

**KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI İÇİN ENJEKTE EDİLEBİLEN
KİTOSAN KRİYOJEL MİKROKÜRELERİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

DİDEM DEMİR KARAKUŞ

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
AĞUSTOS- 2021**

KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI İÇİN ENJEKTE EDİLEBİLEN KİTOSAN KRİYOJEL MİKROKÜRELERİN GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

DİDEM DEMİR KARAKUŞ
ORCID ID: 0000-0002-2977-2077

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI**

Danışman
Prof. Dr. Nimet KARAGÜLLE
ORCID ID: 0000-0003-3162-0803

**MERSİN
AĞUSTOS- 2021**

ÖZET

KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI İÇİN ENJEKTE EDİLEBİLEN KİTOSAN KRİYOJEL MİKROKÜRELERİN GELİŞTİRİLMESİ

Kontrollü ilaç salım uygulamaları etken maddeyi istenen zamanlarda terapötik doz aralığında salabilen sistemlerdir. Canlı vücuduna implante edilebilen bu sistemlerin taşıması gereken temel özellikler vardır. Biyoyumluluk, mekanik stabilite, bozunur olma, bozunma ürünlerinin toksik olmaması, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermesi gibi özelliklerin yanında implante edilecek malzemenin enjekte edilebilir olması büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda ilaç salım sisteminin birbiri ile bağlantılı bir gözenek yapısı sergilemesi doku rejenerasyonu ya da yeni doku oluşumuna destek sağlayabilecek ilaçların taşınması ve kontrollü salımı için oldukça önemlidir.

Bu kapsamda tez çalışmasında enjekte edilebilir özellikte ve gözenekli yapıda, doku onarımında kullanılmak üzere farklı fizyolojik koşullar için kontrollü ilaç salımı yapabilen mikroküreler geliştirilmiştir. Mikrokürelerin üretiminde enjekte edilebilir özellikte olması için oda koşullarında yağ/su emülsiyon faz oluşturma ve gözenekli bir yapı sergilemesi için kriyojenik koşullarda çapraz bağlama teknikleri birarada kullanılmıştır. Oldukça yeni bir teknik olan kriyojenik jelasyon tekniğinin kullanılması üretilen malzemelerin yenilikçi tarafıdır.

Çalışmanın ilk bölümünde optimum koşullarda kitosan doğal polimeri kullanılarak kriyojel mikroküreler üretilmiş ve temel karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Kimyasal olarak çapraz bağlanan kriyojel mikroküreler, çapraz bağlama ajanı olarak gluteraldehit kullanılarak sentezlenmiştir. Mikrokürelerin kimyasal yapısı, partikül boyutu ve gözeneklilik dağılımını ortaya koyan morfolojik görüntüleri, enjekte edilebilirliği, farklı fizyolojik koşullar için şişme davranışı, şişme kinetiği ve bozunma profilleri incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, karakterizasyon analizleri tamamlanan mikrokürelerin model ilaç olarak hidrofilik (Rhodamine-B) ve hidrofobik (Nile-Red) özellik gösteren boyar maddeler kullanılarak farklı sıcaklık, karıştırma hızı ve boyar madde konsantrasyonuna bağlı olarak ilaç yükleme kapasiteleri belirlenmiştir. Optimum ilaç yükleme parametreleri belirlenen mikrokürelerin yapay mide, yapay bağırsak ve yapay gözyaşı sıvıları içerisinde salım profilleri incelenmiş ve kinetik modelleri belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde fare embriyonik fibroblast (MEF) (CF-1) (ATCC1SCRC-1040™) hücre hattı ile *in vitro* biyoyumluluk testleri yapılmıştır. Mikrokürelerin biyoyumluluğunu test etmek için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolyum bromür analizi ve hücre morfolojisini gözlemlemek için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmıştır. Son olarak, malzemelerin implantasyona dayalı enfeksiyonuna ve biyofilm oluşumuna izin vermemek için, antimikrobiyal özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla, biyolojik aktiviteyi arttırmak için, mikrokürelerin üzerinde gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve biyomedikal uygulamalar için antimikrobiyal özellikleri değerlendirilmiştir. Kitosan mikrokürelerin test edilen antimikrobiyal türler üzerinde, dikkate değer antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve AgNP sentezi ile bu aktivite değerlerinin arttığı görülmüştür.

Yapılan çalışmalar sonucunda, kitosan jel mikrokürelerin sergiledikleri biyobozunur, biyoyumlu ve antimikrobiyal özellikler ile seçilecek hedef bölgeye minimum invazyonlar implante edilerek hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçlar için uygun bir kontrollü salım profili ile doku onarımı uygulamaları için potansiyel bir ürün olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: doku mühendisliği, ilaç salımı, mikroküreler, kitosan, biyoyumluluk

Danışman: Prof. Dr., Nimet Karagülle, Mersin Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF INJECTABLE CHITOSAN CRYOGEL MICROSPHERES FOR CONTROLLED DRUG RELEASE

Controlled drug release applications are systems that can release the active substance in the therapeutic dose range at desired times. These systems, which can be implanted in the living body, have basic properties. In addition to features such as biocompatibility, mechanical stability, degradability, non-toxicity of degradation products, antimicrobial activity against microorganisms, it is of great importance that the material to be implanted is injectable. At the same time, the interconnected pore structure of the drug delivery system is very important for the transport and controlled release of drugs that can support tissue regeneration or new tissue formation.

In this context, injectable and porous microspheres that can controlled release of drugs for different physiological conditions have been developed to be used in tissue repair in the thesis study. In the production of microspheres, oil/water emulsion phase formation at room conditions to be injectable and cryogenic conditions to exhibit a porous structure were used together. The use of the cryogenic gelation technique, which is a fairly new technique, is the innovative side of the produced materials.

In the first part of the study, cryogel microspheres were produced using chitosan natural polymer under optimum conditions and basic characterization analyzes were performed. Chemically crosslinked cryogel microspheres were synthesized using glutaraldehyde as the crosslinking agent. The chemical structure, particle size and porosity distribution of the microspheres, injectability, swelling behavior for different physiological conditions, swelling kinetics and degradation profiles were investigated.

In the second part of the study, the drug loading capacities of the microspheres, whose characterization analyzes were completed, were determined by using hydrophilic (Rhodamine-B) and hydrophobic (Nile-Red) dyestuffs as a model drug, depending on different temperature, mixing speed and initial dyestuff concentration. The release profiles of the microspheres, for which optimum drug loading parameters were determined, were examined in artificial gastric, artificial intestinal and artificial tear fluids and their kinetic models were determined.

In the third part of the study, *in vitro* biocompatibility tests were performed with the mouse embryonic fibroblast (MEF) (CF-1) (ATCC1SCRC-1040™) cell line. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide analysis was used to test the biocompatibility of the microspheres and scanning electron microscopy (SEM) was used to observe the cell morphology.

Finally, the antimicrobial properties of the materials were determined to prevent implantation-based infection and biofilm formation. For this purpose, silver nanoparticles (AgNPs) on microspheres were synthesized *in situ* and characterized to increase biological activity, and their antimicrobial properties were evaluated for biomedical applications. It was observed that chitosan microspheres showed remarkable antimicrobial activity on the tested antimicrobial species and these activity values increased with AgNP synthesis.

As a result of the studies, it has been revealed that the biodegradable, biocompatible and antimicrobial properties of chitosan gel microspheres are a potential product for tissue repair applications with a controlled release profile suitable for both hydrophilic and hydrophobic drugs by implanting minimum invasions into the target area to be selected.

Keywords: tissue engineering, drug release, microspheres, chitosan, biocompatibility.

Advisor: Prof. Dr., Nimet Karagülle, Department of Chemical Engineering, Mersin University, Mersin.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam süresince bana her zaman yol gösteren, akademik hayatım boyunca bilgi birikimi ve tecrübesini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nimet Karagülle'ye en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitelerinde değerli bilgileri ve tecrübeleri ile tezin şekillenmesinde katkıları olan Mersin Üniversitesi Kimya Mühendisliği Öğretim üyelerinden Doç. Dr. Rükan Genç Altürk ve Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Öğretim üyelerinden Doç. Dr. Seval Hale Güler'e teşekkürlerimi sunarım.

Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) 'ne doktora çalışmalarımın yürütülmesinde "2018-1-TP3-2912" nolu projeyle sağladıkları maddi destek için teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmalarım boyunca beraber çalışma fırsatı bulduğum Prof. Dr. Sadin Özdemir'e, Doç. Dr. Furkan Ayaz'a ve Dr. Duran Çekiç'e teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca yanımda olan ve her zaman desteğini hissettiğim değerli dostum Dr. Seda Ceylan'a yardım ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca desteklerini ve yakın ilgilerini gördüğüm arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi İsmail Kutlugün Akbay ve Arş. Gör. Ahmet Güngör'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim sürecimde de yanımda olan, beni her koşulda destekleyen canım aileme; özellikle babam Ercan Demir'e ve hayat arkadaşım, değerli eşim Mehmet Karakuş'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerin en büyüğü doktora eğitim sürecimde dünyaya gelen, yeri geldiğinde çalışmak için zamanından aldığım, her türlü olumsuzlukta yüzümü güldüren, bir tanecik canım kızım Lavin'e...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Geleneksel İlaç Verme Yöntemleri	3
2.2. İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması	4
2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri	6
2.3.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Tarihçesi	6
2.4. İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması	8
2.4.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler	9
2.4.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler	10
2.4.3. Çözücü Kontrollü Sistemler	11
2.4.4. Uyarıcı Kontrollü Sistemler	12
2.5. İlaç Salım Sistemlerinin Modellenmesi	13
2.5.1. Sıfırıncı Derece Kinetik	14
2.5.2. Birinci Derece Kinetik	15
2.5.3. Hixson-Crowell Modeli	16
2.5.4. Higuchi Modeli	16
2.5.5. Korsmeyer-Peppas (Power Law) Modeli	17
2.5.6. Weibull Modeli	18
2.5.7. Hopfenberg Modeli	18
2.5.8. Gompertz Model	19
2.6. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Aranılan Özellikler	19
2.6.1. Biyouyumluluk	19
2.6.2. Biyobozunurluk	20
2.6.3. Uygun Bozunma Hızı	20
2.6.4. Uygun Mekanik Özellik	20
2.6.5. Sterilize Edilebilirlik	21
2.7. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Tasarlanmasında Kullanılan Polimerler	21
2.8. Kitosan	23
2.8.1. Kimyasal Özellikler	24

2.8.2. Bakteriyostatik ve Fungistatik Özellikler	26
2.9. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Mikroküreler	26
2.10. Mikrokürelere İlaç Yüklenmesi/Enkapsülasyonu	28
2.11. Mikroküre Üretim Yöntemleri	28
2.12. Emülsiyon Oluşturma Tekniğinin Esasları	30
2.13. Gözenekli Mikroküreler	32
2.13.1. Kriyojelasyon Yöntemi İle Gözenekli Mikrokürelerin Üretimi	33
2.14. Enjekte Edilebilir Mikroküreler	34
2.15. Literatür Taraması	35
2.16. Doktora Tez Çalışmasının Amacı	38
3. MATERYAL ve YÖNTEM	39
3.1. Materyaller	39
3.2. Cihazlar	39
3.3. Optimizasyon Çalışmaları	40
3.4. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Üretimi	41
3.5. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu	42
3.5.1. Kimyasal Bağ Yapısı	42
3.5.2. Morfolojik Yapı	42
3.5.3. Enjekte Edilebilirlik	43
3.5.4. Farklı Fizyolojik Koşulların Hazırlanması	43
3.5.6. Farklı Fizyolojik Koşullarda Mikrokürelerin Şişme Davranışlarının ve Kinetiklerinin Belirlenmesi	44
3.5.7. Mikrokürelerin Şişme Kinetiğinin Belirlenmesi	44
3.5.8. <i>In vitro</i> Degradasyon	45
3.6. Model İlaçların Seçimi ve Çalışma Grafikleri	45
3.6.1. Hazırlanan mikrokürelere ilaç yüklenmesi	46
3.6.2. Mikrokürelerden İlaç Salımı	47
3.6.3. Salım Kinetiğinin Belirlenmesi	48
3.7. Biyouyumluluk Çalışmaları	48
3.7.1. MTT Analizi	49
3.7.2. Direkt Sitotoksite	49
3.7.3. İndirekt Sitotoksite	49
3.7.4. Hücre Morfoloji Analizi	50
3.8. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	50
3.8.1. Mikrokürelerin AgNP'lerin ile Kaplanması	50
3.8.2. Karakterizasyon Çalışmaları	51
3.8.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi	51
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	53
4.1. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Üretimi	53

4.2. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu	55
4.2.1. Morfolojik Değerlendirme	55
4.2.2. Kimyasal Bağ Yapısı ve Çapraz Bağlanma Reaksiyonu	57
4.2.3. Enjekte Edilebilirlik	59
4.2.4. Farklı Fizyolojik Koşullarda Mikrokürelerin Şişme Davranışlarının Belirlenmesi	61
4.2.5. Mikrokürelerin Şişme Kinetiğinin Belirlenmesi	62
4.2.6. Bozunma Davranışı	64
4.3. İlaç Yükleme Çalışmaları	65
4.4. Mikrokürelerin İlaç Salım Davranışlarının Belirlenmesi	68
4.4.1. Farklı Fizyolojik Koşullar İçin Mikrokürelerden RB Salım Profili ve Salım Mekanizmalarının Belirlenmesi	68
4.4.2. Farklı Fizyolojik Koşullar İçin Mikrokürelerden NR Salım Profili ve Salım Mekanizmalarının Belirlenmesi	74
4.5. Biyouyumluluk Çalışmaları	81
4.5.1. Direkt ve İndirekt Sitotoksite	81
4.5.2. Hücre Morfolojisi	83
4.6. Antimikrobiyal Aktivite	84
4.6.1. AgNP'lerin Kitosan Mikroküreleri Üzerinde Sentezi	85
4.6.2. Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	88
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	98

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. 1950'den günümüze ilaç salım teknolojisinin tarihi [95]	8
Tablo 2. 2. İlaç salım mekanizmalarını tanımlamak için uygulanan kinetik modeller ve modellerde kullanılan matematiksel eşitlikler	13
Tablo 2. 3. Polimerik filmlerde salım üssüne bağlı olarak taşınım mekanizmalarının yorumlanması [15]	17
Tablo 2. 4. Farklı geometriye sahip polimerik salım sistemlerinde salım üssüne bağlı olarak taşınım mekanizmalarının yorumlanması [75]	18
Tablo 2. 5. Mikroküre üretim teknikleri ve çeşitleri	29
Tablo 2. 6. Birbiriyle karışmayan bazı faz bileşenleri ve örnek içerikleri	31
Tablo 2. 7. Hidrojel ve kriyojel matrislerin karşılaştırılması	34
Tablo 3. 1. Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler	39
Tablo 3. 2. Deneylerde kullanılan temel laboratuvar cihazları	40
Tablo 3. 3. Tez çalışması kapsamında salım profillerinin modellenmesinde kullanılan matematiksel eşitlikler	48
Tablo 4. 1. Mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlarda şişme kinetiğine ait kinetik parametreler ve korelasyon katsayısı değerleri	64
Tablo 4. 2. Farklı başlangıç boyar madde konsantrasyonlarının ilaç yükleme kapasitesi üzerine etkisi	66
Tablo 4. 3. Farklı sıcaklıkların ilaç yükleme verimi üzerine etkisi	67
Tablo 4. 4. Farklı çalkalama hızlarının ilaç yükleme verimi üzerine etkisi	68
Tablo 4. 5. Her iki model ilaç için optimum ilaç yükleme kapasitelerinin elde edildiği çalışma parametreleri	68
Tablo 4. 6. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması	71
Tablo 4. 7. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması	71
Tablo 4. 8. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması	74
Tablo 4. 9. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması	77
Tablo 4. 10. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması	79
Tablo 4. 11. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması	81
Tablo 4. 12. Test edilen örneklerin MIC değerleri	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. Klasik salım, sürekli salım ve kontrollü salım sistemleri için zamanla plazma ilaç konsantrasyonlarındaki değişim	4
Şekil 2. 2. İlaç salım sistemlerinin sınıflandırılması	5
Şekil 2. 3. Difüzyon kontrollü sistemleri şematik gösterimi. A) Rezervuar (membranlı) sistem ve B) Matriks (monolitik) sistem.	9
Şekil 2. 4. Difüzyon kontrollü sistemlerin çalışma prensipleri. A) Rezervuar (membranlı) sistem ve B) Matriks (monolitik) sistem.	10
Şekil 2. 5. Kimyasal kontrollü sistemlerin çalışma prensipleri. A) Yığın erozyonlu sistem ve B) Yüzey erozyonlu sistem	11
Şekil 2. 6. Çözücü kontrollü sistemlerin çalışma prensipleri. A) Şişme kontrollü sistem ve B) Ozmotik kontrollü sistem	12
Şekil 2. 7. A) Sıfır dereceli kinetiğin grafiksel gösterimi: f_i , t süresi boyunca çözünen ilacın fraksiyonunu, K_0 ise açılma katsayısı veya görünür çözünme hızını ifade eder. B) İlaç düzeyine karşı sıfır dereceli kontrollü salım profili: a , absorpsiyon fazını; b , eliminasyon aşamasını; MSC , maksimum güvenli konsantrasyonu ve MEC , minimum etkili konsantrasyonu ifade eder.	15
Şekil 2. 8. Birinci derece ilaç salım modelinin grafiksel gösterimi, zamana karşı kümülatif ilaç salımı (%)	16
Şekil 2. 9. A) Hixson-Crowell modeli salım profili, B) Higuchi modeli salım profili	17
Şekil 2. 10. İlaç taşıyıcı sistemlerin üretilmesinde kullanılan doğal ve sentetik temelli polimerler	23
Şekil 2. 11. Kitin ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosanın kimyasal yapıları	25
Şekil 2. 12. Asit içeren ortamda, kitosanın çözünmeye başlamasıyla polimerde mevcut halde bulunan amino gruplarının protanlanması	25
Şekil 2. 13. Polimerik mikrokürelerin oluşumu ve örnek mikroskobik görüntüleri [36]	27
Şekil 2. 14. Farklı ilaç yükleme yöntemlerinin şematik gösterimi	28
Şekil 2. 15. Fazlarına göre emülsiyon tipleri	32
Şekil 2. 16. Kriyojelasyon tekniği basamaklarının şematik gösterimi	33
Şekil 2. 17. Doktora tez çalışmasının üç ana bölümden oluşmuş ve bölümlerin aşamaları	38
Şekil 3. 1. Kitosan mikrokürelerin emülsiyon oluşturma ve kriyojelasyon yöntemlerinin birarada kullanılmasıyla üretimini özetleyen şematik gösterim	42
Şekil 3. 2. Rhodamine-B ve Nile Red boyar maddeleri için elde edilen kalibrasyon çalışma doğruları ve denklemleri	46
Şekil 3. 3. İlaç Yükleme çalışmaları deney düzeneğinin şematik gösterimi	47
Şekil 3. 4. Kitosan mikrokürelerin antimikrobiyal özelliklerini arttırmaya yönelik in situ Ag ⁺ indirgenme reaksiyonuna dayanan yöntemin şematik gösterim	51
Şekil 4. 1. Tez çalışması kapsamında yağda su emülsiyonu ve kriyojenik koşulda çapraz bağlama reaksiyonu birarada yürütülerek kriyojel mikrokürelerin üretilmesinin şematik gösterimi	54
Şekil 4. 2. Üretilen mikrokürelerin petri kabı içerisindeki kuru formda ve enjektör içinde süspansiyon haldeki görüntüsü	54
Şekil 4. 3. A, B) Mikrokürelerin dış morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan optik mikroskop görüntüleri, C) Mikrokürelerin parçacık boyut dağılım grafiği	55
Şekil 4. 4. A) Mikrokürelerin dış morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan SEM mikroskop görüntüleri, B) Tek bir küresel partiküle ait SEM mikroskop görüntüsü,	56
Şekil 4. 5. A, B) Mikrokürelerin iç morfolojik yapısının değerlendirilmesinde kullanılan SEM mikroskop görüntüleri, C) Mikrokürelerin gözenek boyut dağılım grafiği	57
Şekil 4. 6. Kitosan, Span 80 ve ayçiçeği yağına ait FTIR spektrumlar. B) Kitosan kriyojel mikrokürelerin FTIR spektrumu	58
Şekil 4. 7. Kitosan ve glütaraldehit arasında gerçekleşen çapraz bağlanma reaksiyonu	59
Şekil 4. 8. Mikroküre formunda hazırlanan doku iskelelerinin farklı iğne uçlarına sahip enjektörlerden geçme oranı	60

Şekil 4. 9. Mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlardaki şişme değerlerinin zamanla değişimi	62
Şekil 4. 10. Mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlardaki şişme davranışlarına ait $\ln F'$ 'ye karşı $\ln t$ grafiği	63
Şekil 4. 11. Kitosan Kriyojel mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlarda zamana bağlı in vitro bozunma davranışı	65
Şekil 4. 12. Mikrokürelerden farklı fizyolojik ortamlarda zamana (15, 30 min; 1, 8, 16 saat; 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 gün) bağlı RB ilaç salımı	69
Şekil 4. 13. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği grafikleri	70
Şekil 4. 14. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği grafikleri	72
Şekil 4. 15. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği grafikleri	73
Şekil 4. 16. Mikrokürelerden farklı fizyolojik ortamlarda zamana (15, 30 min; 1, 4, 8, 16 saat; 1, 3, 5, 10 ve 15 gün) bağlı NR ilaç salımı	74
Şekil 4. 17. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği grafikleri	76
Şekil 4. 18. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği grafikleri	78
Şekil 4. 19. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği grafikleri	80
Şekil 4. 20. Direkt ve indirekt deneylerin şematik gösterimi	82
Şekil 4. 21. Mikroküre formunda hazırlanan doku iskelelerinin direkt sitotoksosite sonuçları	83
Şekil 4. 22. Mikroküre formunda hazırlanan doku iskelelerinin indirekt sitotoksosite sonuçları	83
Şekil 4. 23. Doku iskelelerine ekilen MEF hücrelerinin 5. gün sonundaki farklı büyütmelerde elde edilen SEM görüntüleri	84
Şekil 4. 24. AgNPs kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerin UV-Vis spektrumları, B: Mikrokürelerin gün ışığı altındaki görüntüleri	86
Şekil 4. 25. Kitosan ve AgNPs kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerinin FTIR spektrumları	86
Şekil 4. 26. Kitosan ve AgNP kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerinin SEM görüntüleri (A, E: CH; B, F: 5Ag-CH; C, G: 10Ag-CH ve D, H: 20Ag-CH). Sarı oklar, mikroküre yüzeyinde oluşan AGNP parçacıklarını göstermektedir.	87
Şekil 4. 27. Kitosan ve AgNPs kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerinin EDX spektrumları (A: CH; B: 5Ag-CH; C: 10Ag-CH ve D: 20Ag-CH).	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma/Simgesi	Tanım
2D	Two dimensional, iki boyutlu
3D	Three dimensional, üç boyutlu
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Ag	Gümüş
AgNP	Gümüş nanopartikül
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CH	Kitosan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBS	Fetal bovine serumu
FDA	Food and Drug Administration, Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre
G	Gauge
GA	Gluteraldehit
MEF	Mouse embryonic fibroblast, fare embriyonik hücreleri
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonu
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
NR	Nile Red
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
PBS	Phosphate buffered saline
RB	Rhodamine B
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SBF	Simulated body fluid, yapay vücut sıvısı
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
Span 80	Sorbitan monooleate
UV-Vis	Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği stratejileri kullanılarak yapay organların geliştirilmesi, dokuların onarılması ve ilaç salım sistemlerinin üretilmesi ile hasarlı doku ve hastalık gibi insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen zorlukların giderilmesinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Üretilen biyomalzemeler arasında özellikle kontrollü ilaç salımı yapabilen, biyouyumluluk, biyobozunurluk, fonksiyonelleşebilme ve mekanik stabilite gibi eşsiz özellikler sergileyebilen ve minimum invazyon ile implantasyonu sağlayabilen malzemeler henüz üretilmemiştir. Bu nedenle konu ile ilgili çalışmalar güncelliğini koruyarak devam etmektedir.

