gibi birçok avantajı ile çeşitli fonksiyonel grupların korunmasında ve bir dizi organik ligandın sentezinde kullanılmıştır. Polimer kimyasında, pH değerindeki değişikliklere hassas tepkileri nedeniyle, polimer zincirlerinde potansiyel pH-duyarlı bağlayıcılar olarak hizmet edebilirler. Bazı özel tasarımlarla, Schiff baz yapısı diğer tersinir kovalent bağlar veya supramoleküler etkileşimlerle iş birliği yaparak çeşitli işlevler ve uygulamalar sağlayan yapılar (assemblies) veya jeller oluşturabilir [9].

Sulu çözeltide, pH değeri, Schiff bazının reaktivitesini önemli ölçüde etkiler. Genel olarak, yüksek asidite Schiff bazını yok eder. Schiff bazı, alkali çözeltide ise nispeten kararlı hale gelir. Bu özellikleriyle Schiff bazı yapısı, polimer kimyasında iyi bir etkiye duyarlı bağlayıcı olarak kullanılabilir. Basit primer aminler, hidroksi ile süstitüe edilmiş hidroksilaminler ve hidrazitler, yaygın olarak kullanılan amin grubu içeren reaktanlardır. Primer amin ile bir aldehit grubu arasında oluşan imin daha az kararlıdır. Sulu çözeltide pH değeri 6,5'in altına düştüğünde, bu imin yapısının tamamen parçalandığı kabul edilir. Bu geri dönüşüm özelliği, biyolojik sistemlerde kullanım için uygundur. Ancak, diğer aminlerle oluşan imin C=N çift bağları daha kararlıdır. Bu C=N bağları yalnızca pH değeri 3'ün altına düştüğünde bozulur. Yüksek kararlılığın gerekli olduğu sistemlerde, hidroksi ile süstitüe edilmiş hidroksilaminler ve hidrazitler tercih edilen aminlerdir.

İmin bağının pH değerine olan duyarlılığı, bu yapının en önemli etkiye duyarlı özelliğidir. Buna ek olarak, imin grubunun daha karmaşık bir yapı haline getirilmesiyle bu bağlayıcı grubun etkiye olan duyarlılığı da genişletilebilmektedir. pH değerine olan duyarlılık, etkiye duyarlı malzemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır [9].

Bağlayıcı kimyası, geniş bir uygulama yelpazesinde kullanılmaktadır. "click kimyası" [128] gibi diğer bağlayıcılara kıyasla, Schiff bazı reaksiyonu çok daha geri dönüşümlüdür ve hatta ılıman koşullarda bile gerçekleşebilir.

Schiff baz reaksiyonu, dinamik kovalent reaksiyonlar olarak adlandırılan reaksiyon ailesine aittir. Geleneksel bağlayıcılara kıyasla, Schiff bazının yapısı, pH değeri değiştiğinde olağanüstü bir tersinirlik sunarak kovalent bağların kontrol edilmesi için etkili bir yol sağlar ve supramoleküler sistemlerin ayarlanmasına benzer bir etki gösterir, bu da onu birçok alanda kullanışlı hale getirir.

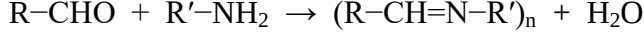
Ancak, polimer ana zincirinde bağlayıcı tasarlanmanın kendine özgü zayıflıkları vardır. Fiziksel veya kimyasal uyarılar, ne tür olursa olsun, bağlayıcı ile kolayca etkileşime giremezler. Bu tür zayıflıkları önlemek için, polimerin en az bir bloğunun reaktifin geçişine elverişli olması gereklidir. Neyse ki, Schiff bazının bağlayıcı olarak kullanıldığı çoğu blok kopolimerler amfifiliktir; çözeltideki hidrofilik blok, H^+ ve OH^- reaktiflerinin kolayca geçişine olanak sağlar [9, 129].

Polimerler, kovalent bağlarla birbirine bağlanan tekrarlayan monomerik birimlerden oluşan yüksek moleküler ağırlıklı moleküller olarak tanımlanır [130]. Konjuge polimerler olarak bilinen Schiff baz polimerleri poli(imin)ler, aynı zamanda poli(azometin)ler (PAM) olarak da adlandırılırlar [131]. Farklı diaminler ve dialdehitlerden türetilerek elde edilebilmektedir [132]. Yapılarında bulunan azot atomu, bu polimerlerin çevresel açıdan kararlı olmasını sağlamaktadır [133]. Birçok ligand arasında, poli(azometin) polimerler, konjuge iskelet yapısı, iyi termal kararlılık, imin bölgeleri, metal şelatları oluşturma yeteneği ve mekanik dayanıklılık gibi çeşitli özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir [130]. Ayrıca, doğrusal olmayan optik özellikler, yarı iletken özellikler ve lif oluşturma özellikleri gibi önemli avantajları da beraberinde getirmektedir [134]. Zaman içinde birçok araştırma grubu poli(azometin)ler üzerine çalışmalar yapmıştır ve bu tür materyallere olan ilgi, onların ısı, iletkenlik, lif oluşturma, sıvı kristal ve doğrusal olmayan optik gibi kimyasal yapılarından kaynaklanan özelliklerinden dolayıdır [135].

Öte yandan, poliazometinler çoğu yaygın organik çözücünde düşük çözünürlük ve yüksek erime noktası gibi zorluklara sahiptir. Bu da çeşitli alanlardaki pratik uygulamalarını kısıtlamaktadır. Bu sorunu çözmek için, poliazometin yapılarına çeşitli kimyasal modifikasyonlar yapılabilmektedir. Bu modifikasyonlar arasında; ana zincirde esnek bağlayıcıların eklenmesi, non-planar veya asimetric monomerlerin kullanımı ya da polimer iskeletine bağlı grupların dâhil edilmesi gibi yöntemler bulunmaktadır. Ayrıca, tiyofen, oksadiazol, tiadiazol, piridin gibi heterosiklik birimler içeren monomerlerin kullanımı ile poliazometinlerin çözünürlüğü artırılabilir [130, 134, 135].

Sadece aromatik monomerlerden üretilmiş poliazometinlerin yüksek ısı kararlılığı, aromatik halkaların çok sayıda olması ve tüm molekül üzerindeki geniş elektronik konjugasyon ile sağlanmaktadır, bu da yüksek iletkenliğe sahip polimerler oluşmasına yol açmaktadır. Geçiş sıcaklıklarını düşürmek ve çözünürlüklerini artırmak için birkaç yöntem kullanılmaktadır. Bunlar aromatik halkada orto-konumuna alkil veya alkoksi gruplarının eklenmesi, polikondensasyonda çözücü karışımı kullanılması veya ana zincirdeki aromatik halkalar arasında alifatik esnek bağlayıcıların dahil edilmesidir [136].

İmin (Schiff bazı) bağlarının oluşturulması yoluyla azometin polimerinin eldesine yönelik birçok yöntem bulunmaktadır. Ancak genel olarak bakıldığında şunları söyleyebiliriz ki; reaksiyon aldehit ve amin arasında nükleofilik katılma tepkimesi olup kondenzasyon reaksiyonudur. Bu işlem, genellikle ısı altında veya katalizör varlığında yapılır.



Bu genel reaksiyon, poliazometin sentezinin temelini oluşturur. Ancak, spesifik uygulamalarda kullanılan reaktanların türleri, sıcaklık, pH ve diğer koşullar sentez verimliliğini etkileyebilir.

Poliazometin eldesi amacı ile yapılan genel sentez yöntemlerinden birini adımlar halinde şu şekilde özetleyebiliriz [135].

- *Tepkime Maddeleri:* Diamin ve dialdehitin eşmolar alınarak uygun bir çözücüde (örneğin DMF (Dimetilformamid)) çözülmesi.
- *Reaksiyon Düzenegi:* Karışım, bir kondansatör, toplayıcı tüp ve manyetik karıştırıcı ile donatılmış üç ağızlı bir şişeye yerleştirilmesi.
- *Azeotropik Distilasyon:* Azeotrop olarak suyu uzaklaştırmak amacıyla toluen eklenmesi. Suyu uzaklaştırmak için azeotrop olarak toluen eklenir.
- *Katalizör:* Katalizör kullanılması (örneğin p-Toluen sülfonik asit)
- *Reaksiyon Koşulları:* Reaksiyon karışımı, argon atmosferi altında (ör: 6 saat boyunca) reflux (geri distilasyon) düzenegi kullanılarak karıştırılması
- *Ürün İzolasyonu:* Ürünün su içinde çöktürülmesi, süzülmesi ve ardından kurutularak eldesi.

Burada p-Toluen sülfonik asidin kullanımı, asit katalizli imin oluşumunu işaret ederken, argon atmosferi yan reaksiyonları önlemek için inert bir ortamın gerekli olduğunu gösterir.

Bir başka sentez yöntemi kullanarak poliazometin eldesi için takip edilen adımlar ise şu şekildedir [137]:

- *Reaktanların Hazırlanması:* LiCl argon atmosferinde korunarak, kuru bir yuvarlak dipli balona yerleştirilmesi. Dialdehit ve diamin uygun bir çözücüde çözülerek balona eklenmesi.

- *Reaksiyonun Başlatılması:* Katalizör olarak p-toluensülfonik asit eklenmesi ve karışımın 150 °C'ye ısıtılması. Bu aşamada reaksiyon karışımı derin kırmızı bir renge dönüşür.
- *Polimerin Sonlandırılması:* 24 saat sonra, polimerizasyonun sonlandırılması amacı ile aşırı miktarda amin bileşiği eklenerek reaksiyon sonlandırılması.
- *Soğutma ve Çöktürme:* 48 saat sonra, viskoz ve yoğun kırmızı renkteki reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğumaya bırakılması ve soğuduktan sonra karışımın uygun bir çözücüde (ör:metanol-su (50:50)) çözeltisinde çöktürülmesi.
- *Filtrasyon ve Yıkama:* Elde edilen polimerin filtrasyon ile toplanarak çöktürme solüsyonu ile yıkanması (ör:metanol-su (50:50))
- *Oligomerlerin Yıkanması:* 1000 g/mol (1K) oligomerin metanol ile yıkanması ve 9000 g/mol (9K) oligomerin ise düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerin ve reaktifi tamamlamamış son ürünlerin giderilmesi amacıyla refluktaki aseton ile yıkanması.
- *Son Ürünlerin Kurutulması:* Elde edilen nihai ürünler, vakumlu etüvde kurutularak, yoğun kırmızı katı haldeki polimerin elde edilmesi.

Yine bir başka poliazometin sentezinde takip edilen adımlar ise şu şekildedir [134]:

- *Reaktanların Hazırlanması Eklenmesi:* Azot girişi ile çıkışı ile donatılmış iki boyunlu, yuvarlak dipli bir balona uygun bir çözücü ile beraber eşmolar diamin ve dialdehit eklenir.
- *Karıştırma ve Reaksiyon:* Karışım, 25 °C'de 12 saat boyunca sürekli olarak karıştırılır. Bu aşamada, diamin ile dialdehit arasında poliazomethin oluşumu başlar.
- *Çöktürme:* 12 saat sonra, reaksiyon karışımı sürekli karıştırılarak suya eklenir ve böylelikle polimerin çökmesi sağlanır.
- *Son Ürünlerin Kurutulması:* Oluşan çökelti su ile yıkanır ve bir filtre üzerine toplanır. Toplanan polimer, 60 °C'de vakum altında 12 saat boyunca kurutulur.

Verilen örnek sentez yöntemlerindeki bu adımlar, poliazomethinlerin sentezini açıklamakta ve diamin ile dialdehit arasındaki polikondensasyon reaksiyonunun nasıl gerçekleştirildiğini basitçe göstermektedir.

Poliazometinler üzerine yapılan araştırmalar, bu yapıların geniş bir kullanım alanına sahip olduğunu göstermektedir. Biyolojik uygulamaya yönelik olarak bugüne kadar üretilmiş poliazometin türevlerinin bir kısmı aşağıdaki şekilde listelenebilir:

Poli(3-[[4-(dimetilamino)benziliden]amino]fenol) (P(3-DBAP)) [8]: 1200 °C'ye kadar termal dayanım gösteren bu polimerin antibakteriyel ve antifungal etki gösterdiği bildirilmiştir.

Polispermin imidazol-4,5-imin (PSI) [11]: pH duyarlı bu polimer siRNA ile kompleks oluşturabilme özelliği sayesinde, siRNA'nın öncelikle hücre içine ardından da endozomdan sitoplazmaya salımını kolaylaştıran bir etki göstermiştir.

2,5-furandikarboksaldehit ile dimerik ve trimerik aminlerin polimeri [12]: Bu polimerin en önemli özelliği biyo-esaslı kaynaklardan elde edilen monomerlerden üretilmesinden dolayı çevreci bir malzeme olarak öne çıkmasıdır.

4,4',4'',4'''-(eten-1,1,2,2-tetraol)-tetraanilin ve tereftaldehit esaslı mikroküreler [13]: Çoklu sayıda aldehit ve amin gruplarını içeren iki monomer kullanılarak ilaç taşımada da kullanılabilecek mezo-gözenekli mikroküreler elde edilmiştir.

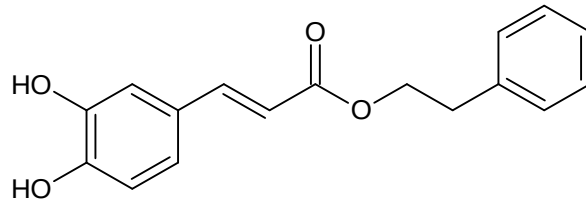
Schiff bazı grubu poliazometin yapılarının omurgalarında bulunan ve bu polimerlerin özgünlüğünü veren gruplardır. Ancak Schiff bazı biyoygulamalarda kullanılan birçok polimerik malzemenin üretiminde kullanılan temel bir gruptur. Schiff bazı grubu; iki polimerin zincir uçlarından bağlanması, bir protein/peptidin bir polimere bağlanması, bir polimere küçük bir ilaç/antijen/işaretleyici molekül bağlanması gibi birçok farklı amaçla kullanılmıştır. Tüm bu uygulamalarda Schiff bazı grubunun pH'a duyarlılık özelliği ve ılıman şartlarda sentezlenebiliyor olması en önemli avantajları olarak öne çıkmıştır.

Tüm bu veriler ışığında literatür incelemesi yapıldığında bugüne kadar bir poliazometin bloğuyla PEG bloğunda oluşan bir blok kopolimerin daha önce sentezlenmediği ve benzeri bir polimerik yapının da ilaç salımı amacıyla kullanılmadığı görülmüştür. Bu kapsamda, çalışmamızda PAM polimerinin PEG ile kopolimerlerinden üretilen pH'a duyarlı ilaç taşıyıcı misel sistemleri

geliştirilmiş ve bu sistemlerin, antikarsinojenik, immünomodülatör, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleriyle bilinen kafeik asit fenetil ester (CAPE) taşıma potansiyeli incelenmiştir.

2.6 Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), flavonoid benzeri bir bileşik olup (Şekil 2.15), bal arısı propolisinin en aktif bileşenlerinden biridir [138]. Yapılan çalışmalar moleküler şeklinin, sitotoksik yapısı için önemli olduğunu ortaya koymaktadır ve normal hücreler üzerinde potansiyel olarak zararlı bir etkisi yoktur [139]. CAPE, bir katekol halkası içindeki iki hidroksil grubundan oluşan bir polifenolik esterdir ve fenetil alkol ile kafeik asidin reaksiyonu sonucu oluşur. Propolisin bu etkin bileşeni antiviral [140], antioksidan [141], antialerjik [142], anti-inflamatuvar [143], antimikrobiyal [144], immünomodülatör [145] ve antikanserojenik [146, 147] gibi birçok biyolojik ve farmakolojik aktivite göstermektedir. CAPE'nin fenetil yapısı nedeniyle lipofilik özelliği ve membran geçirgenliği yüksektir [148]. Fonksiyonel iki -OH grubuna sahip olan CAPE, yükseltgeyici ve indirgeyici özellik göstermektedir. CAPE, lipoksijenaz, siklooksijenaz, glutatyon S-transferaz ve ksantin oksidaz gibi bazı enzim aktivitelerini inhibe etme özelliğine sahiptir [149, 150]. Ayrıca transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kappa B (NF-κB)'yi inhibe etme potansiyeli nedeniyle, CAPE'nin kanser hücrelerinde güçlü bir antitümör aktivitesi vardır. Çeşitli çalışmalar, CAPE'nin NF-κB inhibe edici potansiyelini farklı kanser hücre hatlarında göstermiştir; bunlar arasında meme kanseri MCF-7, malign periferik sinir kılıfı tümörleri, astrositoma GRT-MG, insan B-limfoma, prostat kanseri PC-3, miyeloid lösemi U-937 ve kolon kanseri HT-29, 26-L5 hücreleri yer almaktadır [151].



Şekil 2. 15 CAPE molekülünün kimyasal yapısı

Anti-inflamatuvar ajan olarak, prostoglandinlerin sentezini inhibe eden, timus bezini aktive eden, fagositik aktiviteyi tetikleyerek savunma sistemine yardımcı

olan, hücresel bağışıklığı stimüle eden ve epitelyal dokularda iyileşmeyi olumlu etkileyen özelliklere sahiptir. Akut ve kronik durumlarda antiinflamatuvar etki gösterebilmektedir [152].

Bu tez çalışmamızda taşıyıcı sistemimizin özgün olmasının yanı sıra CAPE'nin enkapsülasyonu da incelenerek biyolojik etkinliği araştırılmıştır.



3

GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 Kimyasallar ve Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan kimyasallar; etilendiamin (Merck), glutardialdehit (%25) (Merck), amin ve karboksilik asitle fonksiyonlandırılmış PEG (NH₂-PEG-COOH) (Mw: 2 kDa) (Creative PEGworks), etanol (Tekkim), dietil eter (Merck), dimetilsülfoksit (DMSO, Merck), dimetilformamid (DMF, Merck), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (BioBasic), Dulbecco's modifiye Eagle medyum (DMEM) (Gibco), fetal sığır serumu (FBS) (Gibco), streptomisin (Gibco), penisilin (Gibco) ve L-glutamindir (Gibco). Tüm kimyasallar alındıkları şekilde kullanılmış, herhangi bir ön saflaştırma işlemine tabi tutulmamıştır.

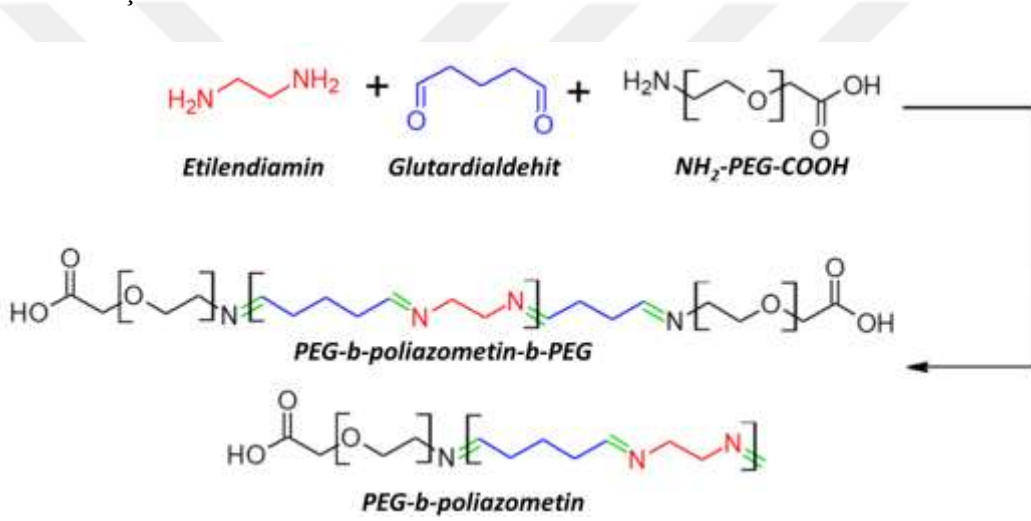
Çalışmada kullanılan hücre hattı insan kaynaklı fibroblast (HDF) hücreleridir (American Type Culture Collection, ATCC).

3.2 Cihazlar

Sıcaklık kontrollü UV-Görünür bölge spektrofotometresi (Shimadzu UV-1700), ATR aparatlı FTIR spektrofotometresi (Perkin Elmer Spectrum One), NMR spektroskopisi (Bruker Avance III 500 MHz), dinamik ve elektroforetik ışık saçılması spektroskopisi (Malvern Zetasizer Nano ZS), taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) dedektörlü taramalı elektron mikroskobu (Thermoscientific Quattro S, Boğaziçi Üniversitesi), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 800), ısıtıcı ve sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcı (Heidolph Hei-Tec), ısıtıcı çalkalayıcı (N-BIOTEK/GFL), vakumlu etüv (Binder VD 115), CO₂ etüvü (Binder CB 60), laminer akışlı kabin (N-BIOTEK Leading Biotechnology).

3.3 PAM-b-PEG Kopolimerinin Sentezi

PAM-b-PEG blok kopolimerinin sentezi Şekil 3.1’de belirtilen reaksiyonla gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda ABA ya da AB tipi blok kopolimer olabileceği düşünülmektedir. Reaksiyon için 4 mL etanol içerisinde 2×10^{-3} mol (134 μ L) etilendiamin (ED) ve 2×10^{-3} mol (800 μ L) glutardialdehit (GA) eklenmiştir. Daha sonra çözeltiye 2×10^{-5} mol (40 mg) $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ eklenmiştir. Ortam sıcaklığında 24 saat sürekli karıştırıldıktan sonra, oluşan polimerlerin çöktürülmesi için çözeltiye aşırı miktarda (en az 20 kat hacimde) dietil eter eklenmiş ve 8000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Elde edilen kahverengi-turuncu renkli çökelti halindeki polimer 24 saat boyunca vakum altında kurutulmuştur.



Şekil 3. 1 PAM-b-PEG blok kopolimerinin sentez reaksiyonu

PAM-b-PEG blok kopolimeri aynı yöntem kullanılarak, ancak bileşenlerin oranları değiştirilerek farklı oranlarda sentezlenmiştir. Tablo 3.1’de PAM-b-PEG blok kopolimer sentezinde kullanılan bileşen oranları ve ilgili örnek kodları verilmektedir. Tablo 3.1’de n_{ED} , n_{GA} ve n_{PEG} sırasıyla ED, GA ve PEG’in mol sayılarını temsil etmektedir.

Tablo 3. 1 PAM-b-PEG blok kopolimer sentezinde kullanılan bileşen oranları ve örnek kodları

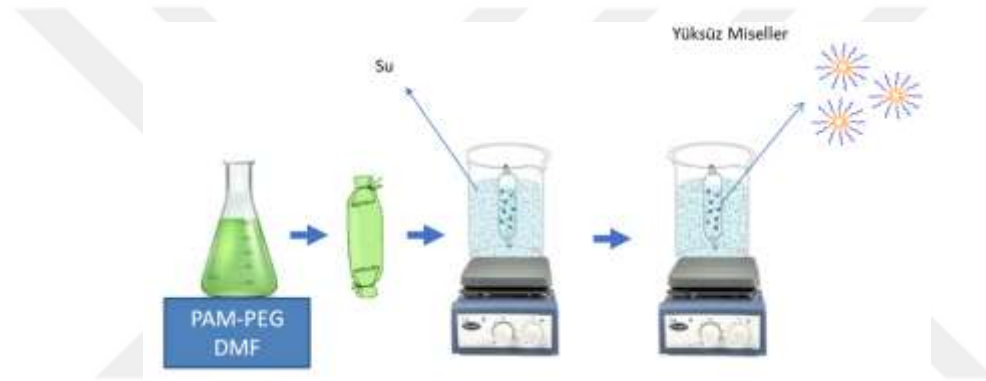
Örnek Kodu	N1	N2	N3	N4
$(n_{\text{ED}}+n_{\text{GA}}/n_{\text{PEG}})$	200/1	200/2	200/4	200/7

3.4 Misellerin Hazırlanması

3.4.1 PAM-b-PEG Misellerinin Hazırlanması

PAM-b-PEG kopolimer miselleri diyaliz yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır [153]. Yöntem, Şekil 3.2’de şematik olarak gösterilmektedir.

Bu yöntemde öncelikle 25 mg PAM-b-PEG kopolimeri 100 mL DMF içinde çözülmüştür. Bu çözelti daha sonra moleküler ağırlığı sınır değeri 14.000 g/mol olan bir diyaliz membranına aktarılmış ve 24 saat boyunca manyetik karıştırma altında 1200 mL ultra saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyalizat her 6 saatte bir yenilenmiştir. Diyaliz membranı içinde kalan berrak çözeltinin bir kısmı +4°C’de, bir kısmı da liyofilize edilerek saklanmıştır.



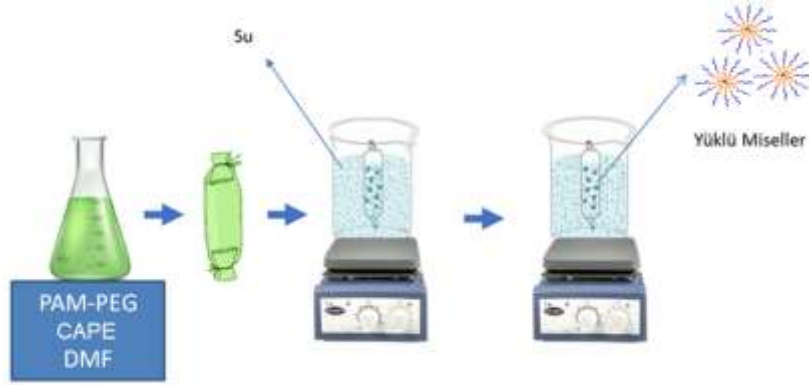
Şekil 3. 2 PAM-b-PEG blok kopolimer misellerinin diyaliz yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi.

3.4.2 CAPE Yüklü PAM-b-PEG Misellerinin Hazırlanması

CAPE yüklü PAM-b-PEG miselleri, PAM-b-PEG misellerinin hazırlanmasında kullanılan yöntem ile hazırlanmıştır. Şekil 3.3’de CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin hazırlanması şematik olarak gösterilmektedir. Bu yöntemde $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}$ kütle oranı 1/0,2; 1/0,4; 1/1 ve 1/2 olarak belirlenmiş ve bu miseller hazırlanmıştır. m_{CAPE} ve $m_{\text{PAM-b-PEG}}$ sırasıyla CAPE ve PAM-b-PEG’in kütlelerini temsil etmektedir.

$m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}=1/0,2$ kütle oranı için misel hazırlama yöntemi şu şekildedir: 25 mg PAM-b-PEG kopolimeri ve 5 mg CAPE 100 mL DMF içinde çözülmüştür. Bu çözelti daha sonra moleküler ağırlığı sınır değeri 14.000 g/mol olan bir diyaliz membranına aktarılmış ve 24 saat boyunca manyetik karıştırma altında 1200 mL ultra saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyalizat her 6 saatte bir yenilenmiştir.

Diyaliz membranı içinde kalan berrak çözeltinin bir kısmı +4°C’de, bir kısmı da liyofilize edilerek saklanmıştır.



Şekil 3. 3 CAPE yüklü PAM-b-PEG blok kopolimer misellerin diyaliz yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi.

3.5 Karakterizasyonlar

Polimer ve misellerin FTIR spektrumları Perkin Elmer Spectrum One FTIR (ATR aparatlı) spektrofotometresinden elde edilmiştir. Spektrumlar 4000-650 cm^{-1} aralığında elde edilmiştir.

CAPE molekülünün enkapsülasyonu ve misellerden salımı çalışmalarında absorbands ölçümleri için Shimadzu UV-1700 UV-Vis spektrofotometresi kullanılmıştır. Ölçümler 200-500 nm aralığında alınmıştır. Bu çalışmalarda CAPE miktar tayini yapılabilmesi için etanolde farklı konsantrasyonlarda çözölmüş CAPE’nin absorbands değeri 325 nm’de okunmuştur.

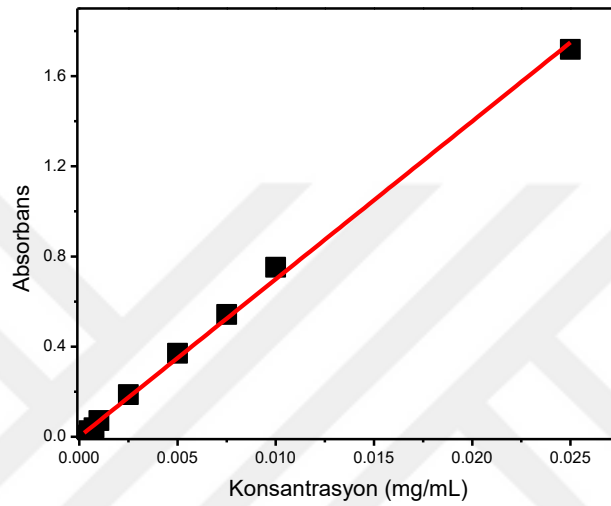
NMR spektrumları Bruker Ascend 500 ile kaydedilmiştir. Çözücü olarak dötero kloroform kullanılmıştır.

Partikül boyutu, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi değeri Malvern Zetasizer NanoZS dinamik ve elektroforetik ışık saçılması spektroskopisinden elde edilmiştir. Ölçümler oda sıcaklığında yapılmıştır.

Misellerin morfolojik özellikleri, yüksek vakum altında 25-30 kV’de çalışan taramalı geçirimli elektron mikroskobu (STEM) dedektörlü Thermo Scientific Quattro S taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Görüntüleme için numuneler karbon film kaplı bir bakır ızgara üzerine yerleştirilmiş ve kurutulmuştur.

3.5.1 CAPE Kalibrasyon Eğrisi

CAPE molekülünün misellere enkapsülasyon etkinliği, misellerin yükleme kapasitesi ve misellerden CAPE salımı çalışmalarında bu molekülün miktar tayini UV spektroskopisi kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple CAPE molekülünün 0,00025-0,025 mg/mL konsantrasyon aralığında etanolde hazırlanan çözeltilerinin 325 nm'deki absorbans değerleri saptanmış ve Şekil 3.4'teki konsantrasyon-absorbans grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3. 4 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CAPE çözeltilerinin 323 nm'deki absorbans değerlerinden elde edilen konsantrasyon-absorbans grafiği

Şekil 3.4'te konsantrasyon-absorbans değişimi arasında lineer bir ilişki kurulmuş ve formül $y = 69,97053x$ olarak, bu lineer ilişkinin R^2 değeri de 0,9986 olarak belirlenmiştir.