Biyoteknoloji ve kimyadaki ilerlemeler sayesinde, çok çeşitli yeni, daha güçlü ve spesifik ilaçlar üretilmektedir. Ancak, üretilen ilaçların çoğunun düşük çözünürlüğe ve zayıf stabiliteye sahip olmaları nedeniyle, bu ilaçların vücut içerisine dağıtımı için taşıyıcı sistemlerin kullanılmasına ihtiyaç vardır. Nitekim, geliştirilen ilaç dağıtım sistemleri ile ilaç etken madde etkinliğinin optimize edilebilmesi ve yan etkileri en aza indirecek şekilde, gerekli miktarda, doğru zamanda ve vücuttaki uygun konuma terapötik bir ajan sağlanması da mümkün olabilecektir.

Mevcut ilaç salım sistemlerinde ilacın hedef bölgeye belirli bir konsantrasyonda, terapötik doz aralığında ve uzun süreler için belirli zaman aralıklarında kontrollü salımın yapılabilmesi ile ilgili problemler devam etmektedir. Kontrollü salım yapılarak ilaç verme sistemleri, geleneksel dozaj uygulama yöntemleriyle ilişkili birçok zorluğun üstesinden gelmek için geliştirilmeye devam etmektedir. Bu tür sistemler, geleneksel ilaç verme yöntemlerine göre çeşitli avantajlar sunar. İlk olarak, ilaç salım oranları belirli bir uygulamanın ihtiyaçlarına göre uyarlanabilir. İkinci olarak, kontrollü salım sistemleri, vücut tarafından hızla yok edilen ilaçların, özellikle proteinlerin korunmasını sağlar. Son olarak, kontrollü salım sistemleri, sık (örneğin günlük) dozları seyrek (ayda bir veya daha az) enjeksiyonla değiştirerek hasta konforunu ve uyumluluğunu artırabilir. Bununla birlikte, tedavide kullanılan ilaç maddelerinin yan etkisi, bunların yok edilmesi, diğer hücrelerle etkileşimi ve kimyasal yapıları nedeniyle dokulara nüfuz edememe gibi çeşitli faktörler tarafından sınırlandırılması da henüz tam anlamıyla elimine edilmemiştir. Bu nedenle, daha ileri fizyolojik yanıtlar için yeni protokoller tartışılmaktadır; bunların arasında, polimerik malzemeler bu ilerlemelerin çoğunun anahtarı olmuştur. Özellikle, ilaçların hastalara uygulanmasında yeni biyomalzemelerin geliştirilmesi önemli hale gelmiştir. Farklı üretim teknikleri kullanılarak hazırlanabilen bu malzemeler, zaman ve dağıtım kontrollü ilaçların verilmesi için uygun bir araçtır. Kontrollü salım sistemi olarak, ilacı kapsülleyen ve nispeten uzun süreler boyunca kontrollü hızlarda salan polimer temelli diskler, fiberler, boncuklar veya nano/mikropartiküller gibi farklı morfolojik yapı, şekil ve boyularda biyomalzemeler kullanılmaktadır. Bunların arasında biyolojik olarak parçalanabilir polimerik mikroküreler kullanılan en yaygın tiplerden biridir ve çeşitli avantajlara sahiptir. Mikroküreler, küçük moleküller, proteinler ve nükleik asitler dahil

olmak üzere birçok ilaç türünü kapsülleyebilir ve bir şırınga iğnesi ile hastalıklı/hasarlı bölgeye kolayca enjekte edilerek uygulanabilirler. Genellikle biyolojik olarak uyumludurlar, yüksek biyoyararlanım sağlayabilirler ve uzun süreler boyunca sürekli ve kontrollü bir salım yapabilirler. Mikrokürelerin dezavantajları arasında büyük ölçekli üretim ve taşıyacağı ilaç miktarının arttırılma zorluğu ve üretim sırasında ilacın inaktivasyonu yer almaktadır. Mikrokürelerin tasarımı ilaç ve polimerin seçimi kadar hazırlama yönteminin belirlenmesi de elde edilen ürünün özelliklerinin belirlenmesi açısından oldukça önemli bir role sahiptir. İlaç yüklü mikroküresel taneciklerinin hazırlanması için fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal olmak üzere üç ana grupta toplanan çok çeşitli üretim yöntemleri kullanılmaktadır. Mevcut yöntemlerin sahip oldukları dezavantajların üstesinden gelebilmek için, mikroküre üretim süreçleri geleneksel yöntemlerin modifiye edilmesiyle geliştirilmeye devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında, mikroküre üretiminde kullanılan ve geleneksel bir yöntem olan yağda su emülsiyonu ile daha yeni ve dikkat çeken bir yöntem olan kriyojenik koşullarda çapraz bağlama yönteminin bir arada kullanılmasıyla kontrollü ilaç salımına yönelik enjekte edilebilir mikroküreler üretilmiştir. İstenen parçacık çapında ve gözenek yapısında mikrokürelerin hazırlanması araştırılmış, uygun koşullarda üretilen mikroküreler kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılmış ve bu süreçteki gözlemler ve elde edilen veriler sunularak değerlendirilmiştir. İlaç yükleme kapasiteleri ve salım profilleri belirlenen mikrokürelerin, ilaç taşıyıcı sistemler olarak canlı vücudunda kullanılma potansiyelinin ortaya konması için biyouyumluluk ve biyolojik aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda; bu tez metninin başlangıç bölümlerinde kontrollü ilaç salım sistemleri, salım mekanizmaları, kullanılan polimerler, mikroküreler ve salım verilerinin modellenmesi hakkında genel bilgiler derlenmiştir. Daha sonraki bölümlerde ise kullanılan üretim ve analiz yöntemleri ayrıntılı olarak açıklanmış, elde edilen deneysel sonuçlar değerlendirilmiş ve tartışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Geleneksel İlaç Verme Yöntemleri

Geleneksel ilaç verme yöntemleri; ilacın haplar, kapsüller, doğrudan hastanın koluna iğne enjekte edilerek (intravenöz infüzyonlar), aerosoller, vb. şeklinde periyodik olarak uygulanmasını içerir. Bu yöntemlerin ana dezavantajı, bu tür bir uygulamanın hem kontrolsüz hem de hedeflenmemiş olmasıdır. Detaylı bir şekilde açıklanacak olursa; seçilen ilaç hedef bölgeye ulaşana kadar kan dolaşımı ile vücuda dağıtılır ve bu da vücudun başka bir yerinde toksik seviyelerin oluşma olasılığına yol açar. İlaçların bu şekilde uygulanması, başlangıçta keskin bir konsantrasyon tepe noktasına ve ardından metabolizma ve atılım nedeniyle bir düşüşe neden olur. Bunun bir sonucu olarak, terapötik dozu muhafaza etmek için, maliyetli ve toksisiteye bağlı yan etki riskini artıran ikinci bir dozun uygulanması gerekir. Bu hem hastanın iyileşme süreci hem de maliyet açısından istenmeyen bir durumdur.

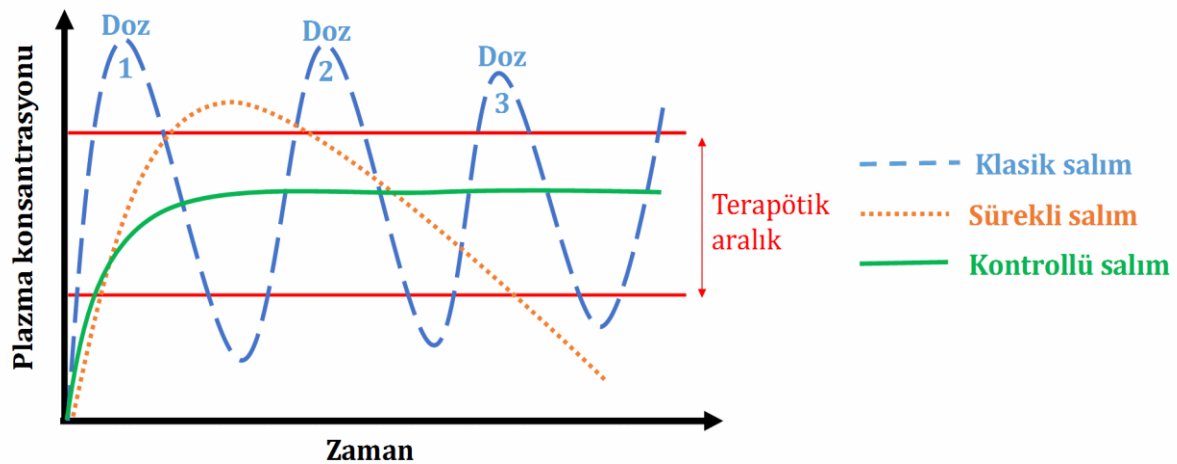
Son yıllarda salım gelişen teknoloji ile birlikte etken maddenin dozunu azaltan, dozlama aralığını uzatan, yan ve toksik etkilerden arındıran, etkin maddeyi hedef bölgeye ulaştıran kontrollü ve/veya hedefli salım sunan alternatif ilaç taşıma sistemleri üretilmiştir [1]. Böylelikle kanda bulunan ilaç etken madde konsantrasyonu istenilen terapötik düzeyde sabit tutularak vücut içindeki etken maddenin eliminasyonu azaltılmış ve ilaçtan elde edilecek olan fayda arttırılmıştır [2].

Kontrollü ilaç salımının geleneksel ilaç verme yöntemlerine göre sahip olduğu avantajları şöyle sıralayabiliriz:

- Hastada uzun süre ve uygun farmakolojik cevap sağlayan sürekli etken madde terapötik kan düzeyleri sağlanır. Yani, tedavi edici oranda ilaç düzeyi sürekli korunur
- Dozların sayısı ve sıklığı azalır.
- Daha az ilaç kullanılır ve bunun bir sonucu olarak sağlık harcamaları azalır.
- Kullanılan toplam etken madde miktarı azalır.
- Kronik ilaç kullanımının neden olabileceği etken maddenin birikimini minimuma indirir.
- Yüksek dozların kullanılmamasıyla hastada oluşabilecek yan etkilerin şiddeti ve sıklığı azalır.
- Protein ve peptid yapıdaki ilaçlar gibi kısa yarılanma ömrüne sahip ilaçlar için ilaç yönetimini kolaylaştırır.
- Sık uygulamadan kaynaklanan psikolojik rahatsızlıktan kaçınılır.
- Ekonomik avantaj sağlar.

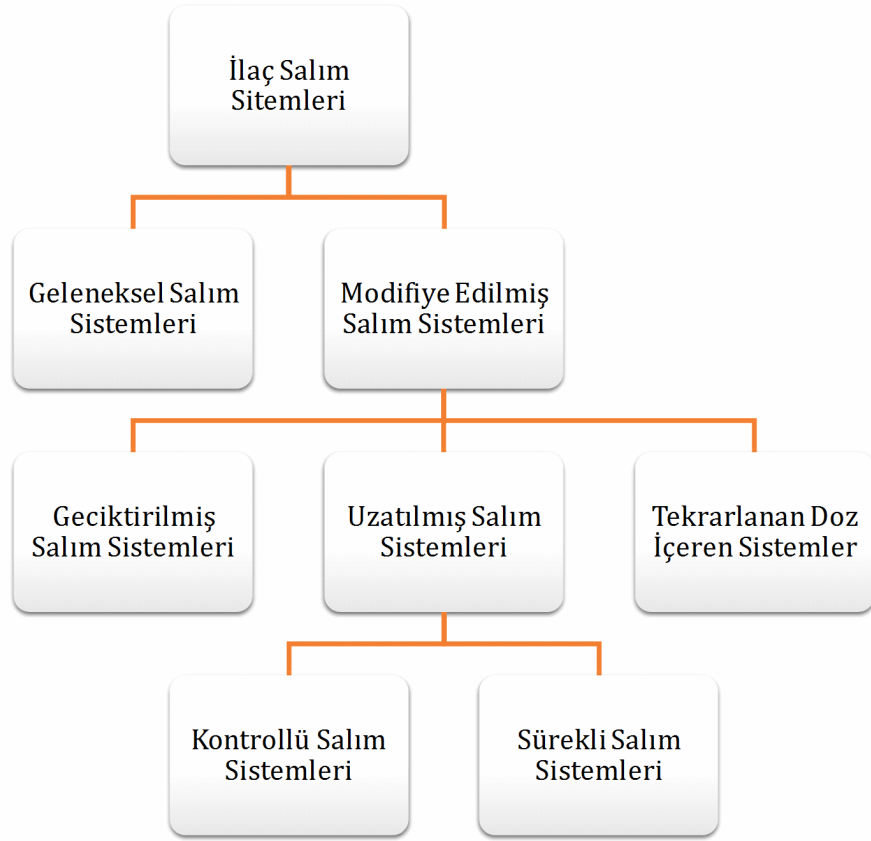
2.2. İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

Klasik (geleneksel, konvansiyonel) dozaj şekilleri, hızlı ve tam bir sistemik emilim sağlayabilmek için etkin maddeyi hızlı salacak şekilde tasarlanan sistemlerdir. Salım sistemi, ilacı çevreleyen tablet ve kapsül gibi çeşitli kaplamalarla ya da ilacın sıkıştırılarak pellet haline getirilmesi ile sağlanabilir. Mide-bağırsak kanalındaki hastalıklar için ilacın akut verilmesi veya ilacın hızlı bir şekilde verilmesini gerektiren enfeksiyonlar gibi durumlar için arzu edilir [3]. Ancak bu tip dozaj şekillerinin uygulanması ile sık ve tekrarlanan dozların verilmesi, etkin madde konsantrasyonunun etkili düzeyin altına düşmesi veya toksik düzeyin üstüne çıkması ve buna bağlı olarak da yan etkilerin veya yan etki şiddetinin artması gibi bazı sorunları ortaya çıkarmaktadır. Bu sistemlerde ilaç alındığı an kandaki ilaç konsantrasyonu yükselir, ardından zirve yapar ve azalır. Her ilacın üzerinde toksik olduğu ve altında etkisiz olduğu bir plazma konsantrasyon seviyesi olduğundan, belirli bir zamanda bir hastadaki plazma ilaç konsantrasyonu, öngörülen rutine uyuma bağlıdır. Bunun tersine, kontrollü salım sistemlerinde, ilaç salım hızı, ilaç eliminasyon hızı ile eşleşir. Bu nedenle, ilaç konsantrasyonu daha uzun süre terapötik aralıkta kalmaktadır. Böylelikle bu tür uzatılmış salım sistemleri sayesinde, etkin maddeyi hemen salan dozaj şekillerine göre, daha uzun sürede salım sağlanarak sistemik emilim ve etkin maddenin biyolojik etkinliğinin uzatılması hedeflenmektedir. Geleneksel salım sistemlerine kıyasla bu sistemler, maksimum ilaç etkinliği, minimum yan etkiler ve kronik dozlama ve ilaç seviyesi dalgalanması ile azaltılmış ilaç birikimi dahil olmak üzere birçok avantaj sağlar [4]. Konvansiyonel, sürekli ve kontrollü salım sistemleri için plazma ilaç konsantrasyonu profilleri Şekil 2.1'de görülmektedir.



Şekil 2. 1. Klasik salım, sürekli salım ve kontrollü salım sistemleri için zamanla plazma ilaç konsantrasyonlarındaki değişim

İlaç salım sistemleri, kontrollü salım sistemlerinden önce farklı isimlerle ifade edilmiştir. Geleneksel salım sistemleri haricinde, aralarında küçük farklar bulunmasına karşın, etken maddeyi daha yavaş salma özelliği bakımından ortak özelliğe sahiptirler. Genel olarak modifiye edilmiş ilaç salım sistemleri olarak adlandırılırlar. Şekil 2.2’de günümüze kadar uygulanan ilaç salım sistemleri toplu olarak listelenmiştir.



Şekil 2. 2. İlaç salım sistemlerinin sınıflandırılması

Geciktirilmiş salım sistemleri, ilacın belirli bir bölgede ve belirlenmiş koşullarda salımını kapsamaktadır. Örneğin mide sıvısından ilacı korumak için etken madde mide pH'ına duyarlı olup intestinal alanda salım yapabilen, genelde enterik kaplı halde hazırlanan salım sistemleridir.

Tekrarlanan doz içeren sistemler ise etken maddenin tek dozaj halinde ve birden fazla dozunu barındırdığı belirli zaman aralıklarında tek dozluk salımının gerçekleştiği sistemlerdir. Kullanım açısından büyük bir kolaylık sağlayan sistemlerdir.

Uzatılmış salım sistemleri, klasik dozaj formları ile karşılaştırıldığında dozlama sıklığının en az iki defa azalmasına imkan veren sistemlerdir. Kontrollü ve sürekli salım sistemlerini içermektedir. Kontrollü salım sistemleri; salım hızları önceden planlanabilen ve sıfırıncı derece kinetikle etkin madde salabilen sistemlerken, sürekli salım sistemleri; etkin maddenin plazma veya doku düzeyini konvansiyonel dozaj formlarına oranla çok daha uzun süre devam ettirebilen

sistemlerdir. Ancak sürekli salım sistemi bulunduğu ortam şartlarından etkilenebildiği için salım mekanizmasını önceden belirleyebilmek güçtür. Genelde salım hızı birinci derece kinetikle uyumludur.

2.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

İlaç endüstrisi son on yılda yeni kimyasal bileşenlerin bulunması ve çok sayıda biyolojik olarak aktif bileşiğin hızlı bir şekilde tanınmasına izin veren kombinatoryal (bütünleştirici) kimya, genomik ve proteomik gibi alanlardaki gelişmeler nedeniyle köklü bir dönüşüm geçirmiştir. Mevcut ilaç tedavilerinde karşılaşılan temel zorluk, daha güçlü ilaçlar bulmak yerine daha çok bu ilaçları gerekli hızda gereken yere ulaştırılması için gelişmiş yollar bulmaktır. Bu yaklaşımla ilaç dozunu minimuma indirmek, dozlama aralığını uzatmak, hastanın yan ve zararlı etkilerden etkilenmemesini sağlayarak yaşam kalitesini arttırmak amaçlanmaktadır. Tüm bu süreçte ilaç salım sistemleri özel bir yere sahiptir [5]. Sağlamış olduğu avantajlar nedeniyle, ilaç salım sistemleri ile ilgili yapılan çalışmalar artmış ve kardiyoloji, oftalmoloji, endokrinoloji, onkoloji ve immünoloji gibi tıbbın hemen her dalında etkili olduğu görülerek önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin genel bir tanımı yapılacak olursa; tedavi için gerekli olan etkin maddenin salım hızını kontrol ederek hedef hücreye, dokuya ya da organa ulaştıran sistemler olarak ifade edilebilir [3]. Bir başka deyişle, kontrollü salım sistemleri ilaç taşıyabilen ve taşıdıkları ilacı istenilen hız ve sürede belirlenen bölgede salabilen uygulama şekilleridir.

2.3.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Tarihçesi

En eski zamanlardan beri, insanlar ilaçları vücutlarına almanın yollarını aramışlardır. Bu süreç şifalı bitkilerin yaprak ve köklerinin çiğnenmesi ile başlamış ve daha güvenilir dozaj formlara doğru gelişmiştir. 1950'li yıllardan önce, tüm ilaçlar, herhangi bir salım kinetiğini kontrol etme yeteneği olmaksızın, suyla temas ettikten hemen sonra yüklenmiş ilacı salan hap veya kapsül formülasyonları halinde uygulanırdı. 1952'de Smith Klein Beecham tarafından ilaç salım kinetiğini kontrol edebilen ve 12 saatlik etkinlik elde edebilen ilk sürekli salım formülasyonu piyasaya sürüldü. Spansules® adı verilen ve bu alandaki ilk ticari ürün olarak bilinen bu sistem ile oral yolla alınan ilaçların etki süresinin uzatılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada ilaç etrafında çeşitli kalınlıklarda kaplama yapılarak ilacın salım süresinin değiştirilebildiği gösterilmiştir [6].

1950'li yıllarda başlayıp günümüze kadar geliştirilerek devam eden kontrollü ilaç salım sistemlerinin tarihçesi Tablo 2.1'de sunulmuştur [6]. İlaç salım mekanizmalarının temel anlayışı 1950'den 1980'e kadar olan ilk neslin gelişimi sırasında elde edilmiştir. Bu dönemde üretilen oral

ve transdermal (deri-geçişli) salım formülasyonlarının geliştirilmesini hızlandıran dört farklı ilaç salım mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalardan en sıklıkla kullanılanları bozunma ve difüzyon kontrollü sistemlerdir. Ozmotik basınca dayalı formülasyonlar geçici bir popülerlik kazanmış, ancak yine de ozmotik basınç kontrollü ürün sayısı, diğer formülasyonlara göre oldukça az kalmıştır. İyon değiştirme mekanizması ise difüzyon kontrollü mekanizma ile birleştirilmeden faydalı olmamıştır. Oral uygulama, en uygun ilaç uygulama şekli olduğundan, bu yoldan verilen salım formülasyonları günümüzde de çalışılmaya ve geliştirilmeye devam etmektedir.

1980'lerden 2010'lara kadar olan ve ikinci nesil olarak adlandırılan çalışmalarda özellikle sıfırıncı dereceden salım sistemlerinin geliştirilmesine odaklanıldı. Araştırmacılar, sıfırıncı derece salım kinetiğine sahip dağıtım sistemlerinin, kandaki sabit ilaç konsantrasyonunu koruyacakları için daha üstün olacaklarını düşündüler. Ancak, bu dönemde üretilen klinik ürünlerin birinci nesil ile kıyaslandığında daha az başarılı olduğu görülmüştür. Bunun nedenleri, bu nesilde geliştirilen teknolojilerin daha zor formülasyonlarla uğraşmasıdır. Örneğin, biyolojik olarak parçalanabilen poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) enjekte edilebilir salım sistemleri, peptit ve protein ilaçlarını bir ay veya daha uzun bir sürede kontrollü olarak salmak üzere tasarlanmıştır. Ancak, çoğu ürün, genellikle bir veya iki günde toplam ilacın yarısını salarak ilk ani salımı kontrol etmekte zorlanmıştır [7]. Yine bu nesilde, insülin salımı için pulmoner salım sistemleri geliştirilmiş, ancak gerektiğinden birkaç kat daha fazla ilaç verilmesi diğer faktörlerle birleştğinde beklenmedik yan etkilere yol açarak ürünün piyasadan çekilmesine neden oldu [8].