3.5.2 Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi

Misellerin enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi indirekt yöntemle belirlenmiştir [154]. Bu amaçla, misel hazırlanması sırasında diyaliz membranının dışındaki çözeltide kalan enkapsüle olmamış CAPE miktarı ölçülmüştür. Serbest CAPE konsantrasyonu, 325 nm'deki absorbans değerinin Şekil 3.4'teki kalibrasyon eğrisi üzerinden konsantrasyona çevrilmesiyle elde edilmiştir.

Misellerin enkapsülasyon etkinliği (EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (YK) Eşitlik 1 ve 2'ye göre belirlenmiştir; burada $m_{CAPE-EN}$ ve m_{CAPE-I} sırasıyla kapsüllenmiş ve başlangıç CAPE miktarıdır, m_T ise liyofilize CAPE yüklü miselin toplam miktarıdır.

$$EE\% = (m_{\text{CAPE-EN}} / m_{\text{CAPE-I}}) \times 100 \quad (1)$$

$$YK\% = (m_{\text{CAPE-EN}} / m_T) \times 100 \quad (2)$$

3.5.3 In Vitro Salım Çalışmaları

CAPE yüklü miseller için in vitro salım çalışmaları hem pH 7,2 hem de pH 5,0'da gerçekleştirilmiştir. Spesifik olarak, hazırlanan misellerin 1,0 mg'ı pH 7,2'de 1 mL tuzlu fosfat tamponu (PBS; 0,15 M NaCl, 0,01 M NaH₂PO₄, 0,01 M Na₂HPO₄) içinde dağıtılmış ve 100 rpm'de çalkalanarak 37°C'de inkübasyon altında pH 7,2'de 5 mL PBS'ye karşı diyaliz edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında 1 mL diyalizat toplanmış ve eşit hacimde taze PBS diyalizata eklenmiştir. UV spektroskopisi kullanılarak toplanan örneklerin 325 nm'de absorbans değerleri belirlenerek Şekil 3.4'teki kalibrasyon eğrisiyle CAPE konsantrasyonları bulunmuştur.

İn vitro salım çalışması, ayrıca tuzlu asetat tamponu (0,15 M NaCl; 0,01 M NaCH₃COO; 0,01 M CH₃COOH) kullanılarak pH 5,0'da gerçekleştirilmiştir.

3.5.4 Biyobozunurluk Testi

CAPE yüklü miseller, hem PBS (pH 7.2) hem de asetat tamponu (pH 5.0) içinde 1 mg/mL konsantrasyonda disperse edilmiştir. Bu çözeltiler, 37 °C'de 100 rpm hızında çalkalanarak inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman aralıklarında çözeltiler dinamik ışık saçılması spektroskopisi 37 °C'de analiz edilerek ışık saçılması şiddetleri belirlenmiştir.

3.6 In vitro Biyolojik Çalışmalar

3.6.1 Hücre Kültürü Koşulları

İnsan kaynaklı fibroblast (HDF) hücreleri ATCC yönergelerine uygun olarak kültürlenmiştir. Hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS), 100 µg/mL streptomisin, 100 birim/mL penisilin ve 0,2 mM L-glutamin ile desteklenmiş Dulbecco modifiye Eagle medyumunda (DMEM) muhafaza edilmiştir. Kültürler 37 °C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir atmosferde inkübe edilmiştir. Kültür ortamı her 2-3 günde bir değiştirilmiştir.

3.6.2 Hücre Canlılığı Deneyi

Hücre canlılığının belirlenmesi için MTT testi kullanılmıştır [155]. HDF hücreleri 96 kuyucuklu plakalara 1×10^4 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. İnkübasyonun ardından, kuyucuklardaki medyum çekilerek 0-1 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlardaki CAPE, CAPE yüklü PAM-b-PEG miseli ve PAM-b-PEG miseli içeren taze medyumlar eklenmiştir. 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra her bir kuyucuktan besiyeri çekilmiş ve MTT reaktifi eklenerek 37 °C'de 3 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, MTT çözeltisi toplanmış ve mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesiyle üretilen formazan kristalleri 0,1 mL DMSO içinde çözülmüştür. Daha sonra absorbans bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Hiçbir işlem görmeyen hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Metabolik aktivite değerleri en az üç tekrarın ortalaması $\pm$ SD olarak sunulmuştur. Hücre canlılığı, Eşitlik 3 kullanılarak belirlenmiştir. Eşitlik 3'te OD_T ve OD_{UT} sırasıyla ilgili örnekle muamele edilmiş hücreleri ve kontrol hücrelerin absorbans değerlerini temsil etmektedir.

$$\text{Hücre Canlılığı \%} = (OD_T / OD_{UT}) \times 100 \quad (3)$$

4 BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışması, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler olarak poliazometinlerin ilaç salım sistemi olarak potansiyelini ortaya koymayı amaçlamaktadır. Bu kapsamda,

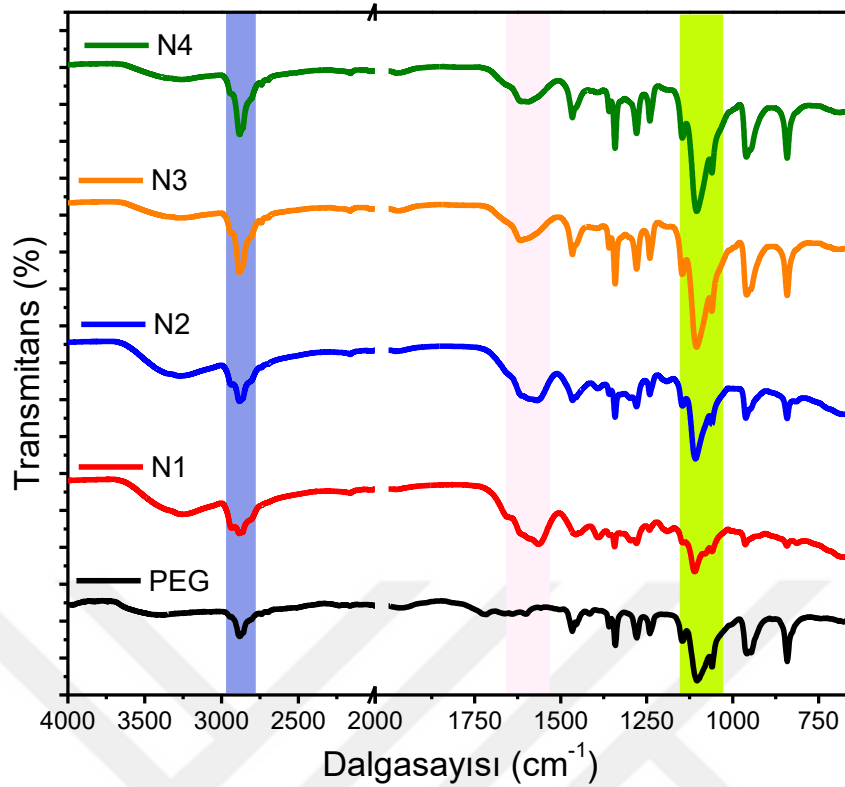
- PEG ile poliazometinin bir blok kopolimeri sentezlenmiş,
- Üretilen blok kopolimeri kullanarak CAPE yüklü miseller hazırlanmış
- Hazırlanan misellerin bozunma ve ilaç salım özellikleri incelenmiş
- Tüm örneklerin sitotoksisiteleri incelenmiştir.

4.1 PAM-b-PEG Kopolimeri Sentezi ve Karakterizasyonu

Çalışmanın ilk adımında, hedeflenen kopolimer yapısına ulaşabilmek için NH_2 -PEG-COOH polimeri ile monomer olarak glutaraldidehit (GA) ve etilen diamin (ED) kullanılarak blok kopolimer sentezlenmiştir. PAM-b-PEG blok kopolimeri, ED ve PEG’de bulunan amin gruplarının GA’da bulunan aldehit gruplarıyla Schiff bazı grubu oluşturması üzerinden kondenzasyonu reaksiyonu olarak ilerlemektedir.

Çalışmada, misel oluşturabilecek özellikte hidrofobik/hidrofilik dengeye sahip blok kopolimeri üretebilmek için değişen monomer/PEG kütle oranlarında sentezler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, PEG miktarı değiştirilirken polizmerizasyon çözeltisindeki monomerlerin miktarı sabit tutulmuştur. ED ve GA monomerleri polimerizasyon sonrasında hidrofobik bloğu oluştururken PEG bloğu ise hidrofilik kısmı oluşturmaktadır. Optimum polimer yapısını elde edebilmek için 4 farklı polimer üretilmiştir (N1, N2, N3, N4).

Elde edilen kopolimerlerin kimyasal yapısını aydınlatabilmek için öncelikle FTIR ve NMR spektroskopileri kullanılmıştır.



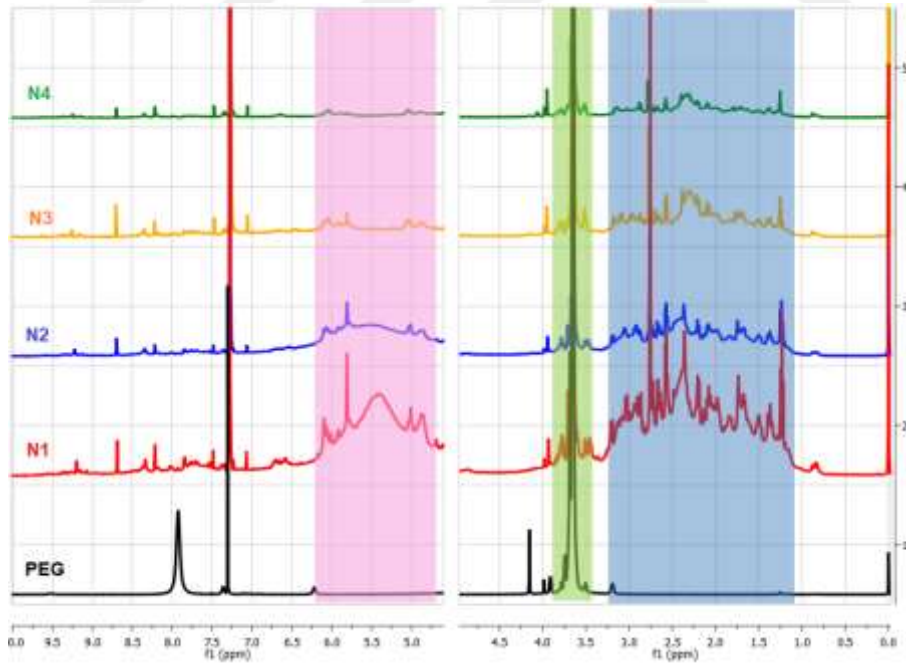
Şekil 4. 1 Sentezlenen PAM-b-PEG blok kopolimerleri ve PEG'e ait FTIR spektrumları.

Şekil 4.1'de PEG ve üretilen blok kopolimerlerin FTIR spektrumları verilmektedir. Bu spektrumlarda, hem PEG hem de sentezlenen kopolimerlerde bulunan alifatik eterlerin C-O-C gerilmesine ve alifatik CH₂ gruplarının CH gerilmesine karşılık gelen benzer bantlar sırasıyla 1110 cm⁻¹ (yeşil bölge) ve 2883 cm⁻¹'de (mavi bölge) gözlemlenmiştir. 1640 cm⁻¹ ile 1520 cm⁻¹ arasındaki geniş bir bant (pembe bölge), 1615 cm⁻¹ ve 1568 cm⁻¹'de minimum noktaları olan iki bandın kesişimini temsil etmektedir. 1615 cm⁻¹'deki bant, -N=CH- grubunun gerilmesine karşılık gelmekte olup, önceki birçok çalışmada da gösterilmiştir [156, 157]. Kamacı ve arkadaşları [156] ayrıca 1568 cm⁻¹'deki bantın da -N=CH- grubuna ait olduğunu göstermişlerdir.

1640 cm⁻¹ ile 1520 cm⁻¹ arasındaki geniş bir bantın şiddetinin N1'den N4 örneğine doğru azaldığı görülmektedir. Bu durumun, sentez ortamındaki PEG miktarının artması ve dolayısıyla oluşan kopolimerdeki -N=CH- gruplarının sayısının azalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Şekil 4.2’de PEG ve üretilen blok kopolimerlerin ^1H -NMR spektrumları verilmektedir. Öncelikle PEG’in ^1H -NMR spektrumunda ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) protonları 3,64 ppm’de (Şekil 4.2, yeşil bölge) gözlemlenmiştir. 7,93 ppm’de PEG’in NH_2 grubuna ait protonlar gözlenirken, 3,51 ppm’de ise $-\text{CH}_2\text{COOH}$ ucundaki protonlar gözlenmektedir.

Blok kopolimerlerinin ^1H -NMR spektrumlarında ise, PEG’in ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) protonları 3,64 ppm’de (Şekil 4.2, yeşil bölge) gözlemlenmiştir. 6.06 ile 5.81 ppm (Şekil 4.2, pembe bölge) arasında gözlemlenen pikler, imin (Schiff bazı) protonlarına ($-\text{CH}=\text{N}-$) ait olabileceği düşünülmüştür. Azometin gruplarının protonları, özellikle imin gruplarının doğrudan aromatik halkalara bağlı olduğu aromatik poliazometinler için genellikle 8 ppm’in üzerinde gözlemlenmektedir [158]. Üretilen kopolimerde, azometin grupları alifatik gruplarla bağlantılıdır ve bu durum, azometin gruplarının ^1H -NMR spektrumunda biraz daha düşük ppm değerlerinde gözlemlenmesinin sebebi olabilir. 3,2 ppm’in altındaki pikler ise (Şekil 4.2, mavi bölge), imin grupları arasındaki alifatik karbonların protonlarına karşılık gelmektedir.



Şekil 4. 2 Sentezlenen PAM-b-PEG blok kopolimerleri ve PEG’e ait ^1H -NMR spektrumları.

Özellikle lineer polimer üretilmesinden sonra kimyasal yapının analizinin yanı sıra polimerin molekül ağırlığının belirlenmesi de polimerlerin tüm özelliklerini

etkilediğinden önemli bir karakterizasyon basamağıdır. Bu amaçla jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) kullanımı hem molekül ağırlığı hem de molekül ağırlığı sonuçları vermesi açısından en sık kullanılan önemli bir yöntemdir. Ancak üretilen polimerlerin su ve tetrahidrofuran gibi GPC’de kullanılan çözücülerde çözünmemesinden dolayı bu yöntemle PAM-b-PEG kopolimerleri incelenememiştir. Bu sebeple, elde edilen ^1H -NMR spektrumları kullanılarak blok kopolimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_n) (Tablo 4.1) saptanmıştır.

Tablo 4. 1 Üretilen PAM-b-PEG kopolimerlerinin ^1H -NMR spektrumları kullanılarak elde edilen molekül ağırlığı (M_n) değerleri.

Örnek Kodu	M_n (g/mol)
N1	3.955
N2	3.125
N3	2.248
N4	2.095

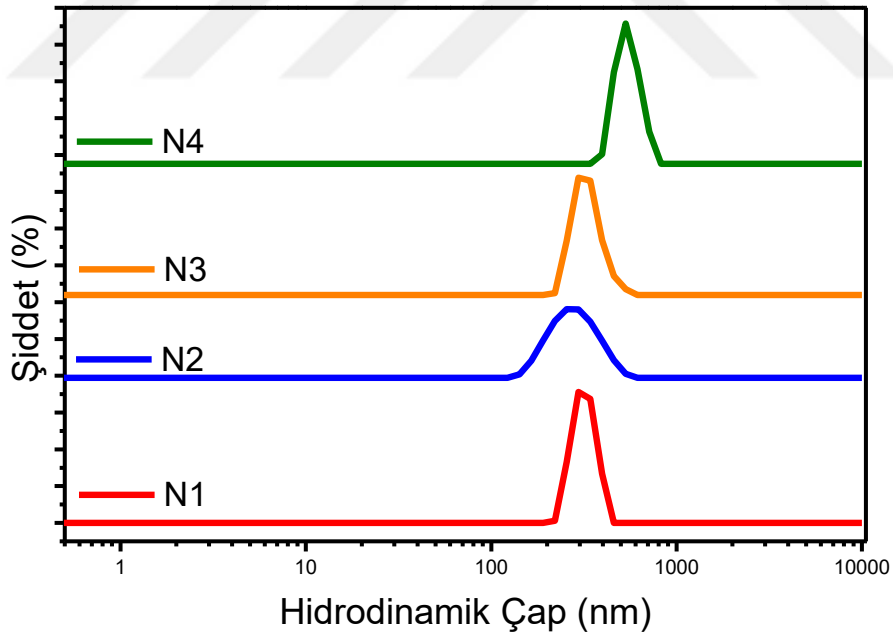
Tablo 4.1 incelendiğinde M_n değerinin N1’den N4 örneğine doğru azaldığı görülmektedir. Bu durumun, N1’den N4 örneğine doğru PEG miktarının giderek artması ve bu sebeple PEG başına düşen monomer sayısının azalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Şekil 3.1’de blok kopolimerlerin ABA veya AB tipi olabileceği belirtilmiştir. Saptanan molekül ağırlıkları incelendiğinde elde edilen kopolimerlerin ağırlıklı olarak PEG-PAM diblok kopolimer yapısında olabileceği düşünülmüştür. ^1H -NMR spektrumlarında 6.06 ile 5.81 ppm (pembe bölge) arasında gözlemlenen piklerin şiddetinin de N1’den N4 örneğine doğru azalması azometin gruplarının sayısının azaldığını net olarak göstermektedir. M_n değerlerin üzerinde durulması gereken diğer bir nokta ise her bir kopolimerdeki azometin gruplarının sayısıdır. PEG’in M_n değeri 2000 g/mol olduğundan N4 örneğinde toplamda yaklaşık 1’er adet ED ve GA’nın bulunduğu görülmektedir. Ancak N1 örneğinde ise yaklaşık 15’er adet ED ve GA bulunmaktadır.

FTIR ve NMR spektrokopileri ile gerçekleştirilen analizler sonrasında üretilen kopolimerlerin hem kimyasal yapıları hem de molekül ağırlığı değerleri bulunmuştur ve sentez çalışmalarının başarıyla tamamlandığı düşünülmüştür.

4.2 PAM-b-PEG Kopolimer Misellerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Tez çalışmasının sonraki aşamasında üretilen blok kopolimerlerden misellerin üretilmesidir. Bu amaçla diyaliz tekniği kullanılarak PAM-b-PEG kopolimer miselleri üretilmiştir. Bu yöntemde kopolimerler öncelikle DMF’te çözülmüş sonrasında ise suf suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz yönteminin seçilmesindeki en önemli sebep kopolimerlerin birçok çözücüde çözünmemesidir. DMF içinde bile kopolimer çözeltileri berrak çözelti oluşturmamış biraz bulanık çözeltiler oluşturmuştur. Diyaliz sonrasında ise membran içinde oluşan çözeltiler tamamen berrak çözeltilerdir.

PAM-b-PEG kopolimerlerinden üretilen misellerin dinamik ışık saçılması spektroskopisi kullanılarak elde edilen hidrodinamik boyut dağılımları Şekil 4.3’te gösterilmektedir. Boyut dağılımları incelendiğinde tüm misellerin unimodal bir boyut dağılımı gösterdiği ve ikincil agregasyona yönelik hiçbir pikin bulunmadığı görülmektedir.



Şekil 4. 3 PAM-b-PEG kopolimer misellerin şiddete bağlı hidrodinamik boyut dağılımları.

Misellerin boyut dağılım grafiklerinden elde edilen hidrodinamik çap (z-ortalama) ve polidispersite indeks değerleri Tablo 4.2’de verilmektedir. Misellerin boyutları 264,6-564,0 nm arasında değişirken PDI değerleri ise 0,202-0,629 arasında

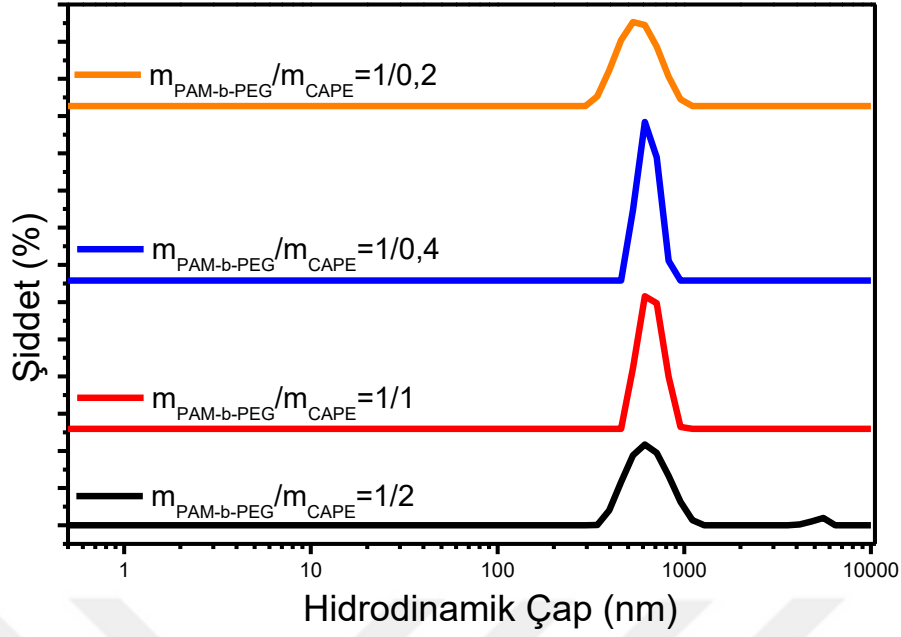
değişmektedir. İlaç taşıyıcı nano-boyutlu partiküllerin EPR etkisiyle kanserli dokularda birikebilmesi için 10-200 nm aralığında olması gerektiği birçok çalışmada belirtilmiştir [159]. Üretilecek CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin de bu boyut aralığında olması etkinliğinin daha yüksek olmasını sağlayacaktır. N2 kodlu miselin boyutunun bu boyut aralığına en yakın değer olduğu görülmektedir. Ayrıca, N2 kodlu miselin PDI değeri de 0,3'ten küçük olan tek değerdir. PDI değerinin 0,3'ten küçük olması ilgili nanoboyutlu partikülün monodispers özellikte olduğunu veya homojen bir boyut dağılımına sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, N2 kodlu örneğin boyutu ve PDI değeri bu miselin ilaç taşıyıcı bir misel sistemi olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bu sebeple de CAPE yüklü misel üretimi için tezin bundan sonraki kısmında N2 kodlu PAM-b-PEG kodlu blok kopolimerle devam edilmiştir.

Tablo 4. 2 PAM-b-PEG blok kopolimerlerden üretilen misellerin hidrodinamik çap (şiddet) ve polidispersite indeks (PDI) değerleri.

Örnek Kodu	Hidrodinamik Çap (nm)	PDI
N1	321,9	0,522
N2	264,6	0,202
N3	337,4	0,546
N4	564,0	0,629

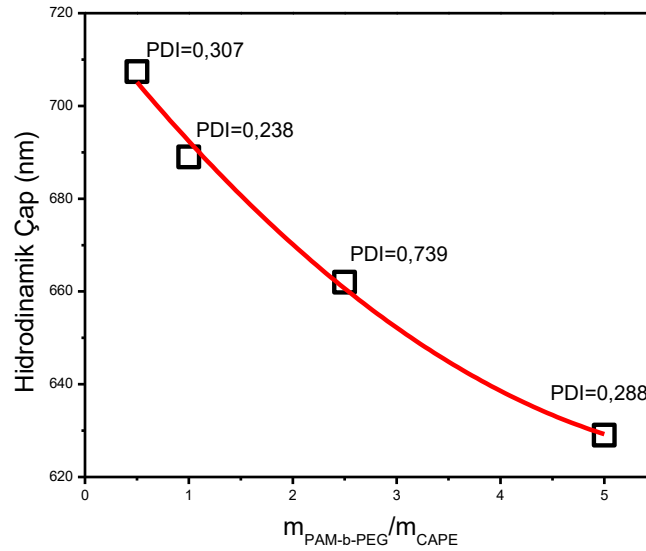
4.3 CAPE Yüklü PAM-b-PEG Kopolimer Misellerin Üretimi ve Karakterizasyonu

CAPE yüklü misel üretimi de yine diyaliz yöntemiyle gerçekleştirilmiş, CAPE ve N2 kodlu PAM-b-PEG kopolimeri DMF'de çözülerek saf suya karşı diyaliz edilmiştir. Çalışmada öncelikle enkapsüle edilecek CAPE miktarının misel yapısına etkisini araştırmak için farklı $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}$ oranlarında miseller hazırlanmıştır. Hazırlanan bu misellerin ışık saçılması spektroskopisinden elde edilmiş boyut dağılımları Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Boyut dağılım grafikleri incelendiğinde tüm CAPE yüklü misellerin unimodal boyut dağılımına sahip olduğu ve ikincil agregasyona yönelik hiçbir pikin bulunmadığı görülmektedir.



Şekil 4. 4 N2 kodlu PAM-b-PEG kopolimeriyle üretilen ve farklı $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}$ oranlarında üretilmiş CAPE yüklü misellerin hidrodinamik boyut dağılım grafikleri.

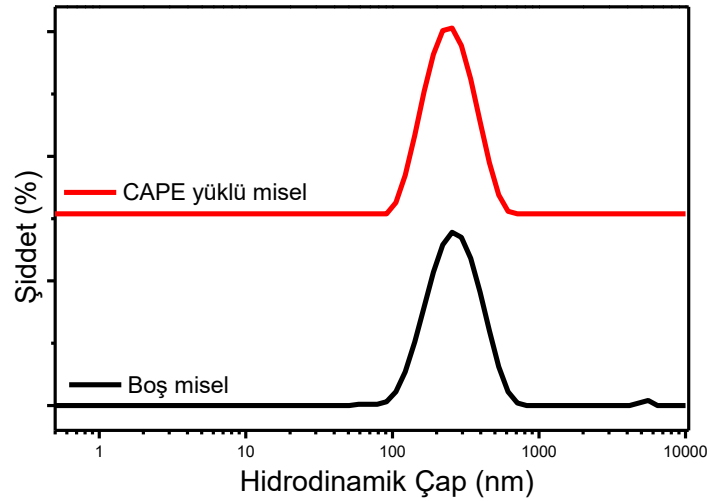
Misellerin boyut dağılım grafiklerinden elde edilen hidrodinamik çap (z-ortalama) ve polidispersite indeks değerleri Şekil 4.5'te verilmektedir. $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}$ oranı arttıkça, yani yüklenen CAPE miktarı azaldıkça misellerin hidrodinamik boyutunun azaldığı görülmektedir. Bu durumun miselin çekirdeğindeki ilaç miktarının azalmasından ve dolaylı olarak misel çekirdeğinin boyutunun daha küçük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun yanında, PDI değeri 0,3'den küçük olup, en düşük hidrodinamik çap en yüksek $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}=1/0,2$ oranında CAPE kullanılması ile elde edilen misellerde görülmüştür. $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}=1/0,2$ oranındaki miselin boyutu ise 629 nm'dir. Tüm oranlar içinde en düşük boyuta ve 0,3'den küçük PDI değerine $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}=1/0,2$ örneği sahip olduğundan bundan sonraki çalışmalara bu örnekle devam edilmiştir.



Şekil 4. 5 $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}$ oranına bağlı olarak CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin hidrodinamik boyut ve PDI değişimi.

Çalışmanın sonraki aşamasında N2 kopolimeri ve $m_{\text{PAM-b-PEG}}/m_{\text{CAPE}}=1/0,2$ oranı kullanılarak CAPE yüklü ve boş PAM-b-PEG miselleri yüksek miktarda üretilmiş ve bundan sonraki tüm çalışmalar bu miseller kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.6’da CAPE yüklü ve boş misellerin hidrodinamik boyut dağılım grafikleri verilmektedir. Boyut dağılım grafikleri incelendiğinde hem CAPE yüklü hem de boş miselin unimodal boyut dağılımına sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4. 6 Boş ve CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin şiddete bağlı hidrodinamik boyut dağılımları.

Boş ve CAPE yüklü misellerin z-ortalama hidrodinamik çapları ve PDI değerleri Tablo 4.3’te verilmektedir. Boş ve CAPE yüklü misellerin z-ortalama

hidrodinamik çapları sırasıyla 259.6 nm ve 233.8 nm olarak ölçülmüştür; her iki misel için PDI değerleri de 0,25'in altındadır. Bu boyut değerleri incelendiğinde en önemli noktanın burada elde edilen CAPE yüklü misel boyutunun Şekil 4.5'tekinden çok daha küçük olmasıdır. Bu durumun yüksek miktarda misel üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle hacim miktarı ve diyaliz membranı yüzey alanı gibi moleküllerin difüzyonunu etkileyen parametrelerin misel oluşumuna etkisi bulunacağı aşıkardır [160]. Bu sebeple de yüksek miktarda gerçekleştirilen bu misellerin boyutlarının farklı olduğu düşünülmüştür.

Misel boyutlarında dikkat çeken diğer bir nokta ise CAPE yüklü miselin boyutunun da daha küçük olmasıdır. PAM bloğu ile CAPE molekülleri arasındaki artan hidrofobik etkileşimlere bağlı olarak daha kompakt bir misel çekirdeğinin oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

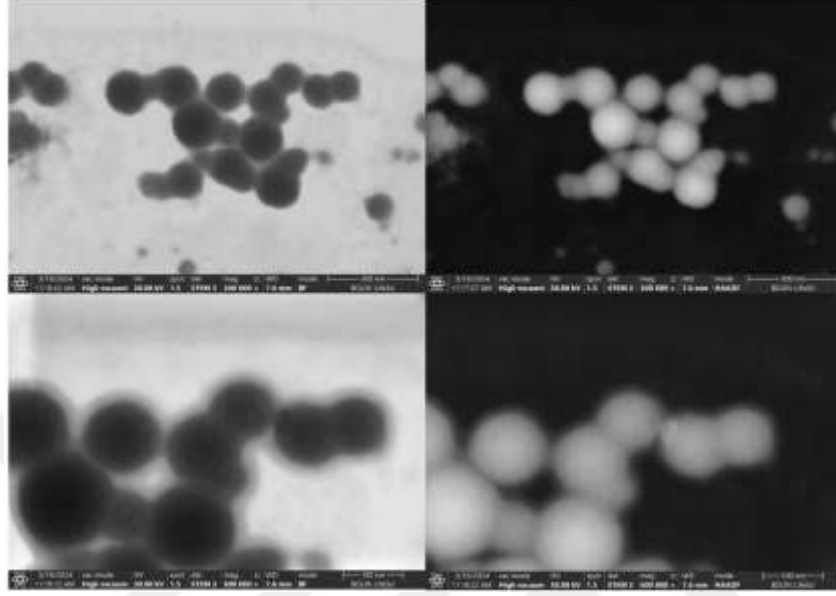
Tablo 4. 3 Boş ve CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin hidrodinamik boyut, PDI ve zeta potansiyel değerleri.