İkinci nesilde, çevresel faktörlerdeki değişikliklere (pH, sıcaklık, glikoz seviyesi, vb.) cevap verebilen "akıllı" polimerler ve hidrojeller olarak adlandırılan farklı ilaç salım sistemleri de geliştirildi. Ayrıca, biyolojik olarak parçalanabilir mikropartiküller, katı implantlar ve yerinde jel oluşturu implantlar da peptidler ve proteinlerin salımı için kullanıldı. 2. neslin son on yılı ise nanoteknoloji tabanlı ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesiyle devam etmiştir [9].

Geçen altmış yılda ilaç salım teknolojilerindeki kayda değer ilerlemelere rağmen, daha iyi salım sistemleri ve daha yeni teknolojiler geliştirmek için hala aşılması gereken birçok engel söz konusudur. Mevcut engellerin aşılması amacıyla günümüzü de kapsayan üçüncü nesil ile beraber en az dört farklı modüle edilmiş ilaç salım sistemi geliştirilmiştir. Bunlar açma-kapama özelliği olan glikoza duyarlı insülin salımı, antikanser ajanlarının veya siRNA'nın tümör hücrelerine hedeflenmiş salımı, 6 aydan bir yıla kadar değişen uzun süreli ilaç salımı yapabilen sistemler ve *in vivo* farmakokinetik profilleri tahmin edebilen *in vitro* salım sistemleridir [8].

Bu tür biyolojik engellerin üstesinden gelmek için yeni yaklaşımlar veya yollar bulmak, üçüncü nesil dağıtım sistemlerinin başarısının anahtarı olacaktır.

Tablo 2. 1. 1950'den günümüze ilaç salım teknolojisinin tarihi [4]

1. Nesil (1950-1980) Kontrollü salımın temelleri	2. Nesil (1980-2010) Akıllı ilaç taşıyıcı sistemler	3. Nesil (2010-2040) Modüle sistemler
Oral yolla salım • Günde bir kere, günde iki kere	Transdermal salım • Sıfırıncı dereceden salım	Az çözünen ilaçların salımı • Toksik olmayan yardımcı
Transdermal salım • Günde bir kere, haftada bir kere	Peptid ve protein salımı • Pulmoner salım • Biyobozunur polimerlerin kullanımı	Peptid ve protein salımı • 6 aydan fazla salım süresi • Salım kinetiğinin kontrolü • Non-invaziv salım
İlaç salım mekanizmaları • Bozunma • Difüzyon • Ozmos • İyon değişimi	Akıllı polimerler ve hidrojeller • Çevreye duyarlı • Kendi kendine salım yapabilen (sadece <i>in vitro</i>)	Akıllı polimerler ve hidrojeller • Sinyale özgü salım • Hızlı cevap kinetiği (<i>in vivo</i>)
	Nanopartiküller • Tümöre hedefli salım sistemleri • Gen salım çalışmaları	Hedeflenen salım sistemleri • Hedef olmayan hücrelere toksik olmama • Kan-beyin bariyerini aşma

2.4. İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

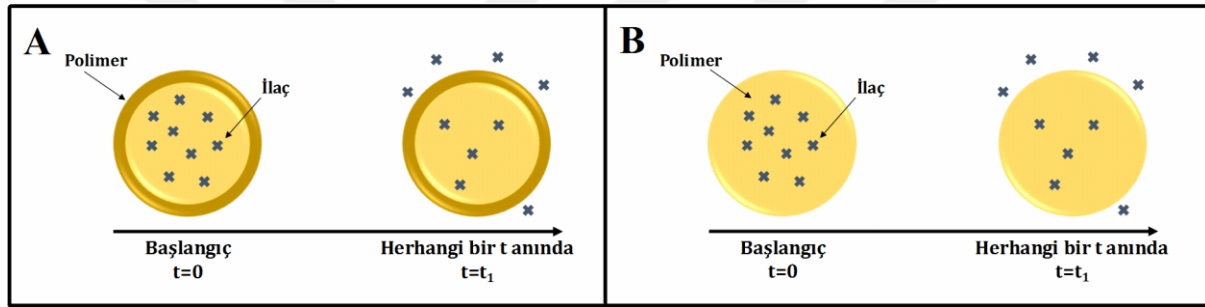
İlaç taşıyıcı sistemler, etkin maddenin/ilacın açığa çıkış mekanizmalarına göre farklı sınıflarda gruplandırılmaktadırlar. İlaç salımı; şişme, ilaç çözünmesi, ilaç difüzyonu gibi mekanizmalar veya bunların kombinasyonları ile kontrol edilebilir. Kullanılan salım sisteminin kimyasal bileşimi, mekanik özellikleri, morfolojik yapısı ve geometrisi, sonuçta ortaya çıkan yönetim süreçlerini belirlemekte etkilidir. Salım mekanizmasına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir.

- Difüzyon kontrollü sistemler
 - Membran sistemler
 - Matriks sistemler
- Kimyasal kontrollü sistemler
 - Yığın erozyonlu sistemler
 - Yüzey erozyonlu sistemler
- Çözücü kontrollü sistemler
 - Şişme kontrollü sistemler
 - Ozmotik kontrollü sistemler

- Uyarı kontrollü sistemler
 - İç uyaranlar (sıcaklık, pH, iyonik güç, ses ve elektrik)
 - Dış uyaranlar (manyetik alan)

2.4.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler

Difüzyon, birçok kontrollü salım sisteminin çok önemli bir bileşenidir. Difüzyon kontrollü sistemlerin temeli ilaç moleküllerinin salımının bir polimer zar veya bir polimer matris içinden yayılması ile oluşmaktadır. Bu sistemler rezervuar (membranlı) ve matris (monolitik) olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.3). Matris sistemde ilaç polimer matris içine dağılmışken, rezervuar sistemde ilaç suda çözünmeyen polimerik bir zarla çevrili bir çekirdek görünümündedir. Salım, ilaç moleküllerinin ya mikro gözeneklerden ya da polimer zarından difüzyonu yoluyla gerçekleşir. Difüzyon, ilaç moleküllerinin boyutuna ve polimer zincirleri arasındaki boşluğa bağlıdır.

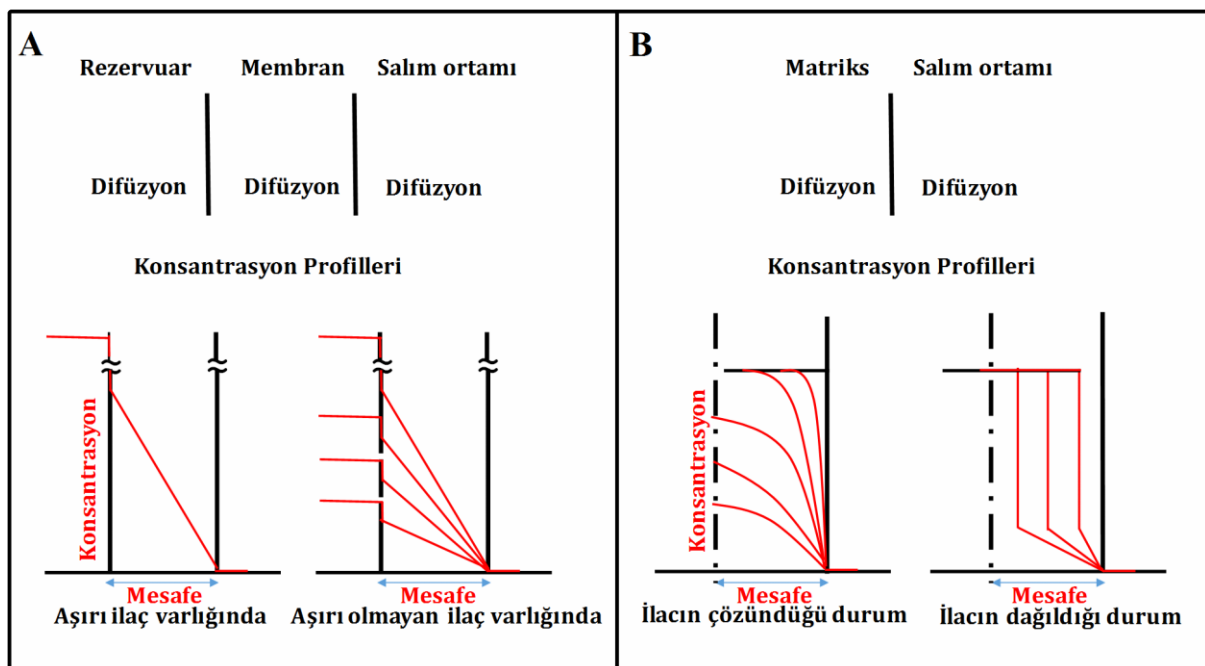


Şekil 2. 3. Difüzyon kontrollü sistemleri şematik gösterimi. A) Rezervuar (membranlı) sistem ve B) Matris (monolitik) sistem.

İlaç moleküllerinin rezervuar ve matris sistemlerden yayılımı sırasındaki temel adımlar Şekil 2.4'de gösterilmektedir. Rezervuar sistemler için difüzyon; rezervuar taşıyıcı sıvısı ve membran arasında çözünme, membrandan difüzyon, membran ve salım ortamı arasındaki bölme ve son olarak sistem yüzeyinden uzağa taşınmadır. Rezervuar fazla miktarda aktif madde içeriyorsa, Şekil 2.4A'da gösterildiği gibi bir kararlı durum konsantrasyon profili korunabilir. Bununla birlikte, rezervuarın tükenmesinden sonra, konsantrasyon profili, Şekil 2.4B'de gösterilen sözde kararlı durumda veya kararsız bir şekilde değişecektir [10].

İlaç moleküllerinin monolitik bir sistemden salımı sırasında gerçekleşen ilk adım, aktif maddenin ayrı bir faz olarak dağılmasına veya matris (polimer) içinde çözünmesine bağlı olarak değişir. Matris içinde çözülürse, ilgili adımlar matrisin yüzeyine difüzyon, matris ile elüsyon ortamı arasında bölme ve cihaz yüzeyinden uzağa taşınmadır (Şekil 2.3A). Aktif madde ayrı bir faz olarak dağıtılırsa, yüzeye yayılmadan önce matris sürekliliği içinde çözünmesi gerekir (Şekil 2.3B). Bu, "çözelti-yayılma" mekanizması olarak adlandırılır.

Her iki tip cihazdaki hız kontrol adımı, polimer içindeki difüzyondur, ancak genel salım hızının kendisi diğer adımlardan etkilenir. Önceki paragraflarda açıklanan adımlar, aktif maddenin moleküllerinin polimer sürekliliği boyunca yayıldığını varsayar. Bununla birlikte, zar veya matrisin gözenekli olduğu ve gözeneklerin elüsyon ortamının sıvısı tarafından nüfuz ettiği durumlar olabilir. Bu durumlarda, salım, bu sıvıda çözünme ve difüzyonla gerçekleşir. Bununla birlikte, serbest bırakma mekanizmasındaki temel adımlar aynı kalır. Rezervuar ve monolitik tip cihazlar öncelikli olarak difüzyon kontrollü olarak sınıflandırılan cihazlar olsa da, polimerler yoluyla difüzyon, diğer cihazlarda veya sistemlerde de, örneğin şişme kontrollü veya aşınabilen sistemlerde önemli bir rol oynar. Bu sistemlerin modifikasyonu veya tasarımı, polimerik malzemelerdeki difüzyonun kimyasal ve fiziksel özelliklerinin anlaşılmasını gerektirir [11].



Şekil 2. 4. Difüzyon kontrollü sistemlerin çalışma prensipleri. A) Rezervuar (membranlı) sistem ve B) Matriks (monolitik) sistem.

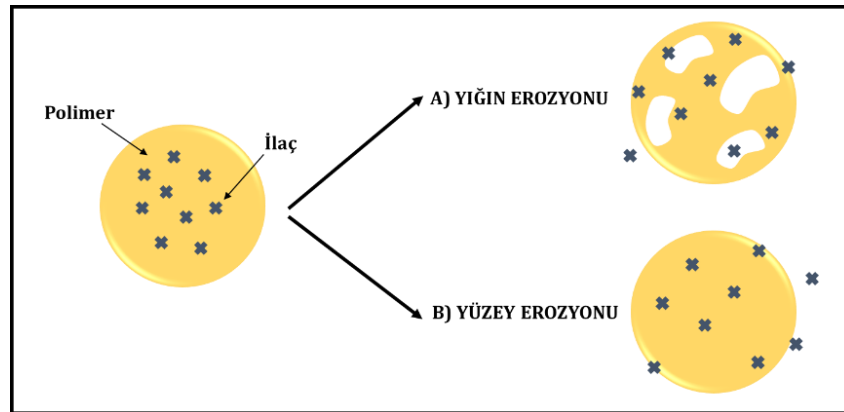
2.4.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler

Bu sistemde ilaç, biyobozunur polimer ile karıştırılır ve kovalent bağlarla kimyasal olarak bağlanır. Bu sistemler, polimer zincirlerinin kimyasal ya da enzimatik bozunmasının bir sonucu olarak biyolojik olarak güvenli ve giderek daha küçük parçalara ayrışacak ve böylece etken maddeyi salacak şekilde tasarlanmıştır. Polimerler aktif olarak (enzimler tarafından) veya pasif olarak (hidroliz ile) bozunabilir, bu da yüzey ve yığın erozyonla sonuçlanır (Şekil 2.5). Yüzey erozyonu, polimerin bozunmasının sadece yüzeyde gerçekleştiği ve hızın yüzey alanıyla orantılı olduğu heterojen bir süreçtir. Yüzey aşındırıcı sistemlerde ilaç salımı, çoğu zaman, birçok ilaç verme uygulaması için ideal olduğu düşünülen, öngörülebilir bir erozyon oranı ile ilişkilidir. Erozyon dışarıdan başlar ve içeriye doğru ilerler. Çoğu durumda, daha kalın sistemler daha uzun

erozyon sürelerine sahiptir ve hidrofilik polimerler hidrofobik malzemelere kıyasla daha hızlı bozunur. Yığın erozyon sistemlerde, bozulma malzeme boyunca homojendir ve çoğu durumda sistemin boyutu sabit kalır. İlaç üç aşamada salınır: yüzeyden ani salınım, polimerin ilk bozunmasında salınım ve polimerin tam bozunması/homojen erozyonu ile ilacın tamamının salınması. Polianhidritler ve polyesterler, sırasıyla yüzey ve yığın erozyon sistemleri için tipik örneklerdir. Hidrofobik veya orta derecede çözünmeyen ilaçlar genellikle erozyonla salınır [12].

İlaçların biyobozunur polimerlere kimyasal olarak bağlanması, ilaç salım sistemlerine “dokuya hedefleme” ve “bağışıklık eksikliğinin azaltılması” gibi yeni özellikler sağlamaktadır. Örneğin, kanserli dokuya hedeflendirilen ilaç salım uygulamalarında ilaçlar, suda çözünebilir, biyouyumlu ve biyobozunur polimerlere kimyasal olarak bağlanır ve hedefe ulaşıldığında zincirden koparak ortama salınır. Bu yaklaşım hala çok sayıda kanser tedavisi içinde yer alan kemoterapi süreçlerinde kullanılmakta ve “pasif hedefleme” olarak adlandırılmaktadır. İlaçların belirlenen dokuya aktif olarak hedeflenmesi, polimer-ilac taşıyıcı sistemin dokunun hücre-yüzey almaçları tarafından tanınacak bir molekülle (antikor, karbonhidrat gibi) birleştirilmesiyle sağlanır. Klinik çalışmaları sürdürülen bu yaklaşımın zorluğu, ilaç taşıyıcı sistemde spesifik hedefleme moleküllerinin bulunmasındadır [13].

Abuchowski ve ark. yaptıkları iki ayrı çalışmada adenosin deaminaz ve asparajinaz gibi yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin polietilen glikole (PEG) kovalent bağlanmasıyla, tavşanlarda ve farelerde büyük ölçüde ilaçlara karşı gelişen immünojeniteyi ve etkin maddelerin biyolojik yarı ömürlerinin azaltıldığını göstermişlerdir [14,15].



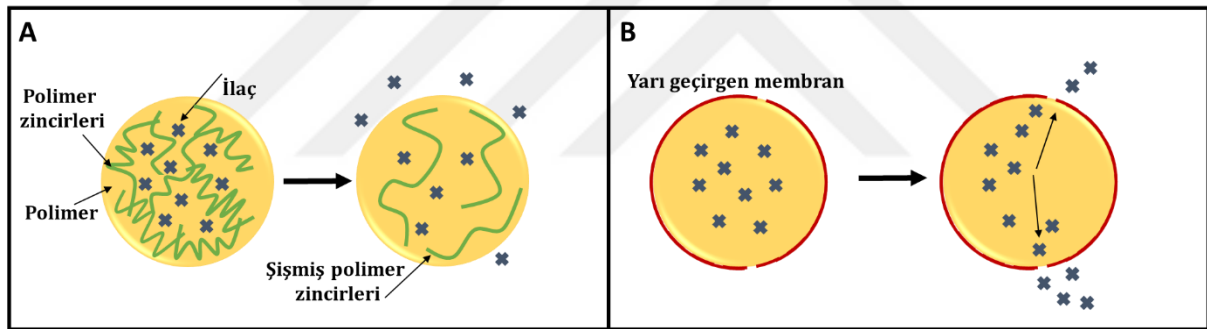
Şekil 2. 5. Kimyasal kontrollü sistemlerin çalışma prensipleri. A) Yığın erozyonlu sistem ve B) Yüzey erozyonlu sistem

2.4.3. Çözücü Kontrollü Sistemler

Bir salım sistemine çözücünün taşınması, taşıyıcıdan gerçekleşen ilaç salım davranışını etkileyebilir. Bu tür sistemlerde salım, ozmoz kontrollü ve şişme kontrollü gerçekleşir (Şekil 2.6). Ozmoz kontrollü salım, suyun ortamdan (düşük ilaç konsantrasyonu ile) ilaç yüklü polimere (yüksek ilaç konsantrasyonu ile) taşınması ile meydana gelir. Sistemi çevreleyen yarı-geçirgen

zar suyun içeri girişine izin verir, ancak ilacın dışarı çıkmasını engeller. Su, ilacın yarattığı ozmoz nedeniyle polimerik sisteme taşınır ve sistem içerisindeki hacim artışının oluşturduğu basınç sayesinde ilaç salım ortamına pompalanır. Bu mekanizma, zar boyunca sabit bir konsantrasyon gradyanı korunduğu sürece sıfır dereceli bir salım profili ile sonuçlanır [16].

Kuru halde camsı görünüme sahip hidrofilik polimerik sistemler, vücut sıvılarını içeren sulu bir çözeltiye yerleştirildiğinde, su sisteme difüze olur. Su alımı, polimerik partiküllerin şişmesi ve ardından ilaç salımı (şişme kontrollü salma) ile sonuçlanır. İlaç salım hızı, suyun difüzyon hızı ve polimerlerin zincir gevşeme hızı ile belirlenir [17]. Şişme kontrollü sistemler, ağ boyutunun ilaç salım davranışını kontrol etmede merkezi bir rol oynadığı hidrojeller gibi üç boyutlu çapraz bağlı ağlara sahip polimerik malzemelerden oluşur. Bu sistemlerde ilaç salımı, yarı deneysel Peppas modeli ($M_t/M_\infty = kt^n$) ile analiz edilebilir; burada M_t ve M_∞ , sırasıyla t zamanında ve sonsuz zamanda salınan mutlak kümülatif ilaç miktarıdır, k bir sabit, ve n serbest bırakma üssüdür. Bu denklem salım mekanizmasının (örneğin Fickian veya Fickian olmayan difüzyon) belirlenmesine izin verir. Şişme kontrollü sistemler, sistemdeki ilk ilaç dağılımına veya polimer bileşimine bağlı olarak sıfır dereceli bir ilaç salımı sağlayabilir [18,19].



Şekil 2. 6. Çözücü kontrollü sistemlerin çalışma prensipleri. A) Şişme kontrollü sistem ve B) Ozmotik kontrollü sistem

2.4.4. Uyarın Kontrollü Sistemler

Uyaranlara duyarlı polimerlerden ilaç salımı, sıcaklık, pH, iyonik güç, ses ve elektrik veya manyetik alanlar gibi iç veya dış uyaranlar tarafından kontrol edilir. Uyaranları kontrol etmek mümkün olduğundan, bu taşıyıcılar hedefe özel ilaç dağıtımı için araştırılmıştır. Örneğin, birçok tümörün zayıf asidik pH'ından yararlanılarak, tümöre özgü ilaç dağıtımı için pH'a duyarlı bağlayıcılara sahip taşıyıcılar geliştirilmiştir [20,21]. Dış Termosensitif ilaç taşıyıcılarında ilaç salımı, polimerin sıcaklığa bağlı faz geçişinden kaynaklanır. Dış uyaranlardan biri olan manyetik kuvvet altında aktive olan ilaç taşıyıcı sistemler ise, nano ya da mikro boyutta manyetik özellik gösteren malzemelerin polimer içerisine homojen bir şekilde disperse edilmesiyle üretilir [22]. Bu sistem biyolojik ortama yerleştirildiğinde, konsantrasyon gradyanına dayalı bir difüzyon olayı

görüldür. Ancak dış salınımlı manyetik alan etkisinde kalındığında, daha fazla miktarda etken madde hızla ortama salınır. Bu ilaç salım sistemlerinin en büyük avantajı, dışarıdan manyetik uyaran kullanarak salım hareketlerinin değiştirilmesinin mümkün olmasıdır [23].

2.5. İlaç Salım Sistemlerinin Modellenmesi

Salım sistemlerinin mekanizması şekil, gözeneklilik ve gözenek boyutu gibi morfolojik yapısına, kimyasal bağ yapısına, ilaç ile polimer arasındaki etkileşime, polimerin bozunma hızına bağlı olarak değişim göstermektedir. Salım sistemlerinde modelleme, etken madde salım kinetiğinin daha önceden tahmin edilmesi ve aydınlatılması için önemli bir rol oynar. Bu sayede salım kinetiğini optimize edecek deneysel parametrelerinin önceden belirlenmesi mümkündür. Modelleme sonucu elde edilen fiziksel parametrelerin (ilaç difüzyon katsayısı gibi) belirlenmesine olanak sağlanarak sistemden alınacak terapötik yararda artış görülecektir. Ayrıca, deneme yanılma yönteminden ziyade sistematik bir yaklaşımla yeni farmasötik ürünlerin geliştirilmesini kolaylaştırır. Matematiksel modellemenin kullanımıyla ilaç sisteminden istenilen etkinin alınması için sistemin boyutunun, geometrisinin, polimer kompozisyonunun ve yüklenen ilaç miktarının nasıl olması gerektiği bilgisine ulaşılabilmektedir [24]. Bu sayede, iş yükünün minimize edilmesi, biyolojik çalışmaların azaltılması, ürün geliştirme sürecinin kolaylaştırılması ve bunlara bağlı olarak da maliyetin azaltılması sağlanabilmektedir. İlaç salım sistemlerinin kinetiği 1960'lı yıllardan beri teorik olarak çalışılmaktadır. O zamandan beri yapılan bu çalışmalarda ilaç salım sistemlerinin çeşitli mekanizmaları çalışılarak birçok matematiksel model ortaya konmuştur. Geliştirilen bu ampirik ve yarı-ampirik matematiksel modeller arasından uygun modelin seçimi istenen veya gerekli tahmini yeteneğine ve doğruluğuna bağlıdır. Tablo 2.2'de ilaç salım profillerini tanımlayan kinetik modellerin özeti görülmektedir.