Örnek	Hidrodinamik Çap (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
Boş Misel	259,6	0,219	-5,11
CAPE Yüklü Misel	233,8	0,151	-7,49

Misellerin zeta potansiyeli elektroforetik ışık saçılması yöntemi ile ölçülmüştür. Sonuçlar, misellerin pH 7.2'de yüzey yükünün hafifçe negatif olduğunu göstermiştir. Boş misel için zeta potansiyel değeri -5.11 mV iken CAPE yüklü misel için ise -7.49 mV olarak belirlenmiştir. Bu negatif yüzey yükü, kopolimerin sentezinde kullanılan PEG'in zincir sonundaki COOH grubuna atfedilmektedir. Sentez sırasında, PEG'in NH₂ uç grubu -CH=N- bağının oluşumuna katılırken, COOH grubu bağlanmamış halde kalmaktadır. Ayrıca, bu COOH grubu miselin sulu faza maruz kalan tarafında yer almakta olduğundan gözlemlenen negatif yüke sebep olmaktadır.

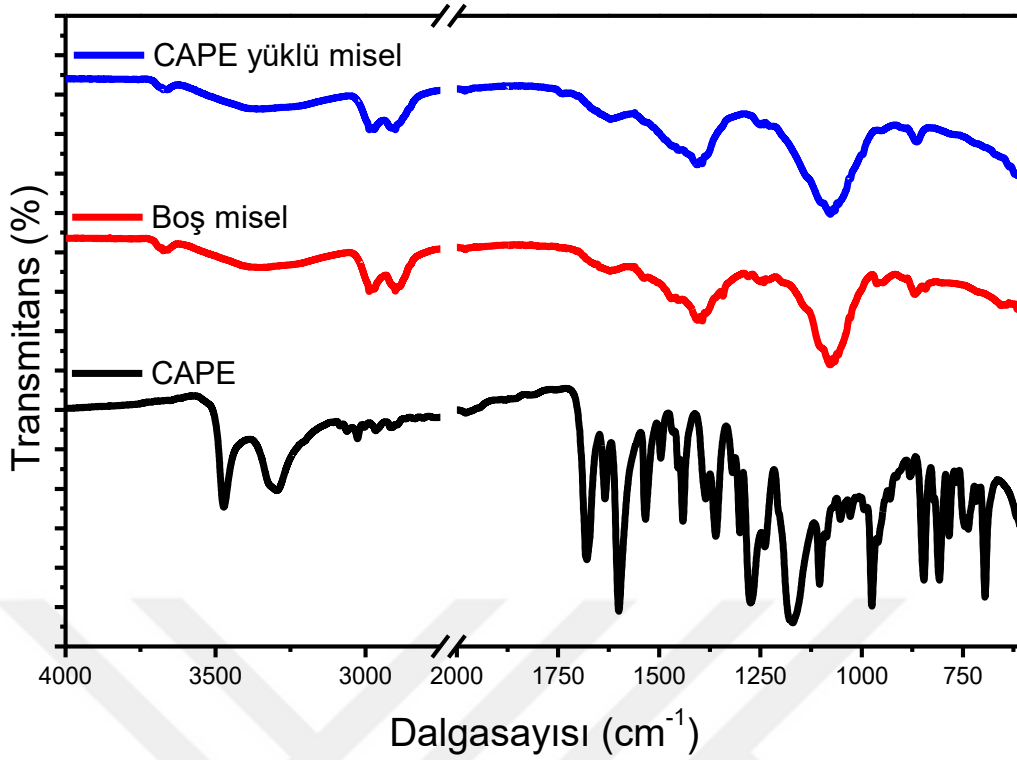
Misellerin morfolojileri STEM dedektörlü SEM yöntemi ile görüntülenmiştir. Şekil 4.7'de CAPE yüklü PAM-b-PEG miselinin SEM görüntüleri verilmektedir. SEM görüntülerinde CAPE yüklü miselin küresel bir şekle sahip olduğu görülmektedir. Misellerin ortalama çapının ise 135,5 nm olduğu belirlenmiştir. Işık saçılması yönteminde elde edilen çaptan daha küçük olan bir ortalama çap

SEM yönteminde gözlenmiştir. SEM analizinde DLS sonuçlarına kıyasla gözlenen boyut küçülmesi, SEM numunesi hazırlama işlemi sırasında misel partiküllerinin çekirdek ve kabuğunun çökmesi ve dehidrasyonuna bağlanabilir [161].



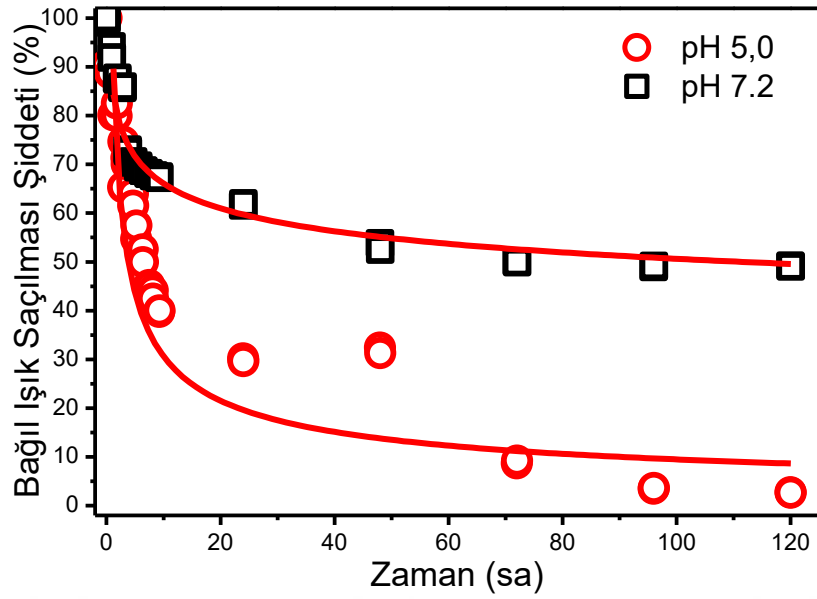
Şekil 4. 7 CAPE yüklü PAM-b-PEG miselinin farklı büyütme ölçeklerinde SEM görüntüleri.

Misel oluşumu ışık saçılması spektroskopisi ve SEM ile tespit edildikten sonra, misel yüzeyine adsorbe olan CAPE moleküllerini değerlendirmek için FTIR spektroskopisi kullanılarak miseller karakterize edilmiştir. Şekil 4.8, CAPE molekülü ile boş ve CAPE yüklü misellerin FTIR spektrumlarını göstermektedir. CAPE molekülü, sırasıyla C=O ve C=C bağlarına karşılık gelen 1679 ve 1601 cm^{-1} 'de karakteristik bantlar ve ester bağındaki C-O-C grubuna karşılık gelen 1275 cm^{-1} 'de bir bant sergilemektedir [154]. Hem boş hem de CAPE yüklü misellerin FTIR spektrumlarında ise -CH=N- grubu 1650 cm^{-1} 'de ve eter (C-O-C) grubu 1077 cm^{-1} 'de PAM-b-PEG polimerine benzer bantlar gözlenmektedir. Ayrıca, 2901 ve 2987 cm^{-1} 'deki bantlar ise CH_2 gruplarının alifatik CH gerilmesine işaret etmektedir. CAPE yüklü miselin spektrumuna dikkat edildiğinde CAPE molekülünün karakteristik bantları gözlenmemektedir. Bu durum da CAPE moleküllerinin yüzeyde adsorbe edilmek yerine misellerin çekirdeği içinde enkapsüle edildiğini göstermektedir. Ayrıca, spektrumlar CAPE ve polimer arasında kimyasal etkileşim olduğuna dair hiçbir kanıt göstermemektedir.



Şekil 4. 8 CAPE, boş PAM-b-PEG miseli ve CAPE yüklü PAM-b-PEG miselinin FTIR spektrumları.

Kimyasal ve fizikokimyasal yapısı karakterize edilen misellerin Schiff bazı gruplarına bağlı olarak bozunma davranışları incelemek için CAPE yüklü miselin pH 5,0 ve 7,2’de miselleri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu misel çözeltilerinin, zamana bağlı olarak ışık saçılması spektroskopisiyle ışık saçılması şiddetleri incelenerek bozunma hızı değerlendirilmiştir. Elde edilen ışık saçılması şiddeti değerleri, başlangıç ve son veriler normalize edilerek bağıl ışık saçılması şiddeti oranı değerlerine dönüştürülmüştür [162, 163]. Şekil 4.9, pH 5,0 ve 7,2’deki CAPE yüklü misellerin zamana bağlı ışık saçılımı şiddeti oranlarını göstermektedir. Genel olarak, bu değerler çözelti içindeki nanopartiküllerin boyutu ve konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir [164].



Şekil 4. 9 pH 5,0 ve 7,2'deki CAPE yüklü misellerin zamana bağlı bağlı ışık saçılımı şiddeti oranlarının değişimi.

Şekil 4.9'da görüleceği üzere, pH 5,0'deki misellerin ilk 10 saat içinde hızlı bir şekilde ışık saçılması şiddeti oranlarında azalma gözlenmekte, ardından daha yavaş bir azalışla 120 saat sonunda %2'ye ulaşmıştır. Bu eğilim, misel boyutunda ve/veya miktarında bir azalmayı, dolayısıyla biyobozunmayı göstermektedir.

Nötral pH koşulları altında yaklaşık %50 oranında bir bağıl ışık saçılması şiddeti oranı azalması gözlemlenmiştir. Bu azalma, $-CH=N-$ bağındaki sınırlı bozunma ile daha büyük misel agregatlarının daha küçük yapılara parçalanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Misellerdeki bu ayrışma, çözeltide bulunan tuz iyonlarının stabilize edici etkilerine atfedilebilir; bu durum, belirgin bir biyobozunmadan ziyade, agregatların parçalanmasını ifade etmektedir. Özetle, misellerin zamana bağlı olarak ışık saçılması şiddetleri incelendiğinde asidik ortamın misellerin hızlı bozunmasını büyük ölçüde tetiklediği görülmektedir.

Tez çalışmasının sonraki aşamasında misellerden CAPE salımı incelenmiştir. Öncelikle, misellere yüklenen CAPE miktarı belirlenmiştir. Bu amaçla, indirekt yöntem kullanılmıştır. CAPE yüklü misellerin ilaç yükleme kapasitesi (YK%) %3 olarak bulunmuştur. Bu değer oldukça düşük bir değerdir ancak misellere düşük oranda ilaç yüklenebildiği bu malzemelerin bilinen bir dezavantajıdır [165].

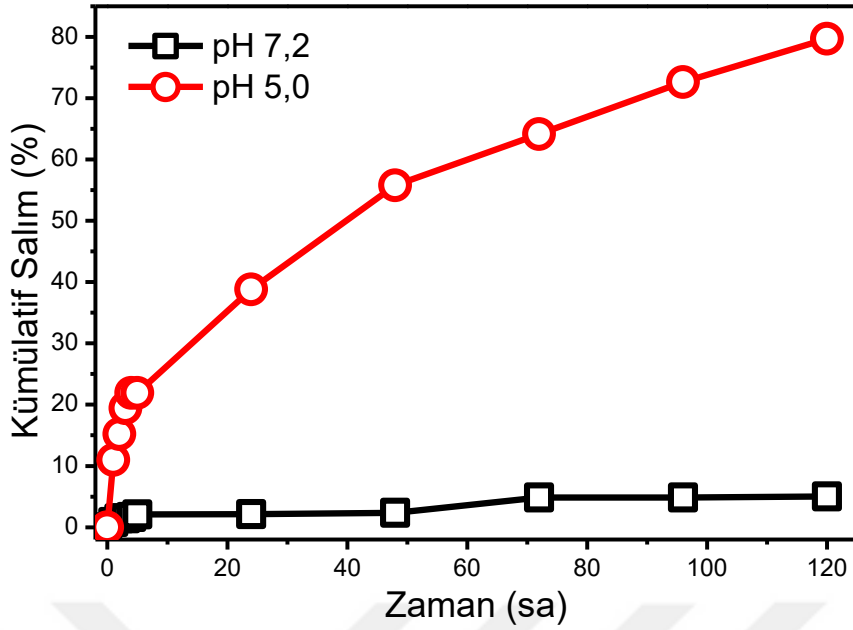
Sonrasında, CAPE yüklü misellerin, pH 7,2 ve 5,0'deki in vitro salım davranışları incelenmiştir. Nötr pH değeri fizyolojik koşulları simüle etmek için seçilirken,

asidik pH değeri ise lizozomal ortamları ve kanserli dokuları taklit etmek için seçilmiştir [166, 167]. CAPE moleküllerinin salım miktarı diyaliz tekniği kullanılarak belirlenmiş ve salınan CAPE'yi tespit etmek için UV spektrometresinden elde edilen kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.4) kullanılmıştır.

Şekil 4.10, CAPE'nin 5 gün boyunca asidik ve nötr pH'da miselden kümülatif salımını göstermektedir. Görüldüğü üzere, fizyolojik pH değerinde miselden CAPE salımı çok düşüktür. İlk 24 saatte enkapsüle CAPE'nin %2,14'ü salınırken 5 gün sonra ilacın sadece %5,04'ü salınmıştır. Düşük kümülatif salım CAPE'nin yüksek hidrofobikliği ve misel çekirdeğinin sıkı paketlenmesiyle ilişkilendirilebilir.

pH, 5,0'a düşürüldüğünde belirgin şekilde farklı bir kümülatif salım profili elde edilmiştir. Kümülatif CAPE salımı pH 5,0'da 24 saat sonra %38,8'e ulaşırken, 5 gün sonra %79,7 kümülatif salım elde edilmiştir. Asidik pH'da salımdaki kayda değer artış doğrudan PAM bloğundaki Schiff bazı (imin) gruplarının ($-CH=N-$) pH'a duyarlı olarak aldehit ve amin gruplarına ayrışarak bozunmasını göstermektedir [8]. CAPE molekülü pH 5,0'te önemli ölçüde hidrofobik PAM bloğunun bozunmasıyla ortama salınmaktadır. Nötr pH değerinde CAPE'nin çok düşük salımı, hidrofobik kargo molekülünü lizozoma veya kanserli dokuya ulaşana kadar koruyabileceğini göstermektedir.

Bu salım profilinin Şekil 4.9'da verilen biyobozunma eğilimiyle karşılaştırıldığında, CAPE salım zamanları ile misel bozunma zamanları arasında güçlü bir uyum olduğunu ortaya koymaktadır.

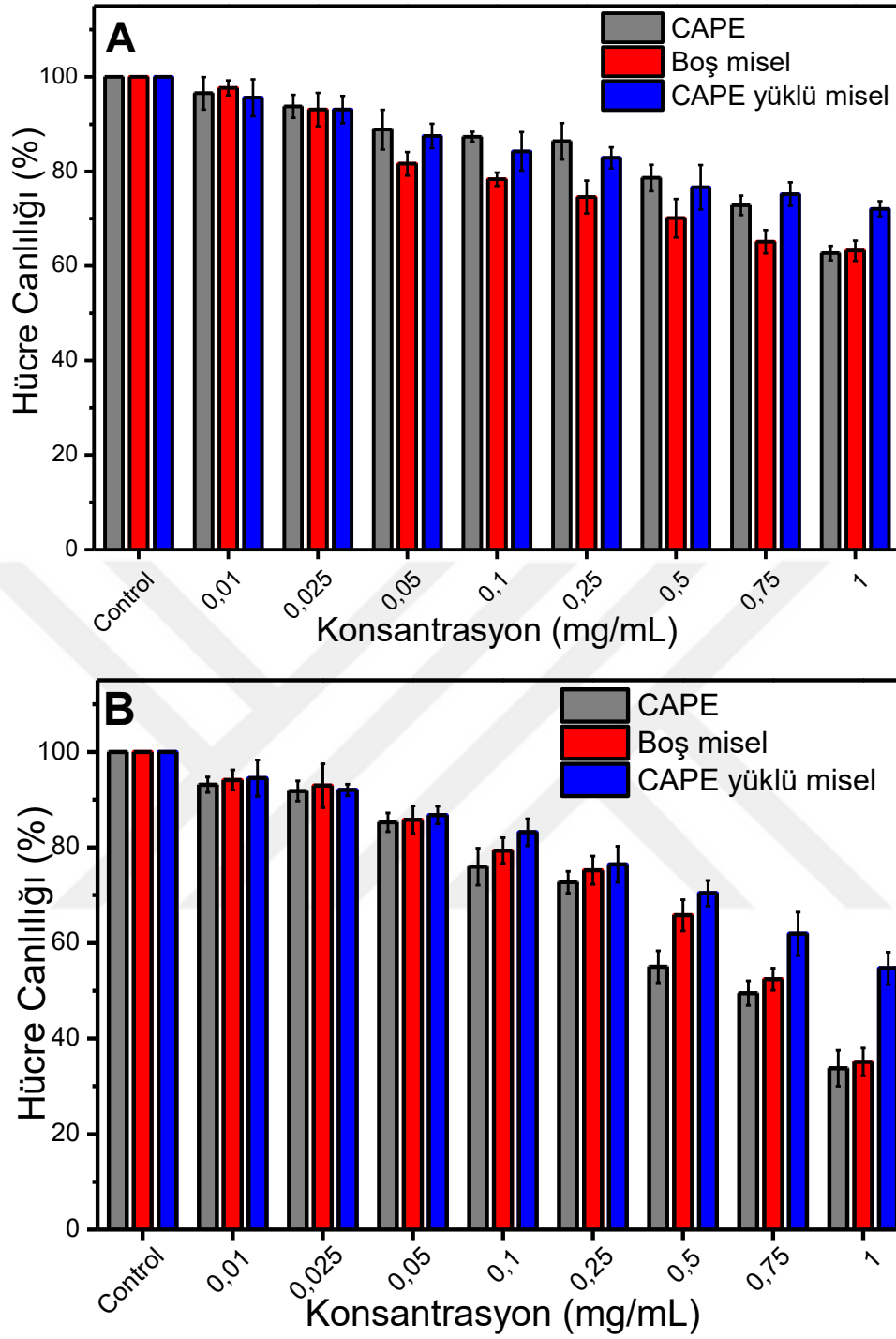


Şekil 4. 10 pH 5,0 ve 7,2'de PAM-b-PEG kopolimer miselinden CAPE molekülünün kümülatif salım profili.

4.4 Hücre Canlılığı Testi

Üretilen malzemelerin HDF hücrelerine karşı sitotoksitesi MTT yöntemi ile incelenmiştir. Şekil 4.11, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra HDF hücrelerinin CAPE, boş misel ve CAPE yüklü misele karşı canlılıklarını göstermektedir. MTT deneyinde, CAPE yüklü misel için kullanılan konsantrasyon, verilen zamanda miselden salınan CAPE konsantrasyonudur. 24 saatlik inkübasyondan sonraki canlılık değerleri incelendiğinde, CAPE yüklü miselin uygulandığı hücrelerde canlılığın hiçbir konsantrasyonda %70'in altına düşmediği görülmektedir. Ancak, CAPE ve boş misel uygulanan hücrelerde canlılık değerlerinin özellikle en yüksek konsantrasyonda %70'in altına düştüğü görülmektedir.

48 saat süren inkübasyon sonrasında hücre canlılıkları incelendiğinde ise, CAPE yüklü misellerin sadece 0,75 ve 1 mg/mL konsantrasyonlarda %70'in altına düştüğü ve 1 mg/mL konsantrasyonda hücrelerin %46'sını öldürdüğü görülmektedir. CAPE ve boş misel ise 48 saat inkübasyon sonrasında sonra hücrelerin %65'inden fazlasını öldürmüştür. Bu üç malzeme toksisite açısından karşılaştırıldığında CAPE>boş miseller>CAPE yüklü miseller olarak bir sıralama yapılabilceği açıktır.



Şekil 4. 11 HDF hücrelerinin CAPE, boş misel ve CAPE yüklü misellerle 24 (A) ve 48 (B) saatlik inkübasyon sonrası canlılık oranları.

Sitotoksosite çalışmasında önemli bir nokta da, CAPE yüklü miselin 48 saatlik inkübasyondan sonra neredeyse tüm konsantrasyonlarda CAPE ve serbest miselden daha biyoyumlu olmasıdır. Bu durum, CAPE ve kopolimerin sıkı bir şekilde bir arada tutularak CAPE'nin salımını engellediği ve sonuç olarak polimer ile CAPE ve miselin hücreyle etkileşimini azalttığı şeklinde yorumlanabilir.

Dolayısıyla misel, CAPE ve polimerin sağlıklı hücrelere olan toksisitesini azaltmaktadır ki bu da kargo molekülünü sağlıklı hücrelere değil sadece beklenen hücrelere iletebilecek bir misel için istenen bir özelliktir.



5 SONUÇ

Kanser dokuları ve inflamasyon bölgeleri gibi hastalıklı dokulara kontrollü ve hedeflemeli ilaç salımı; ilaç etkinliğini arttırmak, kullanılan ilacın dozaj ve kullanım sıklığını azaltmak, hastalarda gözlenen yan etkileri indirmek ve hasta konforunu arttırmak için gerçekleştirilen önemli bir araştırma ve çalışma alanıdır. Tez çalışmasında da bu amaca yönelik olarak pH'a duyarlı olarak ilaç salım potansiyeline sahip özgün bir polimerik misel sistemi üretilmesi amaçlanmıştır. Üretilen PAM-b-PEG blok kopolimeri bu amaca uygun olarak pH'a duyarlı olarak bozunabilen özgün bir blok kopolimerdir.

Gerçekleştirilen tez çalışması sonucunda;

- PAM-b-PEG blok kopolimeri farklı molekül ağırlıklarında sentezlenmiş ve kimyasal yapıları FTIR ve NMR spektroskopileriyle doğrulanmış,
- PAM-b-PEG blok kopolimeri kullanılarak boyutu 200 nm'ye yakın miseller sentezlenebilmiş,
- CAPE molekülü PAM-b-PEG polimerine yüklenerek hidrodinamik çapı 233,8 nm olan negatif yüzey yüküne sahip miseller üretilmiş,
- Üretilen misellerin küresel yapıda olduğu SEM görüntüleri ile gösterilmiş,
- CAPE yüklü misellerinin pH 5,0'te bağl ışık saçılması şiddeti oranını %2'ye düşürecek kadar yüksek oranda bozunurken, pH 7,2'deki misellerin sadece %50 bağl ışık saçılması şiddeti oranına bozunabildiği, yani üretilen misellerin pH'a duyarlı olarak bozunabildiği gösterilmiş,
- CAPE yüklü misellerden pH 7,0'de ilk 24 saatte enkapsüle CAPE'nin %2,14'ü salınırken, 5 gün sonra ilacın sadece %5,04'ü salınmış; pH 5,0'te ise kümülatif CAPE salımı 24 saat sonra %38,8'e ulaşırken, 5 gün sonra %79,7 kümülatif salım elde edilmiş,

- CAPE yüklü PAM-b-PEG misellerinin asidik pH'da nötral pH'a göre belirgin bir şekilde yüksek bozunma ve ilaç salım davranışı gösterdiği ispatlanmış,
- HDF hücrelerine uygulandıklarında CAPE yüklü misellerin, CAPE molekülü ve boş misele göre daha yüksek biyouyumluluğa sahip olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma PAM-b-PEG misellerinin CAPE için uygun bir ilaç dağıtım sistemi olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Üretilen bu misel sisteminin pH-duyarlı olarak kontrollü salım özelliğine ve fizikokimyasal özellikleri sayesinde de pasif hedefli olarak ilaç dağıtım yeteneğine sahip olduğu elde edilen başarılı sonuçlarla gösterilmiştir.

Düşük ilaç yükleme kapasitesi üretilen miselin en önemli eksikliği olarak görülmektedir. Bu nokta, sadece PAM-b-PEG miselleri değil birçok diğer misel için de gelecekteki araştırmalarda ele alınması gereken bir zorluk olmaya devam etmektedir.

Bu araştırma, PAM-b-PEG bazlı özgün ve etkin misel tabanlı ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi için bir temel oluşturmaktadır. Gelecekteki çalışmalarda; bu sisteme hedefleyici moleküller takılarak, farklı amin ve aldehit monomerleri kullanılarak farklı fonksiyonel özellikler (çapraz bağlama, vb.) yapıya kazandırılarak ve biyouyumluluğu artırılarak etkinliği çok daha yüksek ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

- [1] B. D. Ulery, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, "Biomedical applications of biodegradable polymers," *Journal of polymer science Part B: polymer physics*, vol. 49, pp. 832-864, 2011.
- [2] F. Von Burkersroda, L. Schedl, and A. Göpferich, "Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion," *Biomaterials*, vol. 23, pp. 4221-4231, 2002.
- [3] D. J. Hines and D. L. Kaplan, "Poly (lactic-co-glycolic) acid– controlled-release systems: Experimental and modeling insights," *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 30, 2013.
- [4] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Progress in polymer science*, vol. 32, pp. 762-798, 2007.
- [5] X.-m. Sun, J.-x. Xu, J.-b. Tang, M.-h. Sui, and Y.-q. Shen, "Folate-targeted optical and magnetic resonance dualmodality pcl-b-peg micelles for tumor imaging," *Chinese Journal of Polymer Science*, vol. 29, p. 427, 2011.
- [6] T. T. Hoang Thi, E. H. Pilkington, D. H. Nguyen, J. S. Lee, K. D. Park, and N. P. Truong, "The importance of poly (ethylene glycol) alternatives for overcoming peg immunogenicity in drug delivery and bioconjugation," *Polymers*, vol. 12, p. 298, 2020.
- [7] İ. Kaya, E. Kartal, and D. Şenol, "Synthesis and characterization of polyphenol derived from schiff bases containing methyl and carboxyl groups in the structure," *Designed Monomers and Polymers*, vol. 18, pp. 524-535, 2015.
- [8] N. Y. Baran and M. Saçak, "Synthesis, characterization and molecular weight monitoring of a novel schiff base polymer containing phenol group: Thermal stability, conductivity and antimicrobial properties," *Journal of Molecular Structure*, vol. 1146, pp. 104-112, 2017.
- [9] Y. Xin and J. Yuan, "Schiff's base as a stimuli-responsive linker in polymer chemistry," *Polymer Chemistry*, vol. 3, pp. 3045-3055, 2012.
- [10] S. Mura, J. Nicolas, and P. Couvreur, "Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery," *Nature materials*, vol. 12, pp. 991-1003, 2013.
- [11] S. Duan, W. Yuan, F. Wu, and T. Jin, "Polyspermine imidazole-4, 5-imine, a chemically dynamic and biologically responsive carrier system for intracellular delivery of sirna," *Angewandte Chemie*, vol. 32, pp. 8062-8065, 2012.

- [12] S. Dhers, G. Vantomme, and L. Avérous, "A fully bio-based polyimine vitrimer derived from fructose," *Green Chemistry*, vol. 21, pp. 1596-1601, 2019.
- [13] X. Jiang, Y. Ai, Z. Han, Y. You, H. Luo, J. Cui, *et al.*, "Block copolymer-directed synthesis of conjugated polyimine nanospheres with multichambered mesopores," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 221, p. 2000061, 2020.
- [14] S. R. Jameela and A. Jayakrishnan, "Glutaraldehyde cross-linked chitosan microspheres as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: Studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle," *Biomaterials*, vol. 16, pp. 769-775, 1995/07/01/ 1995.
- [15] T. Distler, K. McDonald, S. Heid, E. Karakaya, R. Detsch, and A. R. Boccaccini, "Ionically and enzymatically dual cross-linked oxidized alginate gelatin hydrogels with tunable stiffness and degradation behavior for tissue engineering," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 6, pp. 3899-3914, 2020/07/13 2020.
- [16] L. He, Y. Jiang, C. Tu, G. Li, B. Zhu, C. Jin, *et al.*, "Self-assembled encapsulation systems with pH tunable release property based on reversible covalent bond," *Chemical communications*, vol. 46, pp. 7569-7571, 2010.
- [17] L. Niu, F. Zhu, B. Li, L. Zhao, H. Liang, Y. Yan, *et al.*, "Folate-conjugated and pH-triggered doxorubicin and paclitaxel co-delivery micellar system for targeted anticancer drug delivery," *Materials Chemistry Frontiers*, vol. 2, pp. 1529-1538, 2018.
- [18] B. Ma, W. Zhuang, G. Liu, and Y. Wang, "A biomimetic and pH-sensitive polymeric micelle as carrier for paclitaxel delivery," *Regenerative biomaterials*, vol. 5, pp. 15-24, 2018.
- [19] J. Luan, K. Wu, C. Li, J. Liu, X. Ni, M. Xiao, *et al.*, "pH-sensitive drug delivery system based on hydrophobic modified konjac glucomannan," *Carbohydrate polymers*, vol. 171, pp. 9-17, 2017.
- [20] H. Ozyurt, M. K. Irmak, O. Akyol, and S. Söğüt, "Caffeic acid phenethyl ester changes the indices of oxidative stress in serum of rats with renal ischaemia-reperfusion injury," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 19, pp. 259-263, 2001.
- [21] M. Ozer, H. Parlakpınar, and A. Acet, "Reduction of ischemia–reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)," *Clinical biochemistry*, vol. 37, pp. 702-705, 2004.
- [22] A. Albin and M. B. Sporn, "The tumour microenvironment as a target for chemoprevention," *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, pp. 139-147, 2007.
- [23] L. M. Ferreira, "Cancer metabolism: The Warburg effect today," *Experimental and molecular pathology*, vol. 89, pp. 372-380, 2010.
- [24] S. H. Crayton and A. Tsourkas, "pH-titratable superparamagnetic iron oxide for improved nanoparticle accumulation in acidic tumor microenvironments," *ACS nano*, vol. 5, pp. 9592-9601, 2011.