Tablo 2. 2. İlaç salım mekanizmalarını tanımlamak için uygulanan kinetik modeller ve modellerde kullanılan matematiksel eşitlikler

Kinetik Model	Matematiksel Eşitlik	Uygulama
Sıfırıncı Derece	$Q_t = Q_0 + K_0.t$	Kaplı salım veya membran kontrollü salım sistemleri
Birinci Derece	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1.t$	Homojen çözünme, salım ilaç miktarından bağımsızdır
Hixson-Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_t.t$	Suda çözünür ilaçlar gözenekli matrisler içindedir, salım hızı polimerik matris içinden

		difüzyon ile değil, ilaç çözünme hızı ile sınırlıdır
Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$	Difüzyon kontrollü model, ilaç tek tip bir polimerik matris sisteminde dağılır
Korsmeyer-Peppas	$(Q_t/Q_\infty) = K_k \cdot t^n$	Difüzyon ana ilaç salım mekanizmasıdır, farklı salım mekanizmalarını karakterize etmek için n değeri kullanılır
Weibull	$\log [-\ln(1 - (Q_t/Q_\infty))] = b \cdot \log t - \log a$	Ampirik model, bazı eksiklikler sunar ve bazı eleştirilere konu olmuştur; hemen hemen her türlü çözünme eğrisine uygulanır
Hopfenberg	$Q_t/Q_\infty = 1 - [1 - k_0 t / C_0 a_0]^n$	Çeşitli geometrilere sahip yüzeyden aşınan sistemler
Gompertz	$Q_t = A \cdot e^{-e^{-K(t-y)}}$	Çözünme eğrilerine uygulanır

Canlı içerisinde gerçekleşebilecek ilaç salım profilini tahmin etmek amacı ile, laboratuvar ortamında (*in vitro*) elde edilen verilerin farklı yöntemlerle modellenmesi gereklidir. İlaç yüklü bir salım sisteminin *in vitro* ortamda ilaç salım mekanizmasının belirlenmesi, fosfat tampon çözeltisi (Phosphate-buffered saline, pH: 7.4, PBS) veya yapay vücut sıvısı (simulated body fluid, SBF) ortamından belirli zaman aralıklarında alınan örnek ölçümleri ile yapılabilmektedir. Salım süresince vücut ortamı taklit edilmelidir. Bu nedenle ortam sıcaklığının 37°C'de sabit tutulması ve deneylerin sıcaklık kontrollü bir çalkalamalı inkübatörde gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

2.5.1. Sıfıncı Derece Kinetik

Sıfıncı derece kinetik modele uygun olarak salım yapan sistemler, etken maddenin performansını mümkün olanın ötesinde potansiyel olarak daha da genişletebilen ve iyileştirebilen bir kontrollü ilaç verme şeklidir. Sıfır dereceli ilaç salım sistemleri, ilacı polimerik taşıyıcının ömrü boyunca sabit bir oranda serbest bırakır. Denge anında, vücuttan atılma hızına eşdeğer hızda ilaç salınır, böylece sık tekrarlamaya gerek kalmadan terapötik doz içinde stabil ilaç plazma konsantrasyonları sağlanır. Bu da yan etkileri en aza indirerek ve hasta uyumunu artırır [25].

En basit haliyle, sıfıncı dereceden ilaç salım kinetiği, Eşitlik 1'deki gibi ifade edilebilir.

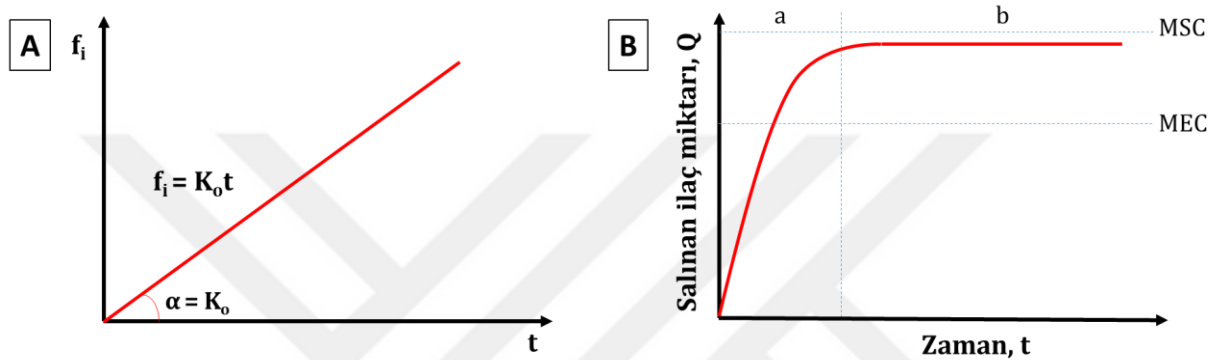
$$Q_0 - Q_t = K_0 t \quad (1)$$

Eşitlik 1'in düzenlenmesiyle Eşitlik 2 elde edilir.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (2)$$

Burada Q_t , herhangi bir t anındaki salım miktarını, Q_0 salım öncesinde çözeltide bulunan toplam ilaç miktarını (genellikle, $Q_0=0$), K_0 sıfırıncı dereceden salım katsayısını (konsantrasyon/zaman) ve t zamanı belirtir. Elde edilen birikimli ilaç miktarlarının zamana karşı grafiğinin çizilmesi ile salım profili oluşturulmaktadır (Şekil 2.7).

Bu model, bazı transdermal sistemlerde, düşük çözünürlüğe sahip ilaçlar içeren dışı kaplanmış matris formları ve membran kontrollü salım yapan sistemler için uygulanabilir [24].



Şekil 2. 7. A) Sıfır dereceli kinetiğin grafiksel gösterimi: f_i , t süresi boyunca çözünen ilacın fraksiyonunu, K_0 ise açısal katsayı veya görünür çözünme hızını ifade eder. B) İlaç düzeyine karşı sıfır dereceli kontrollü salım profili: a, absorpsiyon fazını; b, eliminasyon aşamasını; MSC, maksimum güvenli konsantrasyonu ve MEC, minimum etkili konsantrasyonu ifade eder.

2.5.2. Birinci Derece Kinetik

Birinci mertebe kinetik doğrudan konsantrasyona bağlı bir modeldir, salınan ilaç miktarının polimerik matriste kalan ilaç miktarıyla doğru orantılı olduğunu ifade etmektedir. Eşitlik 3'deki gibi ifade edilebilir.

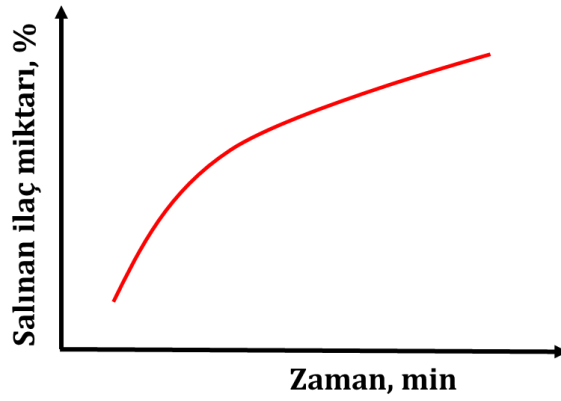
$$\frac{dC}{dt} = -KC \quad (3)$$

Burada ifade edilen k birinci dereceden hız sabitidir. Eşitlik 3'ün düzenlenmesiyle Eşitlik 4 elde edilir.

$$\log C = \log C_0 + Kt/2.303 \quad (4)$$

Burada, C_0 ilacın başlangıç konsantrasyonudur, K birinci dereceden hız sabitidir ve t zamandır. Birikimli ilaç konsantrasyonu yüzdelere logaritma değerlerinin zamana karşı grafiğinin çizilmesi ile $-K/2.303$ eğimine sahip bir doğru elde edilmektedir (Şekil 2.8).

Bu model, gözenekli matrislerin içinde bulunan ve suda çözünebilir ilaç moleküllerinin salımını modellemeleri için uygundur.



Şekil 2. 8. Birinci derece ilaç salım modelinin grafiksel gösterimi, zamana karşı kümülatif ilaç salımı (%)

2.5.3. Hixson-Crowell Modeli

Hixson ve Crowell (1931), parçacıkların yüzey alanının, hacminin küp köküyle orantılı olduğunu keşfetmişlerdir ve bu ilişkiyi kullanarak Eşitlik 5 ile ifade edilen denkliği elde etmişlerdir [26].

$$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = Kt \quad (5)$$

Burada Q_0 başlangıçta polimerik sistemdeki ilaç miktarını, Q_t herhangi bir t anındaki sistemde kalan ilaç miktarını, K yüzey-hacim ilişkisini oluşturan sabiti ve t zamanı göstermektedir.

Bu model, sistemin yüzey alanının değiştiği parçacıklardan veya tabletlerden ilaç salımının modellenmesi için kullanılmaktadır. Sistemde geriye kalan % ilaç miktarının küp kökünün zamana karşı grafiğinin çizilmesi ile ilaç salım profili elde edilmektedir (Şekil 2.9A).

2.5.4. Higuchi Modeli

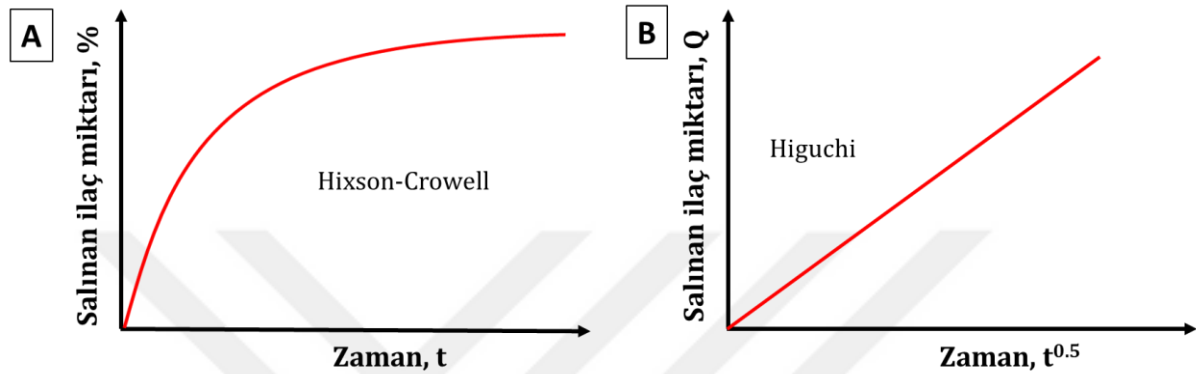
Matriks sistemlerinden ilaç çözünmesini tanımlayan matematiksel bir model 1960'lara kadar geliştirilmemiştir. 1961'den 1963'e kadar, ilaç salınımını anlamak için matematiksel modellerin geliştirilmesinde büyük bir ilerleme olmuştur. 1961'de Higuchi, ilaçların matriks sistemlerinden salınma oranını tanımlamak için en sık kullanılan matematiksel denklemi yayınladı. Higuchi modeli, ilaç salımını Fick yasasına bağlı olarak zamanın karekökü ile orantılı olarak tanımlar [27](Eşitlik 6).

$$Q_t = K\sqrt{t} \quad (6)$$

Burada, Q_t t anında salınan ilaç miktarını, K Higuchi salım sabiti ve t zamanı ifade etmektedir (Şekil 2.9B). Higuchi modeli ortaya çıktıktan sonra, ilaç salım sistemlerinin matematiksel

modellenmesi üzerinde araştırmalar hız kazanmış ve farklı durumlar için analitik modeller de geliştirilmiştir.

Bu model, difüzyon kontrollü ilaç salım sistemlerinin analitik modellenmesi ve polimer tabanlı matris sistemler için kullanılmaktadır. Fakat bu eşitliği kullanmak için başlangıç ilaç konsantrasyonunun ilacın çözünabilirliğinden daha fazla olması gerektiği ve ilacın difüzyon hızının sabit olması gibi bazı varsayımlarda bulunmak gerekmektedir.



Şekil 2. 9. A) Hixson-Crowell modeli salım profili, B) Higuchi modeli salım profili

2.5.5. Korsmeyer-Peppas (Power Law) Modeli

Bu modelde polimerik sistemlerden ilaç salımı, salımın geçen süreyle üssel olarak artışıyla modellenmiştir ve kullanılan eşitlik aşağıda sunulmuştur.

$$\frac{Q_t}{Q_\infty} = Kt^n \quad (7)$$

Burada, Q_t herhangi bir t anına kadar salınmış olan ilaç miktarını, Q_∞ denge anındaki ilaç miktarını, K salım sabitini ve n taşınım davranışını ifade etmektedir. Denklem 7’de yer alan n değeri, farklı salım mekanizmalarını tanımlamaktadır. Tablo 2.3’de salım üssü değeri ile salım mekanizmaları arasındaki ilişki görülmektedir.

Tablo 2. 3. Polimerik filmlerde salım üssüne bağlı olarak taşınım mekanizmalarının yorumlanması [24]

Salım üssü, n	Taşınım mekanizması	Zamanın fonksiyonu olarak hız
0.5	Fickian difüzyon	t^{-1}
$0.45 < n = 0.89$	Fickian olmayan difüzyonu	t^{n-1}
0.89	Case II taşınım	Sıfır derece salım
>0.89	Super Case II taşınım	t^{n-1}

İlaç salım profilini elde etmek için, *in vitro* ilaç salım çalışmalarından elde edilen verilerden logaritma zamana karşı logaritma kümülatif yüzde ilaç salımı grafiği çizilmiştir.

Eşitlik 7’de $n=1$ olarak alındığında ilaç salım hızının zamandan bağımsız olduğu görülmektedir. Bu durumda salım mekanizması sıfıncı derece kinetiğine uymaktadır. Düz levhalar için sıfıncı derece salımı oluşturan mekanizma bilim adamları arasında Case II taşınımı olarak bilinir. Salım üssü için iki uç değer olan 0.5 ve 1’in yalnızca düzlemsel levha geometrisi için geçerli olduğu unutulmamalıdır. Küreler ve silindirler için Tablo 2.4’te listelendiği gibi farklı n değerlerine bağlı olarak farklı taşınım mekanizmaları önerilmiştir.

Tablo 2. 4. Farklı geometriye sahip polimerik salım sistemlerinde salım üssüne bağlı olarak taşınım mekanizmalarının yorumlanması [18]

Salım üssü, n			Taşınım mekanizması
İnce Film	Silindir	Küre	
0.5	0.45	0.43	Fickian difüzyon
$0.5 < n < 1$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Anomalous transport
1	0.89	0.85	Case-II transport

2.5.6. Weibull Modeli

Weibull tarafından 1951 yılında çözünme/salım işlemleri için geliştirilmiştir. Bu eşitlik bütün çözünme eğrileri için uygulanabilmektedir. Üssel, sigmoidal ve parabolik şeklindeki çözünme eğrilerini tanımlamada başarılı olmuştur. Modelinin matematiksel formülasyonu Eşitlik 8’de verilmiştir.

$$-\ln\left(1 - \frac{Q_t}{Q_\infty}\right) = \ln\alpha + \beta \ln t \quad (8)$$

Burada Q_t/Q_∞ oranı t anına kadar salınmış olan ilaç miktarını, α ve β şekil ölçütlerini ve t zamanı ifade etmektedir. Şekil ölçütü eğrisel profiller için $b=1$, sigmoidal şekilli profiller için $b>1$ ve parabolik şekilli çözünme profilleri için $b<1$ değerini alır. Salım sabitlerinden α salım sürecini ifade ederken, β değeri salım yada çözünme profilinin karakteri hakkında yorum yapar ve şekilsel benzerlik ile modelin uyumlu olup olmadığını ortaya koyar [28].

2.5.7. Hopfenberg Modeli

Farklı geometrilere sahip yüzey erozyonu kontrollü salım sistemlerinden ilacın salımı, heterojen erozyon sergileyen düz levha, küre ve sonsuz silindirlerden de ilaç salınımını tanımlamak için genel bir matematiksel denklem geliştiren Hopfenberg tarafından analiz

edilmiştir (Hopfenberg, 1976). Bu modelin değiştirilmiş bir formu El-Arini ve Leuenberger tarafından geliştirilmiştir ve Eşitlik 9'da sunulmuştur. Düzlemsel levha, silindir ve küre için n değeri sırasıyla 1, 2 ve 3 olarak alınır [28].

$$Q_t Q_0 = 1 - [1 - k_1 t(t - 1)]^n \quad (9)$$

2.5.8. Gompertz Model

Gompertz modeli ile *in vitro* çözünme profilleri ifade edilir. Eşitlik 10'da verilen denklemde ifade edilen daha basit bir üstel model ile tanımlanır.

$$X(t) = X_{\max} \exp[-\alpha e^{-\log \beta t}] \quad (10)$$

Burada $X(t)$ 100 ile bölünen t zamanda çözünmüş yüzde, $X_{\max}$ maksimum çözünme, $\alpha t = 1$ zamanında çözünmemiş oranı belirler ve konum veya ölçek parametresi olarak tanımlanır, β şekil parametresi olarak tanımlanan birim zaman başına çözünme oranıdır. Bu model başta dik bir artışa sahiptir ve asimptotik maksimal çözünmeye yavaşça yakınsar.

2.6. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Aranılan Özellikler

Bir ilaç salım sisteminin optimal tasarımı, salım mekanizmalarının, ilaç özelliklerinin, ilacın farmakolojik etkisinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasını gerektirmektedir [29]. Bunun yanında taşıyıcı malzemelerin üretiminde kullanılacak malzemelerin özellikleri de büyük önem arz etmektedir. Diğer tüm biyomalzemeler gibi, canlı vücudu ile ilişkili olan ilaç salım sistemlerinin de başlıca sahip olması gereken özellikler arasında biyoyuumluluk ve biyobozunurluk yer almaktadır. Aşağıdaki bölümde kontrollü ilaç salımında kullanılacak taşıyıcı malzemelerin sahip olması gereken başlıca özellikler hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

2.6.1. Biyoyuumluluk

Biyoyuumluluk bir biyomalzemenin yerleştirildiği bölgedeki dokuların normal değişimlerine engel olmaması ve ilgili biyolojik çevrede iltihaplanma, toksik etki, pıhtı oluşumu vb. gibi istenmeyen tepkiler oluşturmamasıdır. Bu nedenle vücuda implante edilen kontrollü salım sistemlerinde aranan en önemli özelliklerden ilki biyoyuumluluktur. İmplant edilecek malzemenin şekli, boyutu, morfolojik yapısı, kimyasal reaktifliği, mekanizması, bozunma hızı ve bozunma sonrası ürünleri gibi birçok faktör implantın yerleştirildiği bölgede ve çevresinde olası doku tepkilerine neden olabilmektedir. İlaç salım sistemi olarak kullanılacak malzemelerin yerleştirildikleri bölgelerde olumsuz etkiler yaratmaması ve hücreler ile doku arasındaki ilişkiye zarar vermemesi istenmektedir. Sadece salım sistemi olarak kullanılacak biyomalzemenin sağlam haldeki durumu değil, bozunma ürünleri de biyolojik olarak uyumlu olmalıdır. Özellikle asidik pH'a neden olan bozunma ürünleri oldukça ciddi tehlike yaratmaktadır. Bu sebeple; salım

sistemlerinin yanı sıra doku iskeleleri ve yara örtü materyalleri gibi diğer tüm biyomalzemelerin üretiminde biyopolimerler seçilmelidir.

2.6.2. Biyobozunurluk

İlaç salım sistemlerinin hazırlanmasında biyolojik olarak bozunabilen doğal ya da sentetik polimer temelli malzemelerin kullanılması, ilaçlarla birlikte proteinler ve genlerin de istenen dokuya hedeflendirilmesi ve salımı için önemli bir özellik olarak ortaya çıkmaktadır [30]. Biyobozunur malzeme olarak kullanılabilen polimerler yapılarına, molekül ağırlıklarına, morfolojilerine, bileşenlerine ve işlenme koşullarına bağlı olarak vücut içerisinde yerleştirildikleri bölgede doğal olarak gerçekleşen prosesler ile moleküler düzeye kadar parçalanır ve vücuttan filtre edilerek veya metabolize olarak atılırlar [31]. Biyolojik olarak bozunabilen polimerler, gelişmiş ve etkili ilaç salım sistemleri için oldukça önemli bir potansiyele sahiptir. Bu polimerler kullanılarak üretilen malzemeler vücuda yerleştirildiği anda, taşıdıkları ilaç ya da etken maddenin kontrollü bir şekilde salımını sağlarken aynı zamanda bozunarak da vücuttan uzaklaştırılırlar. Bu polimerlerin biyobozunurluklarını etkileyen faktörler arasında molekül ağırlığı ve dağılımı, kimyasal yapı ve kompozisyon, iyonik grupların varlığı, amorf, yarı kristalin veya mikroyapı morfolojisi, iyon değişimi ya da iyonik güç gibi fizikokimyasal özellikler, şekil ve boyut değişiklikleri, difüzyon katsayısı varyasyonları ve mekanik mukavemet gibi fiziksel etkenler ve hidroliz mekanizması sıralanabilir.

2.6.3. Uygun Bozunma Hızı

Bir ilaç taşıyıcı sistemin bozunma hızının önceden ayarlanabilmesi oldukça zor bir durumdur. İstenen hızda kontrollü bir salım için; ilaçların kimyasal yapıları değiştirilir. Böylelikle farklı bozunma hızlarına sahip olacak şekilde elde edilebilirler. Bu durum, biyobozunur polimerlerin kullanılması ile de sağlanabilmektedir [32].

2.6.4. Uygun Mekanik Özellik

İmplant edilecek ilaç salım sisteminin mukavemet, dayanıklılık, sertlik ve yumuşaklık gibi mekanik özellikleri ev sahibi dokunun mekanik özellikleri ile uyumlu olmalıdır. Böylece ilaç salımı ve doku iyileşmesi gerçekleşinceye kadar malzemenin parçalanmadan stabilitesini koruması sağlanabilecektir. Bir biyomalzemenin mekanik özelliklerinin kontrol edilmesi oldukça zor olmakla beraber, implantasyon bölgesindeki mekanik özelliklerin (deformasyon mekanizması ve elastik modül gibi) belirlenebilmesi bu malzemelerin özelliklerinin nihai ürün veya kullanım yerine göre iyileştirilmesine yardımcı olacaktır [32]. Bu nedenle, üretilen ilaç taşıyıcı sistemlerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi; ilaç tutma kapasitesi, salım performansı, biyouyumluluk ve biyolojik bozunabilirlik gibi diğer parametreler kadar önemlidir [33].