- [25] P. A. Schornack and R. J. Gillies, "Contributions of cell metabolism and H^+ diffusion to the acidic pH of tumors," *Neoplasia (New York, NY)*, vol. 5, p. 135, 2003.
- [26] A. Riemann, B. Schneider, D. Gündel, C. Stock, O. Thews, and M. Gekle, "Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells," *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, vol. 466, pp. 2127-2138, 2014.
- [27] B. A. Chabner and T. G. Roberts, "Chemotherapy and the war on cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, pp. 65-72, 2005.
- [28] Z. TÜYLEK, "İlaç taşıyıcı sistemler ve nanoteknolojik etkileşim drug delivery systems and nanotechnological interaction," *Bozok Tıp Dergisi*, vol. 7, pp. 89-98, 2017.
- [29] S. K. Sahoo, W. Ma, and V. Labhasetwar, "Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer," *International journal of cancer*, vol. 112, pp. 335-340, 2004.
- [30] X. Wang, J. Li, Y. Wang, L. Koenig, A. Gjyzezi, P. Giannakakou, *et al.*, "A folate receptor-targeting nanoparticle minimizes drug resistance in a human cancer model," *ACS nano*, vol. 5, pp. 6184-6194, 2011.
- [31] K. Cho, X. Wang, S. Nie, and D. M. Shin, "Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer," *Clinical cancer research*, vol. 14, pp. 1310-1316, 2008.
- [32] V. P. Torchilin, "Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives," *Pharmaceutical research*, vol. 24, p. 1, 2007.
- [33] G. S. Kwon and K. Kataoka, "Block copolymer micelles as long-circulating drug vehicles," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pp. 237-245, 2012.
- [34] V. Torchilin, "Tumor delivery of macromolecular drugs based on the epr effect," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, pp. 131-135, 2011/03/18/ 2011.
- [35] G. Pasut, D. Paolino, C. Celia, A. Mero, A. S. Joseph, J. Wolfram, *et al.*, "Polyethylene glycol (peg)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy," *Journal of controlled release*, vol. 199, pp. 106-113, 2015.
- [36] A. B. Balaji, H. Pakalapati, M. Khalid, R. Walvekar, and H. Siddiqui, "Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers," *Biodegradable and biocompatible polymer composites*, vol. 286, pp. 3-32, 2018.
- [37] B. Patel and S. Chakraborty, "Biodegradable polymers: Emerging excipients for the pharmaceutical and medical device industries," *Journal of Excipients & Food Chemicals*, vol. 4, 2013.
- [38] C. Müller, K. Townsend, and J. Matschullat, "Experimental degradation of polymer shopping bags (standard and degradable plastic, and biodegradable) in the gastrointestinal fluids of sea turtles," *Science of the Total Environment*, vol. 416, pp. 464-467, 2012.

- [39] A. George, P. A. Shah, and P. S. Shrivastav, "Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review," *International journal of pharmaceutics*, vol. 561, pp. 244-264, 2019.
- [40] Sonam, H. Chaudhary, V. Arora, K. Kholi, and V. Kumar, "Effect of physicochemical properties of biodegradable polymers on nano drug delivery," *Polymer Reviews*, vol. 53, pp. 546-567, 2013.
- [41] Y.-y. Bei, X.-y. Chen, Y. Liu, J.-y. Xu, W.-j. Wang, Z.-l. Gu, *et al.*, "Novel norcantharidin-loaded liver targeting chitosan nanoparticles to enhance intestinal absorption," *International Journal of Nanomedicine*, pp. 1819-1827, 2012.
- [42] G. Mittal, D. Sahana, V. Bhardwaj, and M. R. Kumar, "Estradiol loaded plga nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo," *Journal of controlled release*, vol. 119, pp. 77-85, 2007.
- [43] S. A. Joshi, S. S. Chavhan, and K. K. Sawant, "Rivastigmine-loaded plga and pbca nanoparticles: Preparation, optimization, characterization, in vitro and pharmacodynamic studies," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 76, pp. 189-199, 2010.
- [44] B. Malaekheh-Nikouei, S. A. Sajadi Tabassi, and M. R. Jaafari, "The effect of different grades of plga on characteristics of microspheres encapsulated with cyclosporine a," *Current Drug Delivery*, vol. 3, pp. 343-349, 2006.
- [45] J. Panyam, D. Williams, A. Dash, D. Leslie-Pelecky, and V. Labhasetwar, "Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from plga/pla nanoparticles," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 93, pp. 1804-1814, 2004.
- [46] R. Barbucci, *Integrated biomaterials science*: Springer Science & Business Media, 2002.
- [47] R. Song, M. Murphy, C. Li, K. Ting, C. Soo, and Z. Zheng, "Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications," *Drug design, development and therapy*, pp. 3117-3145, 2018.
- [48] R. P. Babu, K. O'connor, and R. Seeram, "Current progress on bio-based polymers and their future trends," *Progress in biomaterials*, vol. 2, pp. 1-16, 2013.
- [49] E. Piskin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 6, pp. 775-795, 1995.
- [50] I. C. C. de Moraes Porto, "Polymer biocompatibility," *Polymerization*, vol. 2012, pp. 47-63, 2012.
- [51] C. Costa and P. Souza, "Testes de citotoxicidade em cultura de células," *Metodologia Científica. Ensino e Pesquisa em Odontologia*, pp. 145-160, 2001.
- [52] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 2941-2953, 2008.

- [53] Ş. Y. Güven, "Ortopedik malzemelerin biyouyumlulukları ve mekanik özelliklerine göre seçimi," in *2nd National Design and Manufacturing Congress, Balıkesir*, 2010, pp. 472-484.
- [54] Ş. Güven and H. Çetin, "Metalik biyomalzemeler ve İmplantlar," *SD Ü*, vol. 15, pp. 14-16, 2007.
- [55] A. K. Gür and M. Taşkın, "Metalik biyomalzemeler ve biyouyum," *Fırat Üniversitesi Doğu Araştırmaları Dergisi*, vol. 2, pp. 106-113, 2004.
- [56] Q. Xu, Y. Liu, S. Su, W. Li, C. Chen, and Y. Wu, "Anti-tumor activity of paclitaxel through dual-targeting carrier of cyclic rgd and transferrin conjugated hyperbranched copolymer nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 33, pp. 1627-1639, 2012.
- [57] W. L. Hawkins, "Polymer degradation," in *Polymer degradation and stabilization*, ed: Springer, 1984, pp. 3-34.
- [58] S. Li and M. Vert, "Biodegradation of aliphatic polyesters," in *Degradable polymers: Principles and applications*, ed: Springer, 2002, pp. 71-131.
- [59] U. Edlund and A.-C. Albertsson, "Degradable polymer microspheres for controlled drug delivery," *Degradable aliphatic polyesters*, pp. 67-112, 2002.
- [60] A. Göpferich, "Mechanisms of polymer degradation and erosion," *The biomaterials: silver jubilee compendium*, pp. 117-128, 1996.
- [61] C. Engineer, J. Parikh, and A. Raval, "Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system," *Trends in biomaterials & artificial organs*, vol. 25, 2011.
- [62] J. Tamada and R. Langer, "Erosion kinetics of hydrolytically degradable polymers," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 90, pp. 552-556, 1993.
- [63] G. Winzenburg, C. Schmidt, S. Fuchs, and T. Kissel, "Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 56, pp. 1453-1466, 2004.
- [64] D. H. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers," *Biodegradable polymers as drug delivery systems.*, pp. 1-41, 1990.
- [65] C. Proikakis, N. Mamouzelos, P. Tarantili, and A. Andreopoulos, "Swelling and hydrolytic degradation of poly (d, l-lactic acid) in aqueous solutions," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, pp. 614-619, 2006.
- [66] F. Sabir, H. Kanwal, U. Laraib, and E. Simge, "Functionalized nanoparticles-based polymer nanocomposites: Synthesis, characterizations, and biodegradability aspects," in *Biodegradable and biocompatible polymer nanocomposites*, ed: Elsevier, 2023, pp. 205-240.
- [67] S. Mizrahy and D. Peer, "Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, pp. 2623-2640, 2012.

- [68] M. Vert, S. Li, G. Spenlehauer, and P. Guérin, "Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters," *Journal of materials science: Materials in medicine*, vol. 3, pp. 432-446, 1992.
- [69] J. M. Anderson and M. S. Shive, "Biodegradation and biocompatibility of pla and plga microspheres," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 28, pp. 5-24, 1997.
- [70] M. Houchin and E. Topp, "Chemical degradation of peptides and proteins in plga: A review of reactions and mechanisms," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, pp. 2395-2404, 2008.
- [71] R. S. Labow, Y. Tang, C. B. McCloskey, and J. P. Santerre, "The effect of oxidation on the enzyme-catalyzed hydrolytic biodegradation of poly (urethane) s," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 13, pp. 651-665, 2002.
- [72] A. Kumar, A. Srivastava, I. Y. Galaev, and B. Mattiasson, "Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications," *Progress in polymer science*, vol. 32, pp. 1205-1237, 2007.
- [73] D. Schmaljohann, "Thermo-and ph-responsive polymers in drug delivery," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 58, pp. 1655-1670, 2006.
- [74] S. Sanjari, P. Saraeian, S. E. Haghighi, and A. Alinia-ziazi, "Modeling degradation behavior of biodegradable polymers for medical devices: A comparative review of phenomenological and stochastic approaches," *Journal of Polymers and the Environment*, pp. 1-28, 2024.
- [75] C. Li, Y. Shang, J. Li, and S. Jiang, "Structure/property relationship of semicrystalline polymers during tensile deformation: A molecular dynamics approach," *Colloid and Polymer Science*, vol. 300, pp. 675-689, 2022.
- [76] K. Singh, G. M. Yuvrajsinh, S. Mehra, A. Mishra, and A. Kumar, "Bioionic liquid-assisted transparent sodium alginate- κ -carrageenan-lignin composite films with excellent ultraviolet shielding, antioxidant, and antibacterial properties," *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, vol. 12, pp. 4314-4327, 2024.
- [77] A. K. Anal, "Stimuli-induced pulsatile or triggered release delivery systems for bioactive compounds," *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, vol. 1, pp. 83-90, 2007.
- [78] N. A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, and H. Ichikawa, "Hydrogels in pharmaceutical formulations," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 50, pp. 27-46, 2000.
- [79] H. J. Van der Linden, S. Herber, W. Olthuis, and P. Bergveld, "Stimulus-sensitive hydrogels and their applications in chemical (micro) analysis," *Analyst*, vol. 128, pp. 325-331, 2003.
- [80] S. Lv, Y. Zhang, and H. Tan, "Thermal and thermo-oxidative degradation kinetics and characteristics of poly (lactic acid) and its composites," *Waste Management*, vol. 87, pp. 335-344, 2019.

- [81] H. S. Azevedo and R. L. Reis, "Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate," vol. 1, ed: CRC Press Boca Raton, FL, 2005, pp. 177-201.
- [82] P. Bawa, V. Pillay, Y. E. Choonara, and L. C. Du Toit, "Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery," *Biomedical materials*, vol. 4, p. 022001, 2009.
- [83] E. S. Gil and S. M. Hudson, "Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates," *Progress in polymer science*, vol. 29, pp. 1173-1222, 2004.
- [84] L.-c. Dong and A. S. Hoffman, "A novel approach for preparation of ph-sensitive hydrogels for enteric drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 15, pp. 141-152, 1991.
- [85] K. M. Huh, H. C. Kang, Y. J. Lee, and Y. H. Bae, "Ph-sensitive polymers for drug delivery," *Macromolecular research*, vol. 20, pp. 224-233, 2012.
- [86] W. Kuhn, B. Hargitay, A. Katchalsky, and H. Eisenberg, "Reversible dilation and contraction by changing the state of ionization of high-polymer acid networks," *Nature*, vol. 165, pp. 514-516, 1950.
- [87] B. Luppi, T. Cerchiara, F. Bigucci, I. Orienti, and V. Zecchi, "Ph-sensitive polymeric physical-mixture for possible site-specific delivery of ibuprofen," *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, vol. 55, pp. 199-202, 2003.
- [88] S. Y. Park and Y. H. Bae, "Novel ph-sensitive polymers containing sulfonamide groups," *Macromolecular rapid communications*, vol. 20, pp. 269-273, 1999.
- [89] F. Ofriidam, M. Tarhini, N. Lebaz, É. Gagnière, D. Mangin, and A. Elaissari, "Ph-sensitive polymers: Classification and some fine potential applications," *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 32, pp. 1455-1484, 2021.
- [90] R. Siegel, E. Ward, O. Brawley, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2011," *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 61, 2011.
- [91] A. K. Larsen, A. E. Escargueil, and A. Skladanowski, "Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents," *Pharmacology & therapeutics*, vol. 85, pp. 217-229, 2000.
- [92] Y. Matsumura and H. Maeda, "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs," *Cancer research*, vol. 46, pp. 6387-6392, 1986.
- [93] F. Yuan, M. Leunig, S. K. Huang, D. A. Berk, D. Papahadjopoulos, and R. K. Jain, "Mirovascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft," *Cancer research*, vol. 54, pp. 3352-3356, 1994.
- [94] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy," *Nano-enabled medical applications*, pp. 61-91, 2020.

- [95] M. Meyer and E. Wagner, "Ph-responsive shielding of non-viral gene vectors," *Expert opinion on drug delivery*, vol. 3, pp. 563-571, 2006.
- [96] C. Clawson, L. Ton, S. Aryal, V. Fu, S. Esener, and L. Zhang, "Synthesis and characterization of lipid-polymer hybrid nanoparticles with ph-triggered poly (ethylene glycol) shedding," *Langmuir*, vol. 27, pp. 10556-10561, 2011.
- [97] W. Gao, R. Langer, and O. C. Farokhzad, "Poly (ethylene glycol) with observable shedding," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, pp. 6567-6571, 2010.
- [98] D. Kim, E. S. Lee, K. T. Oh, Z. G. Gao, and Y. H. Bae, "Doxorubicin-loaded polymeric micelle overcomes multidrug resistance of cancer by double-targeting folate receptor and early endosomal ph," *Small*, vol. 4, pp. 2043-2050, 2008.
- [99] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, vol. 75, pp. 1-18, 2010.
- [100] J. Matsumoto, Y. Nakada, K. Sakurai, T. Nakamura, and Y. Takahashi, "Preparation of nanoparticles consisted of poly (l-lactide)-poly (ethylene glycol)-poly (l-lactide) and their evaluation in vitro," *International journal of pharmaceutics*, vol. 185, pp. 93-101, 1999.
- [101] M. L. Hans and A. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 6, pp. 319-327, 2002.
- [102] M. R. Kumar, R. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, and A. Domb, "Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives," *Chemical reviews*, vol. 104, pp. 6017-6084, 2004.
- [103] J. H. Eldridge, C. J. Hammond, J. A. Meulbroek, J. K. Staas, R. M. Gilley, and T. R. Tice, "Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. I. Orally administered biodegradable microspheres target the peyer's patches," *Journal of Controlled Release*, vol. 11, pp. 205-214, 1990.
- [104] Y. B. Patil, S. K. Swaminathan, T. Sadhukha, L. Ma, and J. Panyam, "The use of nanoparticle-mediated targeted gene silencing and drug delivery to overcome tumor drug resistance," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 358-365, 2010.
- [105] D. E. Owens III and N. A. Peppas, "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles," *International journal of pharmaceutics*, vol. 307, pp. 93-102, 2006.
- [106] W. Zhiqing, L. Wei, X. Huibi, and Y. Xiangliang, "Preparation and in vitro studies of stealth pegylated plga nanoparticles as carriers for arsenic trioxide," *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 15, pp. 795-801, 2007.
- [107] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat, "Plga-based nanoparticles: An overview of biomedical applications," *Journal of controlled release*, vol. 161, pp. 505-522, 2012.