2.6.5. Sterilize Edilebilirlik

Sterilizasyon, bakteri sporları dahil tüm mikroorganizmaların ortadan kaldırılarak ortamın (biyomalzemenin) kabul edilebilir sterilite güvence düzeyini sağlayacak ölçüde arındırılması olarak tanımlanmaktadır. İlaç salım sistemlerinin de içerisinde yer aldığı biyomalzemelerin hızlı ve kolay bir şekilde enfeksiyona sebep olmamaları için sterilize edilmeye uygun olmaları gerekmektedir. Diğer bir deyişle, seçilecek sterilizasyon metodunun malzemelerin biyoaktifliği üzerinde herhangi bir etkisi olmamalı ve kimyasal bileşimlerinin değiştirmemelidir. Ayrıca, biyouyumlulukları ve bozunma davranışları da sterilizasyondan etkilenmemelidir. Etken madde içeren ürünlerin sterilizasyonunda ısı (kuru hava ya da buhar) ile sterilizasyon, filtrasyonla sterilizasyon, gazlarla sterilizasyon ve radyasyonla sterilizasyon yöntemleri kullanılır. Ancak sterilizasyon yöntemi belirlenmeden önce etken madde üzerinde oluşabilecek etkiler göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, özellikle salım sistemlerinin taşıdıkları ilaç etken ve yardımcı maddelerin sterilizasyonunda, özel doğaları gereği, gama (γ) radyasyonu ile sterilizasyon yöntemi tercih edilmektedir. Yapılan son çalışmalar, yeni ilaç dağıtım sistemleri arasında yer alan mikro/nanoküreler, jeller, lipozomlar, niyozomlar, jelozomlar ve mikro/nanopartiküllerin sterilizasyonunda ise radyasyon sterilizasyonunun da kullanıldığını göstermektedir. Böylelikle aktif maddeyi taşımak için tasarlanan sistemin korunmasının yanı sıra ışınlamadan sonra aktif bileşenin yapısının da korunması sağlanabilecektir [34,35].

2.7. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Tasarlanmasında Kullanılan Polimerler

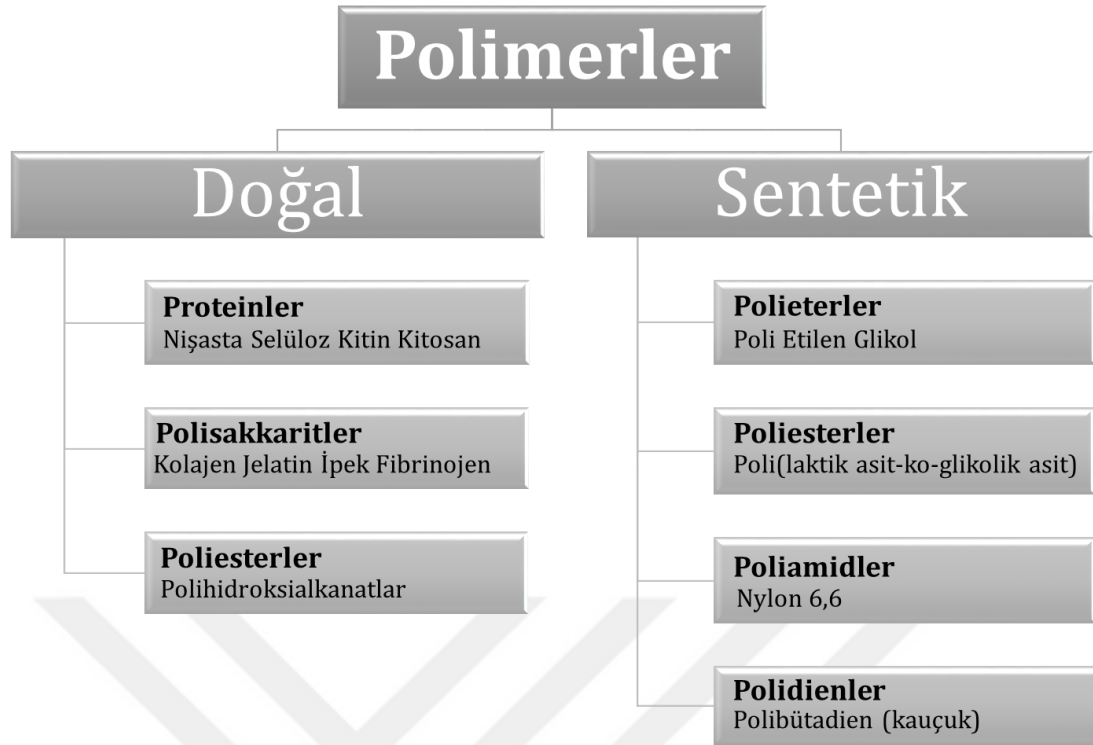
Geçmişten günümüze ilerlemenin kaydedildiği ilaç taşıyıcı sistemlerin, biyolojik çevre ile uyum sağlaması için yeni malzemelerin geliştirilmesi üzerine oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. Vücut içerisine yerleştirilen bu sistemler, insan vücudundaki canlı dokuların işlevlerini yerine getirmek ve desteklemek, hasarlı dokuların onarımını sağlamak ya da hedef bölgede ilaç salımı yapmak için kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olup, sürekli ya da belirli aralıklarla başta kan olmak üzere birden fazla vücut akışkanı ile temas halindedirler.

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin üretiminde doğal veya sentetik temelli polimerler ya da bu polimerlerin bir araya getirilerek oluşturdukları kompozitler kullanılmaktadır. Polimer, küçük ve basit tekrarlanan birimlerden (monomerler olarak adlandırılan küçük molekülü organik maddeler) oluşmuş büyük molekülüdür. Polimerik malzemeler farklı morfoloji ve şekillerde hazırlanabilmeleri, yüzey özelliklerinin kolaylıkla modifiye edilebilmesi gibi pek çok avantaja sahiptirler. Ayrıca, polimerlerin karbon zinciri uzadıkça molekül ağırlığının artmasıyla aşınma, çekme gerilmeleri ve burulmalara karşı mukavemeti ile elastikiyeti de artmaktadır. Biyomalzeme olarak kullanılan metal ve seramiklerin esnek olmaması ve sert bir yapıya sahip olmaları, yüksek miktarda su içeren canlı vücudunun esnek yapıdaki dokuları için uygun değildir. Bu durum daha

esnek yapıdaki ve yoğunluklarının dokuların yoğunluk değerlerine çok yakın olan polimerlerin biyomalzeme olarak kullanımının daha iyi bir seçenek olduğunu da açıkça göstermektedir. Bu malzemelerin dezavantajlarını az da olsa ortadan kaldırmak için kompozit malzemeler geliştirilmektedir. Polimerlerin ya da kompozitlerinin kullanılması ile film, nano/mikropartikül, fiber, jel, boncuk, nano/mikro küreler gibi değişik şekil ve morfolojilerde ilaç taşıyıcı sistemler hazırlamak mümkündür.

Polimerler dahil vücut yapısına dışardan katılacak herhangi bir yabancı malzemeye karşı tümör üretimi, bağışıklık sisteminde hareketlenme, pıhtı oluşumu, damarlanma ve alyuvar sayısının artışı gibi tepkiler söz konusudur. Bu durumda kullanılacak olan polimerik malzemenin de biyouyumlu olması gerekmekte yani uygulama sırasında malzemenin vücut sistemine uygun cevap verebilme yeteneğine sahip olması gerekmektedir.

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında kullanılan biyouyumlu polimerler doğal ve sentetik polimerler olarak iki kısımda incelenmektedir (Şekil 2.10). Doğal polimerler kendi aralarında proteinler, polisakkaritler ve poliesterler olarak üç gruba ayrılırlar. Polisakkarit esaslı polimerler kolajen, jelatin, ipek ve fibrinojendir. Mikrobiyal poliesterler ise poliortoesterler, polianhidritler, poliesteramidler ve poliiminokarbonatlar olarak sınıflandırılabilir. Bu polimerler yapılarındaki ester grupları nedeniyle kolay hidroliz olma özelliğine sahiptirler. Yine kitin, kitosan, nişasta ve selüloz içeren protein esaslı polimerler de sahip oldukları elastomerik davranışları, mükemmel biyouyumlulukları ve oksijen geçirgenliği gibi eşsiz özellikleri sayesinde geniş bir uygulama alanında kullanılma potansiyeline sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde ilaç salım sistemlerinin yanı sıra doku onarımı/yenilenmesi için doku iskeleleri, ve biyosensörler gibi bir çok malzemenin üretiminde kullanılmaktadır. İlaç salım sistemleri üretiminde kullanılan en popüler sentetik polimerler poli (laktik asit) (PLA) ve poli (laktik glikolik asit) (PLGA)'dır. Polisakkarit olarak hyaluronik asit yaygın olarak kullanılmaktadır. Protein temelli polimer ailesinde yer alan pozitif yüklü bir biyopolimer olan kitosanda sergilediği eşsiz özellikler sayesinde sıkça kullanılmaktadır [36–38].



Şekil 2. 10. İlaç taşıyıcı sistemlerin üretilmesinde kullanılan doğal ve sentetik temelli polimerler

Biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimerlerin geliştirilmiş olmalarına rağmen, doğal polimerlerin üstünlükleri hala daha fazladır. Bu üstün özellikler aşağıdaki şekilde sıralanabilir [39,40]:

- Biyolojik olarak parçalanabilme özellikleri daha iyidir.
- Antijenik değildirler.
- Metabolize olabilirler.
- Retiküloendotelyal sisteme taşınabilirler.
- Stabiliteleri ve büyüklük dağılımları kolay kontrol edilebilir.
- Suda çözünürlüğü fazla olan maddeler için yüksek yükleme sağlanabilir.

Sahip oldukları avantajların yanında, doğal polimerlerin bazı dezavantajları da vardır. Bunlar:

- Saflaştırılmaları zordur.
- Büyük ölçekte kullanımları sınırlıdır.

Bu doktora tez çalışmasında, doğal bir aminopolisakkarit olan kitosan kullanılmıştır.

2.8. Kitosan

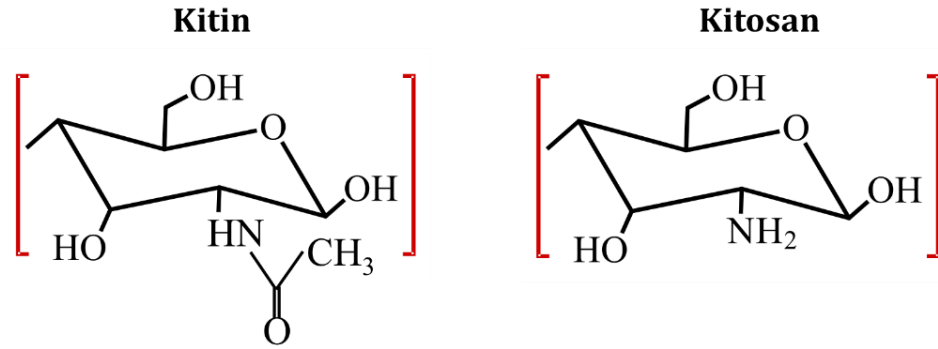
Kitosan, benzersiz kimyasal yapısı, pozitif yükü, reaktif hidroksil varlığı ve serbest amino grupları nedeniyle geniş biyolojik uygulamalara sahip polikasyonik bir biyopolimerdir. Kitosan, biyolojik olarak yapışkan, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir gibi mükemmel fizikokimyasal özelliklere sahiptir [41]. Biyobozunurluk ve toksik olmama gibi

benzersiz biyolojik özelliklerinden dolayı, gıda, ilaç, tekstil, tarım, su arıtma, kozmetik ve biyomalzeme endüstrilerinde ya tek başına ya da diğer doğal polimerlerle harmanlanmış birçok uygulaması mevcuttur. Kitosan (poli-(β -1-4)-2-amino-2-deoksi-d-glukopiranoz) doğal bir bileşen olan kitinin kısmen veya tamamen deaktive edilmesiyle üretilir. Kitin, yapı olarak selüloza benzer bir yapı gösterir. N-asetil-Dglukozaminin uzun zincirli bir biyopolimeri olup, polikasyonik bir polisakkarittir. Kitin'in eklem bacaklılar, solucanlar, bakteriler, mantarlar, böcekler ve kabuklu deniz canlıları gibi canlıların iskelet sistemlerinin içeriğinde %20-30 oranında bulunuyor olması, yenilenebilir bir kaynak olduğunu göstermektedir.

2.8.1. Kimyasal Özellikler

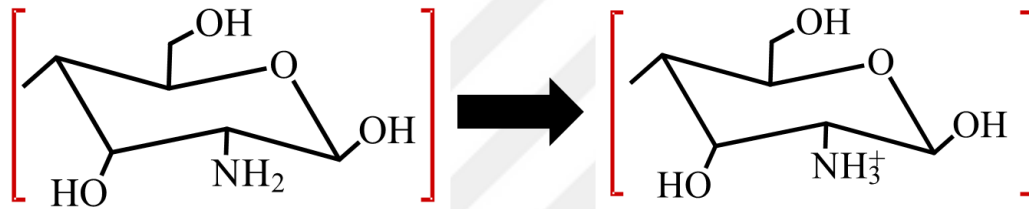
Kitin ile kitosan kimyasal olarak birbirine benzer, yalnızca genel karbonhidrat yapısındaki iki numaralı karbona bağlı gruplarında farklılık mevcuttur. Bu gruplar kitinde N-asetil, kitosanda da ise amin gruplarıdır. Kitin amin (R_2-NH) ve hidroksil grupları ile metal bağlayan bir metal şelatlama ajanı iken kitosan 2-amino-2-deoxy-D-glukoz (glukozamin) biriminin amino grubunun ($R-NH_2$) varlığı nedeniyle metal iyonlarının şelatlar oluşturarak toplanmasına uygun bir doğal polimerdir. Kitosan ayrıca çok sayıda hidroksil grubuna sahip olması sebebiyle yüksek hidrofilite gösterir. Kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi, kitinin kaynağına, izolasyon yöntemine, sodyum hidroksit ile işlem görme süresine, derişimine ve işlem sırasındaki sıcaklığa bağlıdır. Şekil 2.11'de kitin ve kitosanın bağ yapıları gösterilmiştir.

Kitin ve kitosan arasındaki temel farklılık, yapılarındaki asetil içeriğinden kaynaklanmaktadır. Deasetilasyon derecesi kitinin yapısında bulunan aminoasetil gruplarından asetil grubunun uzaklaştırılma derecesidir. Bu şekilde geriye yalnızca amin grubu kalmaktadır. Amino gruplarının varlığı kitosanın kimyasal modifikasyonunu sağlar. Araştırmalar sonucu, iyi bir çözünürlük için kitosanın en az %75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiğini göstermiştir. Kitosanda %5-8 arasında bulunan azot içeriği de deasetilasyon derecesi bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Kitosan kitine göre iki büyük avantajı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kitini çözmek için lityum klorür ve dimetilasetamid gibi toksik özellikte olabilen çözücüler kullanılmasına karşın kitosanın seyreltik asetik asit içinde kolayca çözünebilmesidir. İkincisi ise birçok kimyasal reaksiyon için aktif kısım olan serbest amin gruplarına sahip olmasıdır.



Şekil 2. 11. Kitin ve kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosanın kimyasal yapıları

Kitosan nötral ve alkali pH'da çözünmez, ancak hidroklorik asit, laktik asit ve asetik asit gibi inorganik ve organik asitlerle suda çözünebilen formlara dönüşür. Asit içeren ortamda, çözünmenin başlamasıyla polimerde mevcut halde bulunan amino grupları protonlanır böylece pozitif yüklenir [42] (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12. Asit içeren ortamda, kitosanın çözünmeye başlamasıyla polimerde mevcut halde bulunan amino gruplarının protanlanması

Kitosan sahip olduğu glukozamin ünitelerinin her birinde bir yük bulunduğundan yüksek yük yoğunluğuna sahiptir bu sayede negatif yüzeylerle kuvvetli bir etkileşim gerçekleştirir. pH 7' nin üzerindeki çözeltilerde çözünmemesinin sebebi kararlı kristal yapısından dolayıdır. Molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları boyunca esnemez bir kristal yapı ile karakterize olan kitinin deasetilasyon derecesi %0 ve %100 olduğunda en yüksek kristallik elde edilir. Kitosanın çözünürlüğü genelde %1'lik veya 0.1 M asetik asit çözeltisi ile test edilir. Kitosanın çözünürlüğünü kontrol altına almak oldukça zordur çünkü; deasetilasyon derecesine, iyonik derişime, pH' ına, protonlama için kullanılan asidin yapısına, asetil gruplarının polimer zincirindeki dağılımlarına ve polimerdeki hidroksil gruplarının hidrojen bağlarına bağlıdır. Çözünürlüğü molekül ağırlığının artmasıyla azalmaktadır. Yüksek molekül ağırlığı ve dallanmamış düz yapısına sahip olması kitosan çözeltilerinin asidik ortamlarda yüksek viskoziteye sahip çözeltiler vermesi ile sonuçlanır.

2.8.2. Bakteriyostatik ve Fungistatik Özellikler

Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi birçok bakteri, mantar ve mayalara karşı kanıtlanmıştır. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı geniş bir aktivite spektrumuna ve yüksek öldürme oranına sahiptir [43]. Kitosan, bakteri ve mantar büyümesini engelleyen içsel bir antibakteriyel aktivite sergiler. Örnek olarak, *Staphylococcus aureus* kültürlerinde kitosan tedavisi, yüzey hücre yapılarının bozulmasına ve bakteriyel ölüme yol açan sözde membran-duvar kompleksinde yapısal değişikliklere sebep olur. Bakteriyel büyüme inhibisyonunun, kitosan katyonik amino grupları ve bakteri hücre duvarında bulunan N-asetilmuramik asit, sialik asit ve nöraminik asit gibi anyonlar arasında elektrostatik etkileşimler kurma yeteneği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Elektrostatik etkileşimlere ek olarak, kitosanda N-asetillenmiş kalıntıların varlığından kaynaklanan hidrofobik etkileşimlerin de kitosan bakteriyostatik özelliklerine katkıda bulunduğu düşünülmektedir, yüksek oranda asetillenmiş kitosanların *Escherichia coli* üzerinde de antimikrobiyal aktivite sergilediği bilinmektedir [44].

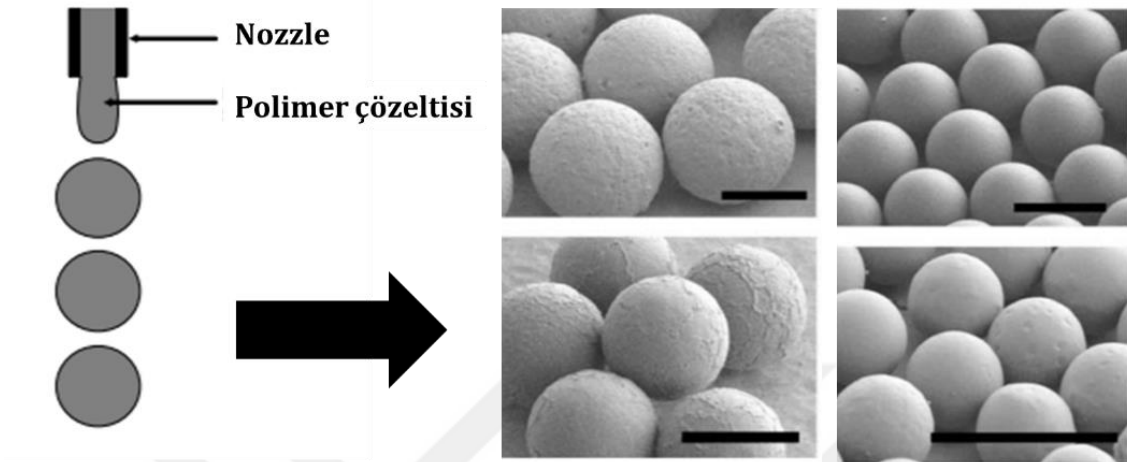
2.9. İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Mikroküreler

Kontrollü salım, belirli zamanlarda veya belirli salım profili ile önceden belirlenmiş bir hızda veya kontrollü hızda hastaya ilacı bırakmak amacıyla ilaç salımının kullanımını ifade eder. Geleneksel ilaç verme sisteminin mevcut sorunlarının üstesinden gelmek için çeşitli ilerlemeler kaydedilmiş ve kontrollü ilaç salım sistemleri için mikrokürelerin geliştirilmesi bunlardan biridir [45].

Mikroküreler birkaç mikrondan mm boyutlarına kadar değişik boy ve dağılımlarında, gözenekli veya gözeneksiz, vücutta parçalanabilen veya parçalanmayan, farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen ve enjekte edilebilirliğe uygun mikrotasıyıcılarıdır. Mikroküre teknolojisinin altında yatan temel fiziksel süreç Şekil 2.13'de şematik olarak gösterilmiştir. Yöntem temel olarak, homojen damlacıklar üretmek için bir nozle içinden polimer içeren bir çözeltinin püskürtülmesini içerir. [46]. Farklı özelliklere sahip çeşitli türlerde mikroküreler üretmek mümkündür. Aşağıda mikroküre türleri verilmiştir [47].

- Biyo-yapışkan mikroküreler
- Manyetik mikroküreler
- Yüzen mikroküreler
- Radyoaktif mikroküreler
- Polimerik mikroküreler
- Biyobozunur polimerik mikroküreler
- Sentetik polimerik mikroküreler

Bu zamana kadar poli(d,l-laktid-ko-glikolid) (PLG), polianhidritler, etilselüloz, kitosan, jealtin ve nişasta da dahil olmak üzere çeşitli sentetik ve doğal polimerler kullanılarak katı formda mikron yapıda küreler üretilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında da ilaç salım uygulamaları için polimerik mikroküreler, kitosan doğal polimeri kullanılarak üretilmiştir.



Şekil 2. 13. Polimerik mikrokürlerin oluşumu ve örnek mikroskopik görüntüleri [48]

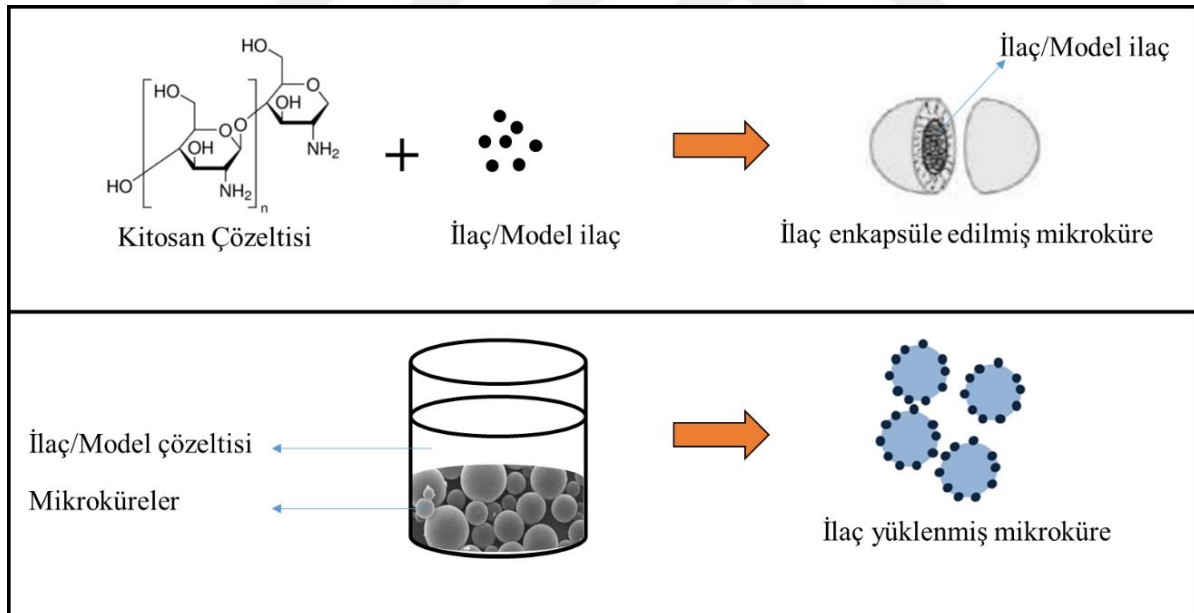
Mikroküre salım sistemlerinden beklenen özellikler; etkin maddeyi kontrollü olarak salması, biyoyumlu olması, düşük dozlarda etkin madde kullanımına olanak vermesi ve buna bağlı olarak toksisiteyi azaltması, biyobozunur olması ve bozunma ürünlerinin toksik özellik göstermemesi, etkin maddenin özelliklerini olumsuz yönde etkilememesi ve etkin maddenin stabilitesini koruyabilmesidir [49]. Bu özelliklere ek olarak mikrokürelerin mevcut geleneksel dozaj biçimlerine göre avantajları şu şekildedir:

- Mikroküreler, uzun süreli ve sabit tedavi sağlarlar.
- Mikroküreler, dozlama sıklığını azaltır ve bu nedenle hasta uyumunu iyileştirir.
- Mikroküreler, ilacın kontrollü, sürekli ve hedefe yönelik verilmesini sağlar.
- Midede ilaç boşalması engellenir ve bu nedenle lokal istenmeyen etkiler azalır.
- İlaçların kısa yarı ömrü için daha iyi terapötik etki elde edilebilir, biyoyararlanım artırılır.
- Mikroküreler ilaçların çevreye karşı korunmasını sağlar.
- İlaçların tat ve kokusunu maskeler.
- İlk geçiş metabolizmasını önler.
- Küçük ve küresel boyutları nedeniyle vücuda kolayca enjekte edilebilir.

2.10. Mikrokürelere İlaç Yüklenmesi/Enkapsülasyonu

İlaç molekülleri, ister üretim prosesi sırasında yapı içine istenilirse de üretim sonunda elde edilen nihai ürüne emilim ile katılabilir. Üretim sonrası yöntem ile ilaç miktarının ayarlanması kolaylaşır ve üretim esnasında gerçekleşebilecek yan reaksiyonlar elimine edilebilir. İlaç yüklenmesi birçok etmene bağlı bir süreçtir; şişme oranı, jel miktarı, polimer çözeltisinin viskozitesi, ilaç-polimer etkileşimleri, çözünürlük, konsantrasyon, ilaç molekülünün büyüklüğü, ilacın pH değeri ve difüzyon özellikleri gibi özellikler ile belirlenebilir. İlacın salımı da birçok parametreye bağlıdır; ilaç miktarı, salım sisteminin geometri ve ilacın hidrofilik ya da hidrofobik olması gibi birçok parametre ilaç salımını etkileyecektir.

Mikrokürelere kontrollü salım uygulamaları öncesinde yapılan ilaç yükleme çalışmaları kapsamında iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Şekil 2.14’de şematik gösterimi yer alan bu üretim yöntemlerinin ilki, farklı oranlarda bir araya getirilen polimer ve ilacın uygun bir çözücünde çözülmesi ve ilaç yüklü malzemenin üretilmesidir. Doğrudan olan bu yöntemde ilaç polimer matris içine dağıtılmış ya da polimer tarafından enkapsüle edilmiş durumdadır. İkinci yöntem ise üretilen polimerik malzemenin, belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan ilaç çözeltileri içerisinde bekletilerek ilacın malzemeye emdirilerek dolaylı yükleme yapılması şeklindedir.



Şekil 2. 14. Farklı ilaç yükleme yöntemlerinin şematik gösterimi

2.11. Mikroküre Üretim Yöntemleri

Katı, sıvı veya gazların polimerik kaplamalara dahil edilmesi mikroenkapsülasyon tekniği ile yapılabilmektedir. Mikroenkapsülasyon için kullanılan farklı yöntemler, partikül boyutuna, uygulama yoluna, ilaç salım süresine, çapraz bağlama yöntemine, ilacın türüne, vb. karakterlere bağlıdır [50]. Genel olarak mikroküreler, faz ayırma veya çökeltme, emülsiyon/çözücü

buharlaştırma ve/veya püskürtme yöntemlerinin kombinasyonlarını içeren çeşitli tekniklerle üretilmiştir. Üretim parametrelerinin varyasyonları, parçacık boyutu ve boyut dağılımının kontrolüne izin verir. İlaçlar, ilacın özelliklerine bağlı olarak partiküllere birkaç farklı şekilde dahil edilebilir. Hidrofobik terapötikler, metilen klorür veya etil asetat gibi bir çözücü içinde polimer ile birlikte çözülebilir. Proteinler dahil olmak üzere hidrofilik terapötikler, ince öğütülmüş kuru bir toz olarak organik fazda süspanse edilebilir. Alternatif olarak, bir hidrofilik terapötik maddenin sulu bir çözeltisi, bir yağ içinde su emülsiyonu oluşturmak için organik polimer çözeltisi ile de karıştırılabilir [48]. İlaç yüklü mikroküre üretim teknikleri Tablo 2.5’de özetlenmiştir.

Tablo 2. 5. Mikroküre üretim teknikleri ve çeşitleri

Üretim Tekniği	Çeşitleri
Polimerizasyon	Emülsiyon Süspanسیون Misel
Çözücü buharlaştırma yöntemi	Tek fazlı emülsiyon (Yağ/Su, Su/Yağ, Yağ/Yağ) Çift fazlı emülsiyon (Yağ/Su/Yağ, Su/Yağ/Yağ)
Faz Ayırımı/Koaservasyon	Basit Kompleks
Dispers fazda jelleşme ve çapraz bağlanma	Gluteraldehit Formaldehit Genipin
Püskürtme	Kurutma ve dondurma

Polimerizasyon yönteminin esası su/yağ emülsiyonundan yararlanarak matriksi polimerize etmeye dayanır. Matriks polimerizasyonunda mikroküreleri stabilize etmek için ortama emülgatör eklenir. Yağ fazı uzaklaştırılır, yıkama, süzme ve kurutma işlemleri sonucu mikroküreler elde edilir.

Çözücü buharlaştırma yöntemi, Emülsifikasyon/süspanسیون ya da misel oluşturma işlemlerini kapsayabilir, iki veya çift fazlı sulu (su) ve organik fazlarda (yağ) gerçekleştirilir. Yöntem, emülsiyon iç fazının karıştırılma yoluyla buharlaştırılması esasına dayanır. Bu yöntemde

de ilaç/çözücü/polimer fazı damlalarının yağ içerisindeki dispersiyonu emülgatör eklenerek sağlanır. Çözücünün uzaklaştırılması için vakum, ısı veya oda sıcaklığında buharlaşma kullanılabilir. Bu teknikle istenilen boyutta mikroküre hazırlanabilir ve uygun çözücü içerisinde çözünebilen ilaçlar polimerik sistemlere hapsedilebilir.

Koaservasyon, kolloidal çözeltilerde sıvı fazların ayrılması olarak tanımlanır. Koaservasyon sırasında, aktif bileşen kaplama polimer çözeltisi içinde dağılabilir ve belirli bir çevresel etkide (iyonik, pH, termal değişim), çekirdek malzeme kabuğu oluşturacak polimer tarafından kapsüllenirken faz ayrımı meydana gelir. Basit koaservasyon, polimerler arasındaki uyumsuzluklara dayanmaktadır. Partikül boyutu esas olarak bileşenlerin özelliklerine (viskozite, yüzey gerilimi) ve karıştırıcı kurulumuna bağlıdır [51].

Püskürtme özellikle ilaç ve gıda endüstrisine özel uygulamalarda kullanılan en iyi bilinen tekniklerden biridir. Püskürtmeli kurutma tekniğinde önce polimerin tamamı diklorometan veya aseton gibi uygun bir uçucu organik çözücü içinde çözülür ve ardından katı haldeki ilaç yüksek hızlı homojenizasyon ile polimer çözeltisi içinde dağıtılır. Bu dağılım daha sonra bir sıcak hava akımı içinde atomize edilir. Atomizasyon, küçük damlacıkların veya çözücünün anında buharlaştığı ince sis oluşumuna yol açar ve bu da 1-100 µm boyut aralığında küresel partiküllerin oluşumuna yol açar. Mikropartiküller, siklon ayırıcı vasıtasıyla sıcak havadan ayrılırken, vakumlu kurutma ile solvent kalıntısı da uzaklaştırılır. Bu işlemin en büyük avantajlarından biri, aseptik koşullar altında operasyon fizibilitesidir [47].

Tez kapsamında, kitosan mikrokürelerin hazırlanmasında yağda/su emülsifikasyon yöntemi kullanılmıştır, yöntem hakkında detaylı bilgi aşağıdaki bölümde anlatılacaktır.

2.12. Emülsiyon Oluşturma Tekniğinin Esasları

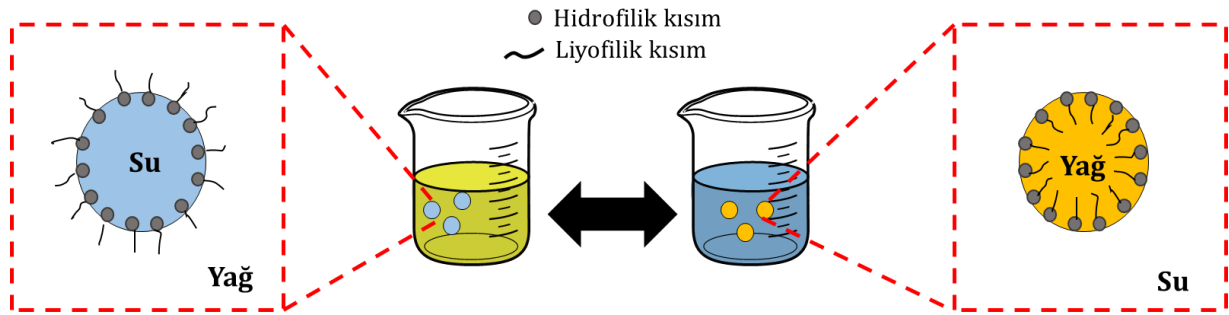
Emülsiyon oluşturma tekniği ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir mikroenkapsülasyon tekniğidir. Bir emülsiyon formülasyonunun geliştirilmesi için birbiri ile karışmayan en az üç bileşene gereksinim vardır. Tablo 2.6'da birbiriyle karışmayan bazı faz bileşenleri görülmektedir.

Tablo 2. 6. Birbiriyle karışmayan bazı faz bileşenleri ve örnek içerikleri

Bileşenler	İçerikleri
Polar yardımcı maddeler	Polioller Butilen glikol Gliserin Polietilen glikoller Propilen glikol Su Esterler Yağlar Lanolin
Nonpolar yardımcı maddeler	Sentetikler (izopropil miristat, izopropil paimitat, gliseril monostearat) Bitkisel yağlar Eterler Yağ asitleri Yağ alkolleri Hidrokarbonlar (Bütan, propan, mineral yağlar, vazelin)
Karışık	Halohidrokarbonlar (perflorokarbonlar, kloroflorokarbonlar) Mumlar, bitkisel ve hayvansal yağlar

Tez çalışması kapsamında sulu polimer çözeltisi bir yağ ve yardımcı maddelerden oluşan bir organik faz ile karıştırılmak suretiyle emülsiyon oluşturulmuştur. Organik faz olarak; ayçiçek yağı, zeytinyağı, susam yağı, mısır yağı veya pamuk yağı gibi organik yağlar kullanılabilir. Yağ ve su fazı her zaman tek bileşen değildir. Her faz yardımcı maddeleri de içerebilir. Hem hidrofilik, hem de hidrofobik kısımları içeren moleküller olarak tanımlanabilen ve daha çok mikrokürelerin stabilitesini arttırmak için kullanılan bu yardımcı bileşenlerden bazıları span 80, tween 20 gibi emülgatörler olabilir. Ayrıca, eterler ve hidrokarbonlarda emülsiyon faz oluşturmada kullanılırlar. Bundan sonra emülsiyon içerisinde elde edilen stabil katı parçacıklar santrifüj yoluyla toplanır. Sonraki aşamada yıkama ve ardından kurutma ile katı parçacıklar elde edilir. Kurutma işleminde, en çok da kullanılan ilaca bağlı olarak, liyofilizasyon yöntemi tercih edilebilir. Sprey kurutucu ya da vakum ortamında da kurutma işlemini yaparak katı mikroküresel parçacıkları elde etmek mümkündür [51,52].

Emülsiyonlar fazlarına göre Yağ/Su, Su/Yağ, Yağ/Yağ, Yağ/Su/Yağ, Su/Yağ/Yağ tipi emülsiyonlar olarak tek ya da çok fazlı olarak sınıflandırılır [53]. Eğer emülsiyon, yağ damlacıklarını su içinde içeriyorsa Y/S (su içinde yağ) emülsiyonu ve su damlacıklarını yağ içinde içeriyorsa S/Y (yağ içinde su) emülsiyonu olarak tanımlanır (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15. Fazlarına göre emülsiyon tipleri

Emülsiyonlar termodinamik olarak dayanıksızdır. Fiziksel olarak dayanıklı bir emülsiyon, raf ömrü boyunca, dağılmış olan fazda hiçbir ayrılma göstermemeli, az bir çalkalama ile homojen olarak ilk durumuna gelebilmeli ve kolaylıkla akabilmelidir. Bekleme sırasında emülsiyonlarda görülen instabilite sorunları aşağıda verilmiştir.

- Kremalaşma
- Flokülasyon
- Koalesans
- Faz ayrışması
- Faz dönüşümü

Bu sorunların üstesinden gelebilmek için faz bileşenlerini ve oranlarını belirleyebilmek oldukça önemlidir.

2.13. Gözenekli Mikroküreler

Gözenekli mikroküreler, sahip oldukları birbirine bağlı dış ve iç gözenek yapısı sayesinde düşük kütle yoğunluğuna ve yüksek yüzey alanına sahiptirler. Gözenekli mikroküreler, midede kalıcı ilaç dağıtımı, alveol hedefli ilaç dağıtımı, yüksek hızlı kromatografi, doku rejenerasyon için iskelelerinin geliştirilmesi ve biyofarmasötiklerin taşıyıcısı olarak umut verici malzemelerdir. Gözenek yapısı ve gözeneklilik, uygulamalarını yöneten ana faktörlerdir [54].

Gözeneksiz mikrokürelerle karşılaştırıldığında, ilaç tutma ve salma özellikleri açısından benzersizdirler. Aktif maddeler genellikle ya yüzeyde adsorbe edilir ya da mikropartikül matrisi boyunca dağılır. İlaçların salım kinetiği kadar yükleme kapasitesi verimliliği de mikro kürelerin gözenekliliğine bağlıdır [55].

IUPAC'a göre, gözenekli malzemeler gözenek boyutlarına (genişliklerine) göre: Mikro gözenekli malzemeler (<2nm), Mezogözenekli malzemeler (2–50nm), Büyük gözenekli malzemeler (>50nm) olarak sınıflandırılabilir [56]. Gözenekli mikrokürelerin üretilmesinde çözücü buharlaştırma, polimerizasyon, sinterleme, faz ayırma, sprey kurutma, dondurarak kurutma ve Kriyojelasyon yer almaktadır. Bu yöntemler arasında son yıllarda geliştirilen ve

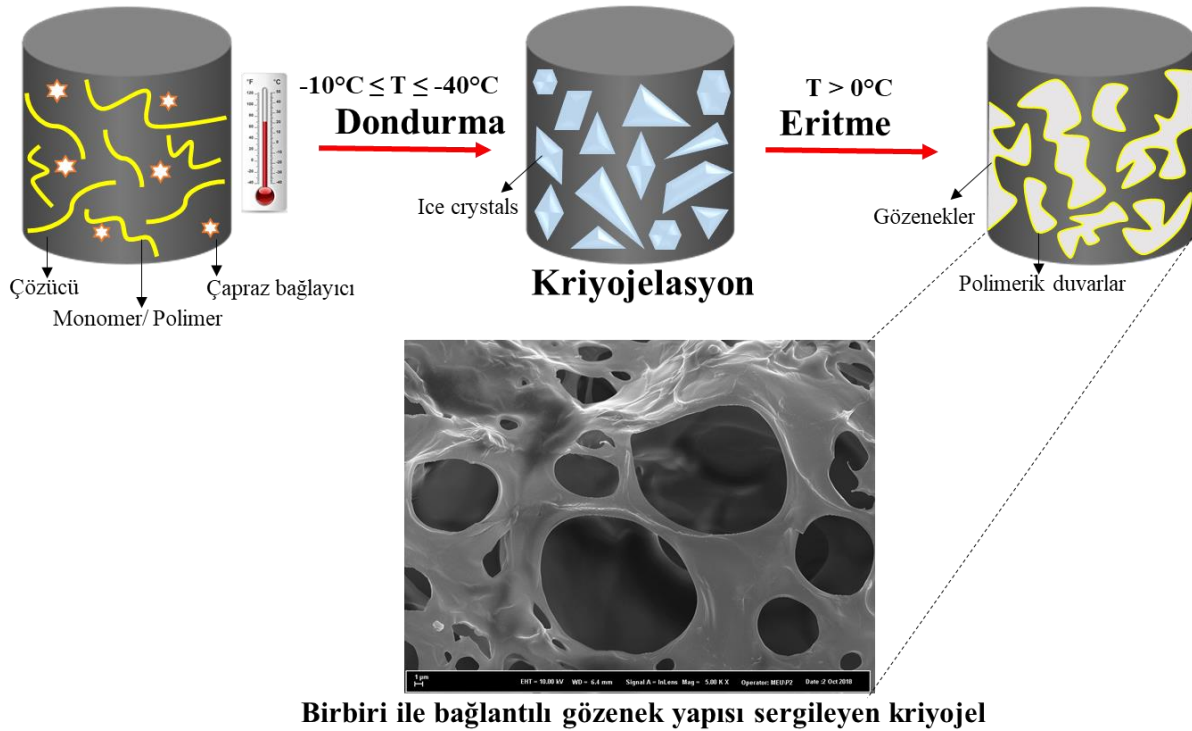
gözenekliliğin yanı sıra birbirine bağlı gözenekli bir yapı serfileyen kriyojelasyon yöntemi sayesinde istenen boyut aralığında jeller üretmek mümkündür.

Yukarıda bahsedilen tüm bu avantajlardan dolayı tez çalışması kapsamında enjekte edilebilir mikrokürelerin gözenekli yapıda olması büyük önem arz etmektedir. Gözeneklilik kriyojelasyon yöntemi ile sağlanmıştır.

2.13.1. Kriyojelasyon Yöntemi İle Gözenekli Mikrokürelerin Üretimi

Hidrojellerin bir türü de biyoteknolojide büyük bir öneme sahip olan kriyojellerdir. Kriyojeller (ya da sıfırın altındaki sıcaklıklarda üretilen jeller), monomerik veya polimerik başlatıcıların donmuş çözeltilerinden üretilen, gözeneklilik derecesi kontrol edilebilen üç boyutlu polimerik jel yapılarıdır.

Kriyojelasyon tekniğinde başlatıcılar, uygun çözücü içerisinde çözülerek hızlı bir şekilde dondurulurlar. Çözücünün dondurulma işlemi sırasında, polimerik başlatıcıları ve donmamış sıvı mikrofazları içeren, buz kristalleri oluşur. Bu sırada çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleşirken; buz kristalleri etrafında ağsı bir yapı oluşmaktadır. Belirlenen sürede reaksiyon tamamlandıktan sonra, çözücünün uygun koşullarda ortamdan uzaklaştırılmasıyla, üç boyutlu makro gözenekli bir yapı oluşturulur. Bu oluşturulan yapı, kriyojel olarak adlandırılmaktadır. Şekil 2.16'da kriyojelasyon tekniğinin ayrıntıları şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2. 16. Kriyojelasyon tekniği basamaklarının şematik gösterimi

Kriyojenik koşullarda çapraz bağlama sonucu üretilen polimerik jellerin morfolojik yapıları oda sıcaklığında hazırlanmış hidrojel olarak adlandırılan matrisler ile karşılaştırıldığında oldukça farklıdır. Hidrojel şeklini koruyabilen bir yapıya sahip değil iken, kriyojel üretildiği şekli muhafaza etmektedir. Bu nedenle de özellikle mekanik mukavemet bakımından kıyaslandığında, hidrojeller zayıf mekanik özellik sergilerler. Kriyojeller ise sahip oldukları gözeneklilikten dolayı süngerimsi bir yapı sergilerler bu da onların yüksek mekanik kuvvet altında dahi bütünlüğünü koruyarak, mekanik kuvvet kaldırıldığında eski şekline geri dönebilmelerini sağlamaktadır. Hidrojel ve kriyojel doku iskelelerinin sahip oldukları özellikler Tablo 2.7'de özetlenmiştir.

Tablo 2. 7. Hidrojel ve kriyojel matrislerin karşılaştırılması

Özellikler	Hidrojel	Kriyojel
Stabilite	Düşük	Yüksek
Mekanik dayanıklılık	Düşük	Yüksek
Gözeneklilik Derecesi	Düşük	Yüksek
Şekil	Jel	Sünger
Hazırlama Süresi	Kısa	Uzun

Kriyojellerin süngerimsi yapısı, makrogözeneklere sahip olması, ince film, monolitik kolonlar, disk, boncuk gibi farklı şekillerde üretilme kolaylığı, mekanik kararlılıkları ile de bir araya gelerek bu jelleri biyoteknoloji ve biyomühendislik alanında benzersiz biyomalzemeler haline getirmiştir. Kriyojellerin birbiriyle bağlantılı makro gözenekleri sayesinde nano ve mikro büyüklükteki partiküllerin kütle transferi ve difüzyonun etkin bir biçimde gerçekleşmesi sağlanabilmektedir. Bu nedenle doku rejenerasyonuna/oluşumuna yönelik doku mühendisliği uygulamaları ve kontrollü ilaç salımı uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. Kriyojellerin, gözenek büyüklüğünün ayarlanabilmesi, mikro ve makro gözeneklerin birbiri ile bağlantılı olması ve kolay üretilmesi öne çıkan avantajlarıdır.