- [108] J. K. Vasir and V. Labhasetwar, "Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 29, pp. 4244-4252, 2008.
- [109] A. L. Armstead and B. Li, "Nanomedicine as an emerging approach against intracellular pathogens," *International journal of nanomedicine*, pp. 3281-3293, 2011.
- [110] T. G. Park, "Degradation of poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition," *Biomaterials*, vol. 16, pp. 1123-1130, 1995.
- [111] V. Karavelidis, D. Giliopoulos, E. Karavas, and D. Bikiaris, "Nanoencapsulation of a water soluble drug in biocompatible polyesters. Effect of polyesters melting point and glass transition temperature on drug release behavior," *European journal of pharmaceutical sciences*, vol. 41, pp. 636-643, 2010.
- [112] B. Youan, M.-A. Benoit, B. Baras, and J. Gillard, "Protein-loaded poly (epsilon-caprolactone) microparticles. I. Optimization of the preparation by (water-in-oil)-in water emulsion solvent evaporation," *Journal of microencapsulation*, vol. 16, pp. 587-599, 1999.
- [113] G. Riess, "Micellization of block copolymers," *Progress in polymer science*, vol. 28, pp. 1107-1170, 2003.
- [114] M. Topuzoğulları, "İlaç ve DNA taşıyıcı amfifilik blok kopolimerlerin raft yöntemi ile sentezi ve karakterizasyonu," YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.
- [115] G. Gaucher, M.-H. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J.-C. Leroux, "Block copolymer micelles: Preparation, characterization and application in drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 109, pp. 169-188, 2005.
- [116] C. Allen, D. Maysinger, and A. Eisenberg, "Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 16, pp. 3-27, 1999.
- [117] C. Hoes, W. Potman, W. Van Heeswijk, J. Mud, B. De Grooth, J. Greve, *et al.*, "Optimization of macromolecular prodrugs of the antitumor antibiotic adriamycin," *Journal of Controlled Release*, vol. 2, pp. 205-213, 1985.
- [118] R. Duncan, P. Kopečková-Rejmanová, J. Strohalm, I. Hume, H. Cable, J. Pohl, *et al.*, "Anticancer agents coupled to n-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers. I. Evaluation of daunomycin and puromycin conjugates in vitro," *British journal of cancer*, vol. 55, pp. 165-174, 1987.
- [119] E. Wisse, F. Braet, D. Luo, R. De Zanger, D. Jans, E. Crabbe, *et al.*, "Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver," *Toxicologic pathology*, vol. 24, pp. 100-111, 1996.
- [120] I. Astafieva, X. F. Zhong, and A. Eisenberg, "Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions," *Macromolecules*, vol. 26, pp. 7339-7352, 1993.

- [121] Ö. Topel, B. A. Çakır, L. Budama, and N. Hoda, "Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly (ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering," *Journal of Molecular Liquids*, vol. 177, pp. 40-43, 2013.
- [122] M. Wilhelm, C. L. Zhao, Y. Wang, R. Xu, M. A. Winnik, J. L. Mura, *et al.*, "Poly (styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: A fluorescence probe study," *Macromolecules*, vol. 24, pp. 1033-1040, 1991.
- [123] M. Elsabahy and K. L. Wooley, "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, pp. 2545-2561, 2012.
- [124] P. Galvin, D. Thompson, K. B. Ryan, A. McCarthy, A. C. Moore, C. S. Burke, *et al.*, "Nanoparticle-based drug delivery: Case studies for cancer and cardiovascular applications," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, pp. 389-404, 2012.
- [125] E. Karaca, "Synthesis of new schiff base compounds and identification of their structures," *Journal of Polytechnic-Politeknik Dergisi*, vol. 21, 2018.
- [126] H. Schiff, "Untersuchungen über salicinderivate," *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, vol. 150, pp. 193-200, 1869.
- [127] C. M. da Silva, M. M. Silva, F. S. Reis, A. L. T. Ruiz, J. E. de Carvalho, J. C. Santos, *et al.*, "Studies on free radical scavenging, cancer cell antiproliferation, and calf thymus DNA interaction of schiff bases," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 172, pp. 129-138, 2017.
- [128] H. C. Kolb, M. Finn, and K. B. Sharpless, "Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 40, pp. 2004-2021, 2001.
- [129] S. Carmona, M. R. Jorgensen, S. Kolli, C. Crowther, F. H. Salazar, P. L. Marion, *et al.*, "Controlling hbv replication in vivo by intravenous administration of triggered pegylated sirna-nanoparticles," *Molecular pharmaceutics*, vol. 6, pp. 706-717, 2009.
- [130] İ. Gönül, B. Ay, S. Karaca, O. Y. Saribiyik, E. Yildiz, and S. Serin, "Synthesis of imine bond containing insoluble polymeric ligand and its transition metal complexes, structural characterization and catalytic activity on esterification reaction," *Designed Monomers and Polymers*, vol. 20, pp. 441-448, 2017.
- [131] C. J. Yang and S. A. Jenekhe, "Effects of structure on refractive index of conjugated polyimines," *Chemistry of Materials*, vol. 6, pp. 196-203, 1994.
- [132] S. Dineshkumar, A. Muthusamy, P. Chitra, and S. Anand, "Synthesis, characterization, optical and electrical properties of thermally stable polyazomethines derived from 4, 4'-oxydianiline," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 29, pp. 2605-2621, 2015.

- [133] X. Li, Y. Jiao, and S. Li, "The syntheses, properties and application of new conducting polymers," *European polymer journal*, vol. 27, pp. 1345-1351, 1991.
- [134] I. Jarraya, M. Abid, S. Abid, and R. El Gharbi, "Polyazomethines bearing furan moieties. Solution polycondensation of bis (furanic diamine) s and aromatic dialdehydes," *Journal of Macromolecular Science, Part A*, vol. 50, pp. 931-939, 2013.
- [135] O. Catanescu, M. Grigoras, G. Colotin, A. Dobreanu, N. Hurduc, and C. I. Simionescu, "Synthesis and characterization of some aliphatic–aromatic poly (schiff base) s," *European Polymer Journal*, vol. 37, pp. 2213-2216, 2001.
- [136] O. Thomas, O. Inganäs, and M. R. Andersson, "Synthesis and properties of a soluble conjugated poly (azomethine) with high molecular weight," *Macromolecules*, vol. 31, pp. 2676-2678, 1998.
- [137] M. L. Petrus, R. K. Bouwer, U. Lafont, D. Murthy, R. J. Kist, M. L. Böhm, *et al.*, "Conjugated poly (azomethine) s via simple one-step polycondensation chemistry: Synthesis, thermal and optoelectronic properties," *Polymer Chemistry*, vol. 4, pp. 4182-4191, 2013.
- [138] H.-Y. Lee, Y.-I. Jeong, E. J. Kim, K. D. Lee, S.-H. Choi, Y. J. Kim, *et al.*, "Preparation of caffeic acid phenethyl ester-incorporated nanoparticles and their biological activity," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 104, pp. 144-154, 2015.
- [139] A. İlhan, U. Koltuksuz, S. Ozen, E. Uz, H. Ciralik, and O. Akyol, "The effects of caffeic acid phenethyl ester (cape) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits," *European journal of cardiothoracic surgery*, vol. 16, pp. 458-463, 1999.
- [140] M. R. Fesen, Y. Pommier, F. Leteurtre, S. Hiroguchi, J. Yung, and K. W. Kohn, "Inhibition of hiv-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (cape) and related compounds," *Biochemical pharmacology*, vol. 48, pp. 595-608, 1994.
- [141] G. Sud'Ina, O. Mirzoeva, M. Pushkareva, G. A. Korshunova, N. Sumbatyan, and S. Varfolomeev, "Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties," *FEBS letters*, vol. 329, pp. 21-24, 1993.
- [142] S.-G. Park, D.-Y. Lee, S.-K. Seo, S.-W. Lee, S.-K. Kim, W.-K. Jung, *et al.*, "Evaluation of anti-allergic properties of caffeic acid phenethyl ester in a murine model of systemic anaphylaxis," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 226, pp. 22-29, 2008.
- [143] P. Michaluart, J. L. Masferrer, A. M. Carothers, K. Subbaramaiah, B. S. Zweifel, C. Koboldt, *et al.*, "Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation," *Cancer research*, vol. 59, pp. 2347-2352, 1999.

- [144] M. Kartal, S. Yıldız, S. Kaya, S. Kurucu, and G. Topçu, "Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of anatolia," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 86, pp. 69-73, 2003.
- [145] J. H. Park, J. K. Lee, H. S. Kim, S. T. Chung, J. H. Eom, K. A. Kim, *et al.*, "Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in balb/c mice," *International Immunopharmacology*, vol. 4, pp. 429-436, 2004.
- [146] J. Wu, C. Omene, J. Karkoszka, M. Bosland, J. Eckard, C. B. Klein, *et al.*, "Caffeic acid phenethyl ester (cape), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer," *Cancer letters*, vol. 308, pp. 43-53, 2011.
- [147] H.-F. Liao, Y.-Y. Chen, J.-J. Liu, M.-L. Hsu, H.-J. Shieh, H.-J. Liao, *et al.*, "Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 51, pp. 7907-7912, 2003.
- [148] O. Aldemir and H. Memmedov, "Propolisin bileşenlerinden olan kafeik asit fenil esterinin antiinflamatuar etkileri," *Arıcılık Araştırma Dergisi*, vol. 11, pp. 43-47, 2019.
- [149] S. SON, E. B. Lobkowsky, and B. A. Lewis, "Caffeic acid phenethyl ester (cape): Synthesis and x-ray crystallographic analysis," *Chemical and pharmaceutical bulletin*, vol. 49, pp. 236-238, 2001.
- [150] J. M. Sforcin and V. Bankova, "Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 133, pp. 253-260, 2011.
- [151] S. Derman, "Caffeic acid phenethyl ester loaded plga nanoparticles: Effect of various process parameters on reaction yield, encapsulation efficiency, and particle size," *Journal of Nanomaterials*, vol. 2015, p. 341848, 2015.
- [152] A. L. Carreño, E. Alday, J. Quintero, L. Pérez, D. Valencia, R. Robles-Zepeda, *et al.*, "Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (cape) against oxidative stress," *Journal of functional foods*, vol. 29, pp. 178-184, 2017.
- [153] J.-W. Nah, Y.-W. Paek, Y.-I. Jeong, D.-W. Kim, C.-S. Cho, S.-H. Kim, *et al.*, "Clonazepam release from poly (dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by dialysis method," *Archives of pharmacal research*, vol. 21, pp. 418-422, 1998.
- [154] T. Arasoglu, S. Derman, and B. Mansuroglu, "Comparative evaluation of antibacterial activity of caffeic acid phenethyl ester and plga nanoparticle formulation by different methods," *Nanotechnology*, vol. 27, p. 025103, 2015.
- [155] D. Duranoğlu, D. Uzunoglu, B. Mansuroglu, T. Arasoglu, and S. Derman, "Synthesis of hesperetin-loaded plga nanoparticles by two different experimental design methods and biological evaluation of optimized nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 29, p. 395603, 2018.
- [156] U. D. Kamaci, M. Kamaci, and A. Peksel, "Poly (azomethine-urethane) and zeolite-based composite: Fluorescent biosensor for DNA detection,"

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, vol. 212, pp. 232-239, 2019.

- [157] I. Bekri, H. Gherras, A. Dehbi, and A. Belfedal, "Preparation and characterization of new soluble and thermally stable polyazomethine by polycondensation of thiophene-2, 5-dicarboxaldehyde and ortho-tolidine for optoelectronics," *Polymer Science, Series B*, vol. 65, pp. 487-495, 2023.
- [158] P. Dutta, P. Jain, P. Sen, R. Trivedi, P. Sen, and J. Dutta, "Synthesis and characterization of a novel polyazomethine ether for nlo application," *European polymer journal*, vol. 39, pp. 1007-1011, 2003.
- [159] U. Chitgupi, Y. Qin, and J. F. Lovell, "Targeted nanomaterials for phototherapy," *Nanotheranostics*, vol. 1, pp. 38-58, 2017.
- [160] T. Y. G. B. Bakış, "Nanopartiküler İlaç taşıyıcı sistemlerinin İncelenmesinde kullanılan İn vitro salım."
- [161] Z. He, Y. An, Z. Li, H. Wang, X. Chen, and L. Shi, "Temperature-responsive multilayered micelles formed from the complexation of pnipam-b-p4vp block-copolymer and ps-b-paa core-shell micelles," *Polymer*, vol. 49, pp. 2548-2552, 2008.
- [162] T.-M. De Witte, A. M. Wagner, L. E. Fratila-Apachitei, A. A. Zadpoor, and N. A. Peppas, "Degradable poly (methyl methacrylate)-co-methacrylic acid nanoparticles for controlled delivery of growth factors for bone regeneration," *Tissue Engineering Part A*, vol. 26, pp. 1226-1242, 2020.
- [163] P. Saracoglu, S. Dokuz, T. Ozbek, M. Topuzogullari, and M. M. Ozmen, "Starch nanogels as promising drug nanocarriers in the management of oral bacterial infections," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 88, p. 104973, 2023.
- [164] S. Hoffmann, C. Gorzelanny, B. Moerschbacher, and F. M. Goycoolea, "Physicochemical characterization of fret-labelled chitosan nanocapsules and model degradation studies," *Nanomaterials*, vol. 8, p. 846, 2018.
- [165] S. Kim, Y. Shi, J. Y. Kim, K. Park, and J.-X. Cheng, "Overcoming the barriers in micellar drug delivery: Loading efficiency, in vivo stability, and micelle-cell interaction," *Expert opinion on drug delivery*, vol. 7, pp. 49-62, 2010.
- [166] M. Hosonuma and K. Yoshimura, "Association between ph regulation of the tumor microenvironment and immunological state," *Frontiers in Oncology*, vol. 13, p. 1175563, 2023.
- [167] J. Zeng, O. S. Shirihai, and M. W. Grinstaff, "Modulating lysosomal ph: A molecular and nanoscale materials design perspective," *Journal of life sciences (Westlake Village, Calif.)*, vol. 2, p. 25, 2020.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. N. S. Topuzoğulları, F. Ş. Poyraz, M. Topuzoğulları, and B. Mansuroğlu, “pH-responsive caffeic acid phenethyl ester release from polyazomethine-poly(ethylene glycol) copolymer micelles,” in *Proc. 7th Int. Eurasian Conf. Biol. Chem. Sci. (EurasianBioChem 2024)*, Oct. 2024, pp. 57.

Makaleler

1. N. S. Topuzoğulları, F. Ş. Poyraz, M. Topuzoğulları, and B. Mansuroğlu, “Poly(azomethine) based micelles for delivery of caffeic acid phenethyl ester”, *Polymer (Korea)*, vol. 49, no. 3, pp. 1-8, 2025.