2.14. Enjekte Edilebilir Mikroküreler

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamaları, enfeksiyon ve reddedilme riski olmadan çeşitli hastalıkları ya da doku hasarlarını iyileştirmek için invaziv olmayan ya da minimum invaziv olan operasyonlara yönelmiştir ve bunun için enjekte edilebilir doku iskeleleri ve ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemler hasarlı bölgeye implantasyondan sonra o bölgede yapısal stabilite ve mekanik destek sağlayabilmelidir. Aynı zamanda, geçici oldukları için yeterli bir oranda bozunma hızına sahip olurken, bozunma ürünlerinin de toksik olmaması

gereklidir [57]. Özellikle, hücre proliferasyonu ve besin difüzyonları için yeterli iç alan sağlayan açık gözenekli mikroküreler, doku kusurlarının rekonstrüksiyonlarının tamamlanmasına etkili bir şekilde yardımcı olabilirler.

Enjekte edilebilir küre formundaki sistemlerin sahip olduğu avantajlar;

- Cerrahi operasyon süresinin daha kısa olması,
- Cerrahi operasyon sırasında kas dokusuna verilen zararın en az olması
- Ameliyat sonrası ağrının daha az olması, yara boyutunun küçük olması
- Daha hızlı bir iyileşme sürecinin olması
- Minimum maliyetle gerçekleştiriliyor olması
- Hücre taşıyıcılığının yanı sıra hedef organ ya da dokuya kontrollü ilaç salımının da gerçekleştirilebilmesi
- Düzensiz şekil veya boyuttaki defektleri doldurabilmesi şeklinde sıralanabilir.

İlaç salımı yapabilen enjekte edilebilir mikroküreler, geleneksel dozaj formlarına kıyasla daha az uygulama sıklığı, daha düşük olumsuz yan etkiler ve cerrahi bir prosedüre gerek olmaması gibi mükemmel avantajları nedeniyle son zamanlara artan bir ilgi görmektedirler. Bu nedenle, gelişen teknoloji ve yeni yaklaşımlarla beraber ilaç salımı yapabilen enjekte edilebilir sistemlerin geliştirilmesinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

Enjekte edilebilir sistemler arasında yer alan polimerik mikropartiküller, daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi geleneksel emülsifikasyon yöntemleri kullanılarak üretilebilirler. Çap boyutu 250 µm'den daha az ve mikrometre düzeyinde olan bu küçük küresel parçacıklar, 10-18 Gauge iğne çaplı enjektörlerden kolaylıkla geçebilir. Tipik olarak, kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki ayrı üretim yöntemi kullanılarak polimerik jeller üretilebilir. Kimyasal jeller kovalent etkileşimler ile oluşturulurken, fiziksel jeller ısı ve pH değişimleri ile oluşur. Her iki tip enjekte edilebilir jel sistemler, kendi avantaj ve dezavantajlarını içerir. Aşağıdaki bölümde polimerik jel mikroküreler kullanılarak yapılan çalışmalar ve sonuçları tartışılmıştır.

2.15. Literatür Taraması

Sürekli salım yapabilen enjekte edilebilir mikrokürelerin ilk pazar ürünü (Decapeptyl), 1986 yılında Ipsen tarafından geliştirilmiştir. Günümüzde de sürekli salım yapabilen enjekte edilebilir mikroküre ticari örnekleri raflarda bulmak mümkündür. Bunlardan bazıları: Sandostatin LAR (Novartis), Somatuline Depot (Ipsen), Nutropin Depot (Genentech), Vivitrol (Alkermes), Lupron Depot (Takeda), Risperdal Consta (Janssen) ve Trelstar Depot (Watson) şeklindedir [58].

Enjekte edilebilir mikrokürelerin tasarımında önemli bir faktör biyoyumlu ve uygun parçalanma hızına sahip polimerlerin seçimidir. Genel olarak, kullanılan malzemeler doğal ve

sentetik polimerler olmak üzere iki ana bölüme ayrılır. Sentetik polimerler arasında FDA onaylı polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) ve polilaktik asit (PLA) tıbbi ve farmasötik alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal polimerler olarak proteinler (örneğin albümin), jelatin ve kollajen, polisakkaritler (örneğin nişasta, kitosan), dekstran, selüloz ve sodyum aljinat kullanılmaktadır. Doğal polimerler, biyouyumlu ve toksik olmama, biyobozunur olma, antimikrobiyal aktivite özellikleri ve salım davranışlarını kontrol etme avantajlarını sergilerler. Devam eden bölümde, son yıllarda yapılan; ilaç/hormon taşıyabilen enjekte edilebilir ve kontrollü ilaç salımı yapabilen mikroküreler ile ilgili olan çalışmalar irdelenmiştir.

Yuan ve ark. yaptıkları çalışmada, biyolojik olarak parçalanabilen ve FDA onaylı polihidroksialkanoat (PHA) türeviden olan poli(4-hidroksibutirat) (P4HB) sentetik polimerini kullanarak çift faz emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile açık gözenekli mikroküreler sentezlenmiştir. Açık gözenek yapısına sahip mikrokürelerin, yağdan türetilen kök hücrelerin osteoblast farklılaşmasını *in vitro* artırabildiği ve *in vivo* olarak sıçan kalvarial kemik defekti iyileşmesini hızlandırdığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, enjekte edilebilir açık gözenekli P4HB mikrokürelerinin kemik dokusu rejenerasyonunda dikkate değer bir potansiyel sunduğunu göstermiştir [59].

Rosellini ve ark., kalp onarımı için enjekte edilebilir mikroküre formunda yeni bir biyoaktif yapı iskelesinin hazırlamış ve karakterize etmişlerdir. Jellan/jelatin mikroküreler, yağ içinde su emülsiyonu ile hazırlanmış ve doku rejenerasyonunu desteklemek için insülin benzeri büyüme faktörü adsorpsiyon yoluyla mikrokürelere yüklenmiştir. Elde edilen mikroküreler, statik ve dinamik koşullarda hücre kültürü testleri ve *in vivo* testler dahil olmak üzere morfolojik, fizikokimyasal ve biyolojik karakterizasyona tabi tutulmuştur. Mikrokürelerin morfolojik analizi, küresel bir şekil, mikro gözenekli bir yüzey ve ortalama $66 \pm 17 \mu\text{m}$ (kuru koşullar altında) ve $123 \pm 24 \mu\text{m}$ (ıslak koşullar altında) gözenek çapı sergilemiştir. Kimyasal analizi, mikroküre matrisi içinde jellan, jelatin ve insülin benzeri büyüme faktörü-1'in homojen bir şekilde dağılımını göstermiştir. *In vitro* hücre kültürü testleri, mikrokürelerin sıçan kardiyak progenitor hücrelerinin yapışmasını ve küme oluşumunu desteklediğini gösterirken, bir biyoreaktör içinde dinamik süspansiyon kültüründen sonra, hücrelerin hala mikrokürelere yapışık olduğunu ve sitoplazmalarını mikroküre yüzeyine yaydıklarını göstermiştir. *In vivo* olarak, sıçan modelinde mikrokürelerin intramiyokardiyal uygulaması incelendiğinde, odacık genişlemesini, miyokardiyal hasarı ve fibrozu azaltarak iyileşme sağladığı tespit edilmiştir. Genel olarak, bu çalışmanın bulguları, üretilen mikrokürelerin, kalp dokusu mühendisliği için enjekte edilebilir iskele olarak gelecekteki uygulamalar için potansiyel olarak yeterli morfolojik, fizikokimyasal, fonksiyonel ve biyolojik özellikler sergilediğini göstermiştir [60].

Deshmukh ve ark., yaptıkları çalışmada, erlotinib hidroklorür (Erlotinib-HCL) 'ün enjekte edilebilir mikrokürelerin formülasyonuna katılarak, salım davranışlarını incelemişlerdir. Enjekte

edilebilir mikrokürelerin üretiminde polimer olarak polikaprolakton kullanılmış ve suda yağ emülsiyonu çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Erlotinib HCL yüklü mikroküreler, partikül boyutu, *in vitro* salım, *in vivo* uygulama, ve malzemelerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi açısından değerlendirilmiştir. Enkapsülasyon verimliliği %51.2 ve %86.8 arasında değişirken, polimer miktarının kapsülleme etkinliğini etkilediği sonucuna varmışlardır. İlaç ve polikaprolakton polimeri içeren optimize edilmiş formülasyon, 48 saat sonunda %86.8 ilaç tutma verimliliği ve %95.23 sürekli ilaç salımı ile en iyi sonuçları göstermiştir. Erlotinib HCL yüklü polikaprolakton bazlı enjekte edilebilir mikroküreler, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, pankreas kanseri ve boyun kanseri gibi farklı organa özgü kanser türlerinin tedavisinde uzun süre boyunca hedefe yönelik ve sürekli ilaç salınımı için etkili bir şekilde kullanılabilir olduğu sonucuna varmışlardır [61].

Peters ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada, fare gözlerinde intravitreal ilaç dağıtımı için potansiyel ilaç taşıyıcı ve salım mekanizması olarak poli(ester amid) (PEA) veya polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) bazlı enjekte edilebilir mikrokürelerin uygunluğunu incelemişlerdir. Ek olarak, deksametazon yüklü PEA mikroküreleri (PEA + DEX) değerlendirilmiştir. Mikroküreler, emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Kısaca, polimer (PEA veya PLGA) ve diklorometandan (DCM) oluşan organik bir faz, sulu bir polivinil alkol çözeltisi ile emülsiyon haline getirilmiştir. Daha sonra elde edilen emülsiyon, organik solventin buharlaşmasına ve mikrokürelerin sertleşmesine izin vermek için sürekli karıştırma altında tutulmuştur. Son aşamada, katı mikroküreler elde etmek için sırasıyla yıkama, süzme ve dondurarak kurutma işlemlerine tabii tutulmuştur. İlaç yüklü mikrokürelerin hazırlanmasında ise DEX, PEA ve DCM 'den oluşan organik bir fazda dağıtılarak kullanılmıştır. Intravitreal olarak üç farklı mikroküre (PEA, PLGA ve PEA + DEX) enjekte edilmiş ve gözlere etkileri, morfolojik ve fonksiyonel incelemeler kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Enjekte edilen grupların hiçbirisi, çalışma boyunca geri dönüşü olmayan toksik etki belirtileri göstermemiştir [62].

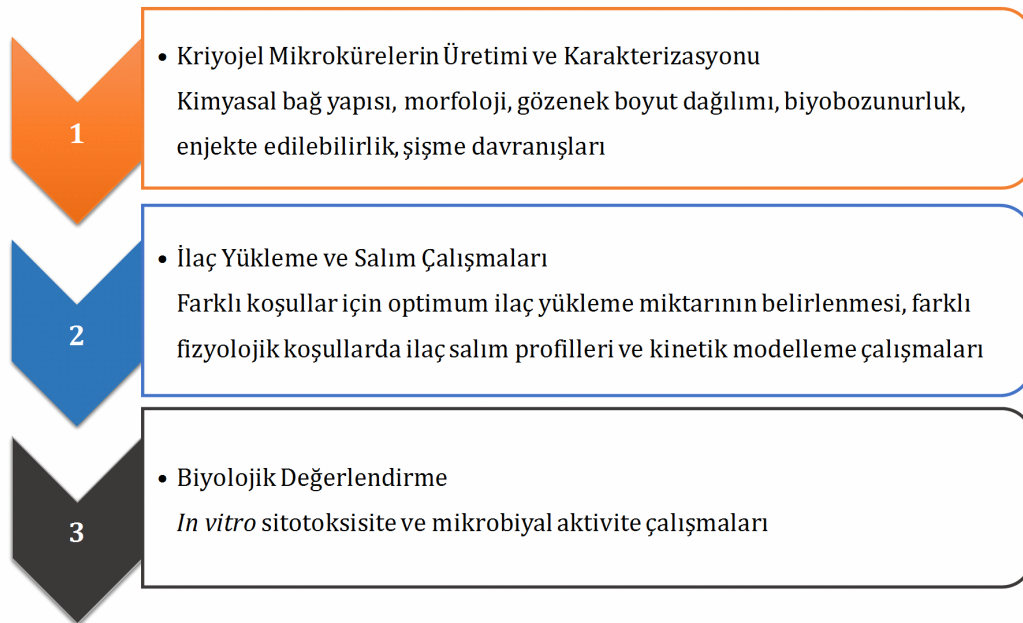
Xu ve ark., yaptıkları çalışmada, uzun süreli salım yapabilen ve lokal anestezi için yüksek ilaç yüklemeli bupivakain (anestezi ilaç) içeren enjekte edilebilir mikroküreler hazırlamışlardır. Bupivakain yüklü PLA veya PLGA mikroküreler suda yağ emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemiyle üretilmiş ve karakterize edilmiştir. Mikrokürelerin uzun süreli ilaç salınımının yanı sıra, mikrokürelerin sıçanlara enjeksiyonundan sonra plazma ilaç konsantrasyonu ve siyatik sinir blokajı araştırılmıştır. Matrisin tipine ve ilacın polimere besleme oranına bağlı olarak, %70'in üzerinde yüksek ilaç yüklenebilen mikroküreler başarıyla elde edilmiştir. Karakterizasyon sonuçları, PLA'dan oluşan gözenekli çekirdek ve bupivakain kristalleri ve PLA tabakasından oluşan yoğun kabuk olarak karakterize edilen yeni bir çekirdek-kabuk mikroküre yapısını göstermiştir. Optimize edilmiş mikroküreler, 5 gün boyunca düşük ve sabit plazma ilaç

konsantrasyonu göstermiştir. Sonuçlar, PLA mikroküre formülasyonunun gözenekli çekirdek-kabuk yapısının, bupivakainin lokal olarak uzatılmış dağıtımı ve postoperatif ağrının kontrolü için enjekte edilebilir bir depo olarak muazzam bir potansiyel sağlayacağını göstermiştir [63].

2.16. Doktora Tez Çalışmasının Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, enjekte edilebilir ve gözenekli mikrokürelerin geliştirilmesi ve ilaç salım uygulamalarında kullanılma potansiyelinin ortaya koyulmasıdır. Mikrokürelerin üretimi için geliştirilen yöntem ile oda koşullarında gerçekleşen klasik yağda su emülsifikasyon yöntemi, daha yeni bir yaklaşım olan kriyojelasyon yöntemi ile biraraya getirilmiştir. Optimum koşullarda üretilen mikroküreler oldukça yüksek yüzey alanı ve bağlantılı gözenek yapısı ile oldukça ilgi çekmiştir. Ayrıca, mikrokürelerin üretiminde doğal bir polimer olan kitosanın kullanılmasıyla yüksek sıvı absorplama kapasitesine sahip, biyolojik olarak uyumlu, yüksek hücre canlılığı sağlayan, biyobozunur ve antimikrobiyal aktiviteye sahip malzemeler elde edilmiştir.

İlaç salım uygulamaları için hidrofilik ve hidrofobik özellikte model ilaç olarak boyar maddeler tercih edilmiştir. İlaç maliyetini düşürmek, gereksiz ilaç kullanımı ortadan kaldırmak ve deney sayısını düşürebilmek adına seçilen boyar maddeler ile salım davranışının belirlenmesi ile diğer birçok ilaç için de uyumlu bir salım sisteminin elde edilebileceği düşünülmüştür. Kinetik salım çalışması ile de malzemenin difüzyon parametrelerinin değişik koşullardaki davranışı irdelenerek ilaç-malzeme etkileşiminin farklı fizyolojik ortamlardaki davranışı da ortaya konmuştur. Doktora tez çalışmasının üç ana bölümden oluşmuş ve bölümlerin aşamaları Şekil 2.17'da şematik olarak özetlenmiş ve devam eden bölümlerde yapılacak çalışmalar sunulan sıraya göre değerlendirilmiştir.



Şekil 2. 17. Doktora tez çalışmasının üç ana bölümden oluşmuş ve bölümlerin aşamaları

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyaller

Mikrokürelerin üretimi ve ilaç salım deneylerinde kullanılan kimyasal malzemeler, özellikleri, deney sistemlerindeki görevleri ve bu kimyasalların temin edildiği firma bilgileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3. 1. Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal	Kullanım amacı	Firma bilgileri
Kitosan, yüksek viskoziteli	Polimer	Sigma Aldrich, USA
Gluteraldehit, 25%, v/v	Çapraz bağlayıcı ajan	Merck, Almanya
Asetik asit, glacial, 100%	Çözücü	Merck, Almanya
Petrol eteri	Organik faz bileşeni	Sigma Aldrich, USA
Span 80, sorbitan monooleate	Organik faz bileşeni Emülsiyonlaştırıcı ajan	Croda, Türkiye
Ayçiçeği yağı	Organik faz bileşeni	Yerel Market, Türkiye
Etanol, Absolute	Sterilizasyon	Merck, Almanya
PBS Tablet	Salım, şişme ve degradasyon ortamı	Merck, Almanya
NaOH	pH ayarlama	Sigma Aldrich, USA
HCl	pH ayarlama	Sigma Aldrich, USA
NaCl	Fizyolojik çözelti	Emir Kimya, Türkiye
NaHCO ₃	Fizyolojik çözelti	Sigma Aldrich, USA
CaCl ₂	Fizyolojik çözelti	Sigma Aldrich, USA

3.2. Cihazlar

İlaç salımı için mikrokürelerin üretimi deneyleri oda koşullarında su/yağ fazı emülsiyonu ve ardından kriyojenik koşullarda çapraz bağlama reaksiyonu ile devam etmiştir. Üretilen mikrokürelerin ilaç yükleme ve salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte kullanılan temel laboratuvar cihazları, kullanım amaçları ve marka/model bilgileri Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3. 2. Deneylerde kullanılan temel laboratuvar cihazları

Cihaz	Kullanım Amacı	Marka bilgileri
Hassas terazi	Tartım	Ohaus Corp. Pine Brook, AR2140, Çin
Etüv	Kurutma	Elektro.mag, M420-P, Türkiye
Çalkalamalı inkübatör	Salım, degradasyon, şişme deneyleri	Daihan Scientific CO. LTD., WiseBath WB-22, Kore
pH metre	pH ayarlama	Mettler Toledo, Portable pH meter SG-23, ABD Velp Scientifica, Digital
Mekanik karıştırıcı	Mikroküre oluşumu	Overhead Strirrer-DLS, İtalya
Manyetik karıştırıcı	Çözelti hazırlama	Heldolph Instruments, MR Hei-Standart, Almanya
Şırınga pompası	Mikroküre damlatma	New Era Pump Systems, NE-300, ABD
Soğutmalı Sirkülatör	Mikroküre çapraz bağlama	WiseCircu WCR – P6 CFC 404 A, Wisd Lab. Inst., Almanya
Liyofilizatör	Dondurarak kurutma	Labconco, FreeZone Benchtop Freeze DrySystem-7670531, USA
UV-Vis	Absorbans ölçümleri	Chebios Optimum-One UV-Vis, İtalya

3.3. Optimizasyon Çalışmaları

Polimer olarak doğal bir polisakkarit olan kitosan seçilmiştir. Yüksek viskoziteli kitosanın çözünmesi için uygun çözücü olarak asetik asit ile denemeler yapılmıştır. Mikrokürelerin oluşmasında hazırlanacak kitosan polimer çözeltisinin yağ faz içerisine kolaylıkla damlatılmaya en uygun akışkanlıkta olması için yapılan görsel denemeler sonucu kitosan çözeltisinin hazırlanmasında saf su içerisinde hacimce %6'lık asetik asit çözeltisi kullanılmasına karar verilmiştir. Enjekte edilebilirliğe uygun optimum partikül çapına sahip mikroküreleri üretmek için farklı polimer (%0.5, %1 ve %2, w/v) ve çapraz bağlayıcı (1%, 3% ve 6%, v/v) konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı (-10, -16 ve -24°C) ve karıştırma hızlarında (500, 1000 ve

1500 rpm) yapılan seri deneyler sonunda optimum deneysel parametreler yapılan daha önceki çalışmalarla belirlenmiştir [64].

Bu kapsamda, ağırlıkça %2'lik kitosan çözeltisi, hesaplanan miktar polimerin tartılarak asetik asidin %6'lık sulu çözeltisinde çözünmesiyle hazırlanmıştır. Kitosan çözeltisi homojen bir karışım için manyetik karıştırıcıda düşük karıştırma hızında 24 saat süre ile bırakılmıştır.

Seçilen polimer konsantrasyonunda üretilecek mikrokürelerin gözenek yapısı doğrudan reaksiyon sıcaklığı ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle, yapılan ön çalışmalar ışığında, homojen yapıda gözenek yapısı için kriyojenik reaksiyon sıcaklığı -16°C olarak seçilirken, çapraz bağlayıcı miktarı %3 gluteraldehit olarak belirlenmiştir.

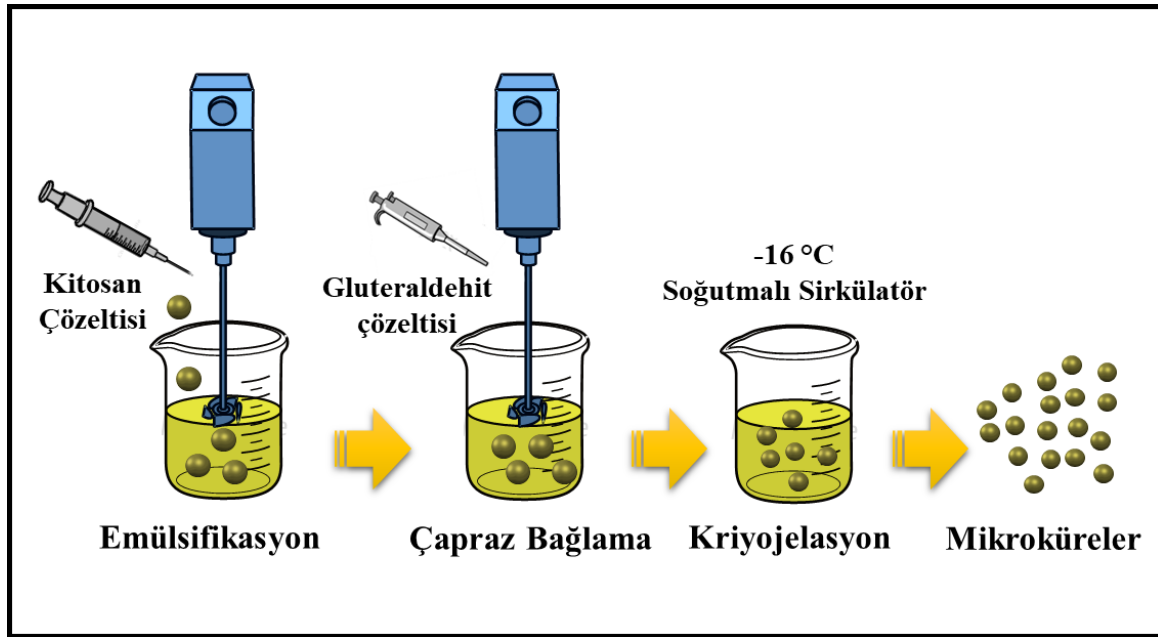
Polimer konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı ve çapraz bağlayıcı miktarının belirlenmesinden ardından oluşan partiküllerin enjekte edilebilirliğe en uygun çapta üretilebilmesi için karıştırma hızı değiştirilerek denemeler yapılmıştır. Bu kapsamda, düşük karıştırma hızlarında mikrokürelerin biraraya gelerek agrede olduğu ve daha büyük çaplı partiküller oluşturduğu, öte yandan yüksek karıştırma hızlarında ise partiküllerin daha küçük çaplarda üretildiği ancak pürüzsüz küresel yapılarını koruyamadıkları görülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak, optimum karıştırma hızı 1000 rpm olarak seçilmiştir [64].

Devam eden bölümde, yapılan ön karakterizyon analizleri sonucunda seçilen optimum çalışma parametreleri kullanılarak mikrokürelerin üretimi detaylı olarak anlatılmıştır.

3.4. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Üretimi

İlaç salım uygulamaları için üretilen kitosan kriyojel mikroküreler, oda koşullarında dağılma ortamı içinde (yağda su, w/o) emülsiyon faz oluşturma ve kriyojenik koşullarda çapraz bağlayıcı ajan varlığında kimyasal çapraz bağlama tekniklerinin bir arada kullanılmasıyla elde edilmiştir. 2 mL polimer çözeltisi (su fazı) şırıngaya alınarak; mekanik karıştırıcıda 50 mL yağ fazına (organik faz, 37.5 mL petrol eteri, 10 mL ayçiçeği yağı ve 2.5 mL span 80 karıştırılarak oluşturulmuştur) damla damla ilave edilmiştir. Ekleme işlemi bittikten 10 min sonra karışıma 0.5 mL gluteraldehit çözeltisi (6%, v/v) hızlıca ilave edilip; kriyojelasyonun gerçekleşmesi için 2 saat -16°C sıcaklıkta soğutmalı sirkülatör (kriyostat cihazında) bekletilmiştir. Dağılma ortamında donmuş olan örnekler, daha sonra aynı sıcaklıkta 24 saat derin dondurucuda bekletilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra örneklerin sıcaklığı oda koşullarına getirilmiştir. Eriyen örnekler sırasıyla hekzan, etanol ve distile suyla yıkanmış, her bir yıkama sonunda örnekler santrifüjle toplanmıştır. Şekil 3.1'de üretim süreci şematik olarak özetlenmiştir.

Yıkanan mikroküre formundaki kriyojellerin şeklini muhafaza ederek kurumasını sağlamak için dondurarak kurutma işlemine tabii tutulmuştur. Bunun için reaksiyona girmemiş reaktanlardan yıkayarak tamamen uzaklaştırılan mikroküreler bir gece boyunca -24°C 'de dondurucuda bırakılmış, ardından tamamen donan örnekler 24 h boyunca liyofilizatör cihazında kurutmaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler polietilen kaplara konarak sonraki çalışmalar için buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 3. 1. Kitosan mikrokürelerin emülsiyon oluşturma ve kriyojelasyon yöntemlerinin birarada kullanılmasıyla üretimini özetleyen şematik gösterim

3.5. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.5.1. Kimyasal Bağ Yapısı

Mikroküre üretiminde kullanılan kimyasallar ve üretilen mikrokürelerin kimyasal bağ yapıları Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometre (FTIR, PerkinElmer, FT-IR/FIR/NIR, ATR) ile belirlenmiştir. FT-IR analizleri $400 - 4500 \text{ cm}^{-1}$ spektrum dalga boyu aralığında yapılmıştır.

3.5.2. Morfolojik Yapı

Üretilen mikrokürelerin küresel dış yapıları optik mikroskop kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojelasyonun sonucu olarak sergiledikleri birbirleriyle bağlı gözenekli iç yapıları ise taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 400F Field Emission, ABD) ile görüntülenmiştir. Mikrokürelerin boyut dağılımı ve gözenek boyutu dağılımları mikroskobik görüntülerin Image-J yazılımı ile analiz edilmesi ile belirlenmiştir. Boyut dağılımı histogram grafikleri en az 50 gözenegin ve 30 mikrokürenin çap ölçümünün yapılması ile oluşturulmuştur.

SEM analizi öncesinde kriyojel mikrokürelerin gözenek yapılarını bozmadan, içerebilecekleri nemin tamamının uzaklaştırılması ve şişmiş haldeki gözenek büyüklüğünün belirlenebilmesi için liyofilizasyon işlemine tabii tutulmuştur. Kuru olan mikrokürelerin yüzeyleri elektrik iletkenliğini sağlayabilmek amacıyla vakum ortamında platin ile kaplandıktan sonra 5 kV'da, farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri alınmıştır.

3.5.3. Enjekte Edilebilirlik

Mikrokürelerin *in vitro* enjekte edilebilirlik özelliklerini göstermek için Sarmadi ve ark. uyguladıkları yöntem, bazı değişikliklerle gerçekleştirilmiştir [15]. İlk olarak iğne ucunun enjekte edilebilirliğe etkisini gözlemlemek için, 1 mL distile suya eşit miktarda mikroküreler eklenerek üç farklı süspansiyon hazırlanmıştır. Daha sonra mikrokürelerin süspansiyonu, bir şırınga pompası (New Era, NE-300) kullanılarak farklı çaplarda iğne uçlarına (18 Gauge, 21 Gauge ve 26 Gauge) sahip plastik enjektörlerden geçirilmiştir. İkinci olarak, optimum belirlenen iğne ucu kullanılarak mikroküre süspansiyon konsantrasyonunun edilebilirliğe etkisi incelenmiştir. Burada konsantrasyon 1 mL distile su içerisindeki mikroküre sayısı olarak tanımlanmıştır. Üç farklı konsantrasyonda (25, 50 ve 100 adet mikroküre/mL saf su) hazırlanan süspansiyonların optimum iğne ucu takılı plastik bir enjektörden yine şırınga pompası kullanılarak sabit akış hızında geçmesi sonucu petri kabında toplanan mikroküre sayısı belirlenmiştir. % Enjekte Edilebilirlik sayısal olarak şu şekilde hesaplanmıştır: Başlangıçta enjektöre aktarılan küresel parçacıklar, optik mikroskop (Eclipse ME600, Nikon, Japonya) altında en az üç kez sayılmıştır. Daha sonra, her bir deney setinde enjektörden geçen mikroküreler bir petri kabında toplanarak yine optik mikroskop kullanılarak en az üç kez sayılmıştır. Mikrokürelerin enjekte edilebilirlik performansları Eşitlik 11 kullanılarak sayısal olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Enjekte edilebilirlik (\%)} = (\text{Petri kabına geçen mikropartikül sayısı} / \text{başlangıçta yüklenen toplam mikropartikül sayısı}) * 100 \quad (11)$$

3.5.4. Farklı Fizyolojik Koşulların Hazırlanması

İlaç yüklü kitosan mikrokürelerin ilaç salım sistemi olarak kullanılabilirliğinin test edilebilmesi için yapay vücut sıvısı ortamlarında salım profilleri ve şişme davranışları incelendi. Bunun için ince bağırsak, mide ve göz yapay sıvıları hazırlandı.

In vitro mide ortamının hazırlanması

Mide ortamını *in vitro* olarak taklit etmek için kullanılacak olan pH 1.5 ortamı 0.1 N HCl çözeltisi ile hazırlandı.

***In vitro* bağırsak ortamının hazırlanması**

İnce bağırsak ortamını *in vitro* olarak taklit etmek için kullanılacak olan 0.01 M pH 6.8 ortamı potasyum fosfat tampon tabletlerinin (PBS) saf suda çözülmesi ile hazırlandı.

***In vitro* gözyaşı ortamının hazırlanması**

Gözyaşı ortamını *in vitro* olarak taklit etmek için kullanılacak ortam (pH 7.4) 0.67 g NaCl, 0.20 g NaHCO₃ ve 0.008 g CaCl₂'ün 100 mL sudaki çözeltisi ile hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 7.4'e ayarlandı.

3.5.6. Farklı Fizyolojik Koşullarda Mikrokürelerin Şişme Davranışlarının ve Kinetiklerinin Belirlenmesi

Mikrokürelerin şişme özelliği üzerine ortamın pH değerinin etki edip etmediği araştırılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan mikrokürelerin, salım çalışmalarının yapılacağı farklı pH değerlerinde hazırlanan *in vitro* mide, ince bağırsak ve gözyaşı yapay ortamlarına bırakılmış, belirli zaman aralıklarında çözeltilerden çıkartılıp mikrokürelerdeki kütle değişimleri kaydedilmiştir. Şişme testleri 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Şişme testleri için mikroküreler dondurarak kurutulmuş ve ağırlıkları kaydedilmiştir (M_0). Kurutulan mikroküreler 37°C'de bekletilen ortamlar içerisine bırakılmış ve belirli zaman aralıklarıyla mikroküreler su içerisinden çıkarılıp üzerlerindeki fazla su kaba filtre kağıdı yardımıyla uzaklaştırılmış ve tartım alındıktan sonra tekrar ortamına bırakılmıştır (M_t). Bu işleme mikroküreler denge şişme değerine ulaşıncaya kadar devam edilmiştir. Mikrokürelerin şişme değerleri Eşitlik 12'de verilen formül ile gravimetrik olarak hesaplanmıştır;

$$\text{Şişme (\%, w/w)} = [(M_t - M_0) / M_0] * 100 \quad (12)$$

3.5.7. Mikrokürelerin Şişme Kinetiğinin Belirlenmesi

Mikrokürelerin şişme davranışlarını anlamak amacıyla şişme kinetikleri araştırılmıştır. Ağ yapılı şişebilen polimerlerin su moleküllerini absorpsiyonu genellikle Fick difüzyon kanunu ile açıklanmaktadır. Fick difüzyon kanunu, aşağıda verilen eşitlikte ifade edilmektedir;

$$F = Q_t / Q_e = k * t^n \quad (13)$$

Eşitlikte; F şişme kesrini, Q_t herhangi bir t anında absorplanan su miktarını (g), Q_e denge anında absorplanan su miktarını (g), k Fick sabitini ve n difüzyon üstelini ifade etmektedir. Eşitliğin doğal logaritmasının alınmasıyla aşağıdaki eşitlik elde edilir;

$$\ln F = \ln k + n * \ln t \quad (14)$$

Eşitlik kullanılarak, $\ln F$ değerlerine karşı $\ln t$ grafiğinin eğiminden (n) ve y eksenini kesim noktasından ($\ln k$) kinetik parametreleri elde edilmektedir. Grafiğin eğiminden elde edilen n değerinin büyüklüğü suyun mikrokürelere difüzyonu hakkında bilgi vermektedir.

3.5.8. *In vitro* Degradasyon

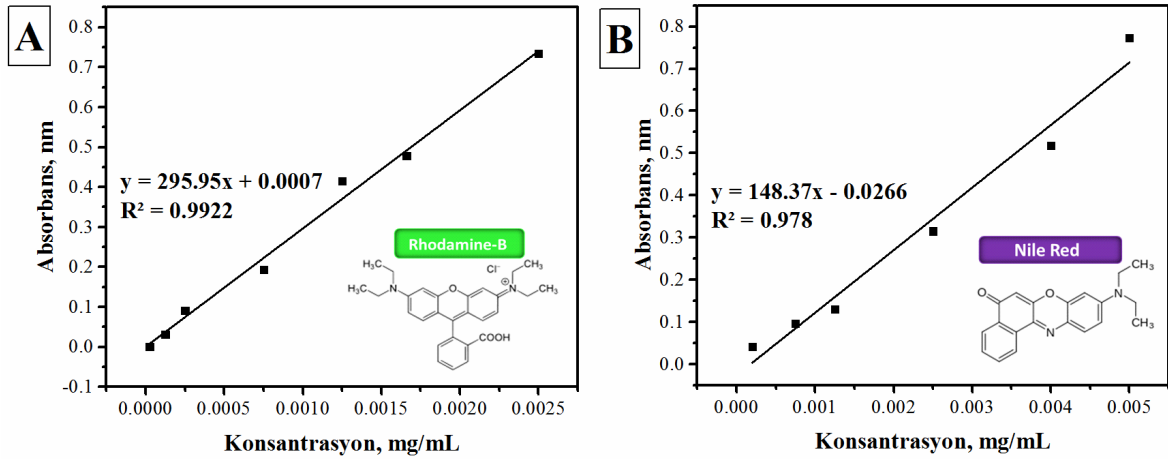
Mikroküre formunda kitosan kriyojellerin degradasyonu PBS içinde, 37°C'de çalkalamalı su banyosu içerisinde (Daihan Scientific CO. LTD., WiseBath WB-22, Kore) izlenmiştir. Kriyojel mikroküre örnekleri eşit miktarlarda (2 mg) sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur, 5 ml PBS içeren kaplara konulmuştur. 30, 60 ve 90 gün sonunda, örnekler ortamdan alınmış ve kurutulmuştur. Daha sonra sürekli degradasyonu incelemek için tekrar distile su içine konulmuştur. Aşağıda belirtilen Eşitlik 15 yardımıyla mikrokürelerin degradasyon oranı olarak belirlenmiştir.

$$\text{Degradasyon oranı, \%} = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100 \quad (15)$$

Burada, W_i : ilk ağırlık, W_f : kurutulduktan sonraki ağırlık olarak tanımlanmıştır.

3.6. Model İlaçların Seçimi ve Çalışma Grafikleri

Model ilaç olarak Nile Red (NR, hidrofobik ilaçlara model) ve Rhodamine-B (RB, hidrofilik ilaçlara model) boyar maddeleri seçilmiştir. Boyar maddelerin enjekte edilebilir mikrokürelere emilimi ve salımı devam eden bölümlerde sunulan deneysel yöntemler kullanılarak detaylı olarak araştırılmıştır. Çalışmanın her aşamasında çözeltide boyar madde derişiminin tayini gerekmektedir. Bu tayin için, UV-Vis bölgede absorbans ölçümü yapılır ve Lambert-Beer yasasından yararlanılarak derişim hesaplanır. Kullanılan boyar maddeler UV-Vis bölgede absorbans yapan bir bileşiklerdir. Bu nedenle spektrofotometre ile tayini mümkün olmuştur. Nile Red boyar maddesinin kantitatif analizini yapmak için 548 nm dalga boyunda ölçümler alınmışken [65], Rhodamine-B analizi için 554 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır [66,67]. Hidrofilik olan Rhodamine-B için çözücü olarak distile su kullanılırken, hidrofobik olan Nile Red etanol içerisinde çözündürülerek kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlara bağlı alınan ölçümler kullanılarak her iki boyar madde için standart çalışma grafikleri çizilmiştir. Şekil 3.2'de Rhodamine-B ve Nile Red boyar maddeleri için elde edilen çalışma doğruları ve denklemleri yer almaktadır.



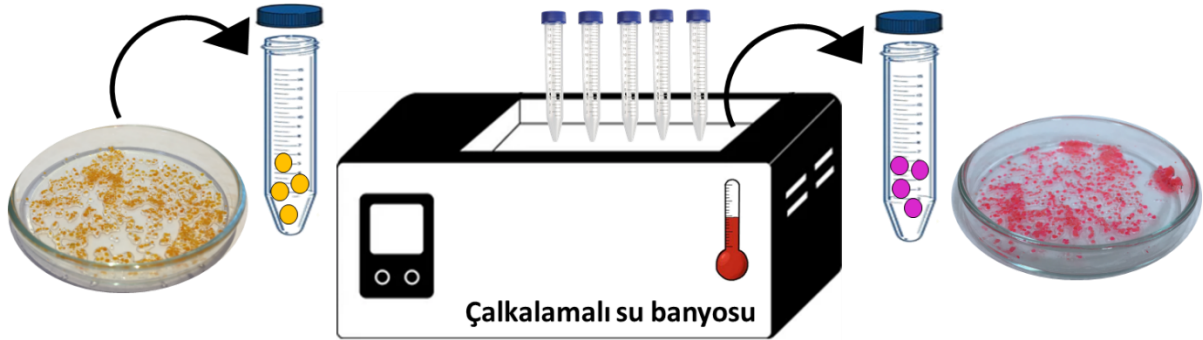
Şekil 3. 2. Rhodamine-B ve Nile Red boyar maddeleri için elde edilen kalibrasyon çalışma doğruları ve denklemleri

3.6.1. Hazırlanan mikrokürelere ilaç yüklenmesi

Tez çalışması kapsamında, yağda su emülsiyon ve kriyojelasyon tekniklerinin bir arada kullanılmasıyla üretilen çapraz bağlı kitosan kriyojel mikrokürelere ilaç yükleme çalışmaları emdirme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Belirli konsantrasyonlarda (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) hazırlanan boyar madde çözeltilerinden 5 mL alınarak cam beherlere yerleştirilmiştir. 5 mg ağırlıktaki kuru mikrokürelere tartılarak boyar madde çözeltileri içine konulmuş ve farklı sıcaklıklarda (25, 35 ve 60°C) manyetik karıştırıcı yardımıyla farklı karıştırma hızlarında (100, 200 ve 500 rpm) ilaç yükleme süresince (24 h) karıştırılmıştır. Mikrokürelere hafif, yapışkan ve elektriklenmeye müsait yapıları nedeniyle her seferinde boyar madde çözeltisinden toplanmasının yerine boyar madde çözeltisi toplanmıştır. Belirlenen sürelerin ardından, mikrokürelere geçmeyeceği bir enjektör yardımıyla tüm boyar madde çözeltisi temiz bir falkon tüpe alınmıştır. Beherda kalan mikrokürelere yine 5 mL taze distile su eklenerek yıkanmıştır. Böylelikle mikrokürelere adsorbe olmayıp yüzeylerine tutunan fazla boyar madde yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Çözeltilerde bulunan boyar madde miktarları UV-Vis spektrofotometre ile belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar sırasında Spekord 210 Plus, Analytic Jena (Almanya) marka model spektrofotometre kullanılmıştır. Başlangıçtaki boyar madde miktarından çözeltilerde (yıkama çözeltisi dahil) kalan boyar madde miktarı çıkarılarak yüklenen miktar belirlenmiştir. İlaç yükleme yüzdesi Eşitlik 16 ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{İlaç Yükleme} = \frac{[(\text{başlangıçtaki boyar madde miktarı} - \text{çözeltide kalan boyar madde miktarı}) / (\text{başlangıçtaki boyar madde miktarı})] \times 100}{(16)}$$

DeneySEL yöntemin şematik gösterimi Şekil 3.3’de özetlenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı yapılmış olup sunulan nihai değerler ortalama değerler olup standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur.



Şekil 3. 3. İlaç Yükleme çalışmaları deney düzeneğinin şematik gösterimi

3.6.2. Mikrokürelerden İlaç Salımı

Salım deneyleri için 14 gün boyunca ilaçla yüklemiş mikroküreler (ilaç yükleme kapasiteleri maksimum olarak belirlenen çalışma koşullarında boyar madde yüklenen mikroküreler), 10 mL hacmindeki ve belirli pH değerlerinde hazırlanan farklı salım ortamlarına transfer edilmektedir. İlaç içeren çözeltiden periyodik aralıklarla 500 µL alınarak 548 ve 554 nm dalga boylarında UV-Vis Spektrofotometre ve çalışma doğrusu kullanılarak ortama salınmış ilaç miktarı belirlenmiştir. Eşitlik 17 yardımıyla mikrokürelerden ortama salınan ilaç miktarı hesaplanmıştır.

$$\text{Salınmış ilaç miktarı} = Q_t / Q_0 \quad (17)$$

Bu eşitlikte Q_t , herhangi bir t anındaki salınmış ilaç miktarını ve Q_0 ise başlangıç ($t=0$) zamanında mikrokürelerde mevcut bulunan ilaç miktarını belirtmektedir.

Salınan ilaç miktarının belirlenmesi için yapılan bu deneylerde salım ortamıyla, ilaç yüklü mikroküreler arasındaki derişim farkının sabit tutulması amacıyla, salım ortamında belirli zaman aralıklarında yenileme yapıldı. Bu amaçla belirli zaman aralıklarında, salım çözeltisinden 0.5’er mL örnek alınıp yerine 0.5’er mL taze çözelti koyuldu.

Bu aşamada, yığın halinde ilaç salımı olup olmadığının gözlemlenebilmesi için başlangıçta örnek alma işlemi daha sık aralıklarla gerçekleştirilirken, daha sonra zaman aralıkları uzatılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar ortalama değerler olup standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur.

3.6.3 Salım Kinetiğinin Belirlenmesi

Çalışmanın son aşamasında elde edilen salım değerlerinden salım tipinin hangi kinetik modele uyduğu tespit edilerek ve en uygun kinetik model belirlenmiştir. Bu amaçla farklı fizyolojik sıvılardan hazırlanan sistemlerin salım datalarından yararlanılmıştır. Bu salım profillerini tanımlayan model, aşağıda verilen modellerden hangisine uygunluk gösterdiği hesaplanarak tespit edilmiştir. İlaç salım kinetiğinin belirlenmesinde *in vitro* kontrollü ilaç salım modelleri olarak Tablo 3.3’de de verilen sıfırıncı dereceden, birinci dereceden, Hixson Crowell, Higuchi, ve Korsmeyer-Peppas matematiksel modelleri seçilmiştir.

Bu eşitliklerdeki Q_t ; t anında ilaç-polimer kompozit formülasyonundan salınan ilaç miktarını, Q_∞ ise, ∞ sürede ortamda bulunan ilaç miktarını yani ilaç-polimer kompozit formülasyonun içerdiği ilaç miktarının tümünü ifade etmektedir. Dolayısıyla, herhangi bir t zamanındaki Q_∞/Q_t oranın 100 ile çarpımı, t zamanında ilaç-polimer kompozit formülasyonundan salınan ilaç yüzdesine (% salım) karşılık gelmektedir.

Tablo 3. 3. Tez çalışması kapsamında salım profillerinin modellenmesinde kullanılan matematiksel eşitlikler

#	Model	Eşitlik
1	Zero order	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
2	First order	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$
3	Hixson-Crowell	$Q_\infty^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$
4	Higuchi	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
5	Korsymeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = K_k t^n$

3.7. Biyoyumluluk Çalışmaları

Kontrollü ilaç salımı çalışmaları tamamlanan enjekte edilebilir mikrokürelerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılma potansiyelinin ortaya konulabilmesi için *in vitro* biyoyumluluk çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde üretilen mikrokürelerin biyoyumluluk testleri yapılmıştır. Direkt ve indirekt testleri metiltiazol difenil tetrazolyum ile yapılmıştır. Ayrıca, hücre morfolojisini belirlemek için SEM görüntüleri incelenmiştir. Sitotoksikite testleri için Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) (CF-1) (ATCC®SCRC-1040™) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal bovine serumu (FBS, Lonza) ve 55 uM beta merkaptotanol içeren Dulbecco’s Modified Eagle Media (DMEM, Lonza, Belçika) besiyeri kullanılarak kültüre edilmiştir. İnkubatör (NUAIRE, NU-5800, ABD) 37 °C’de %5 CO₂ oranında sabit tutulmuştur. Yapılan analizlerin ayrıntıları aşağıda sunulmuştur.

3.7.1. MTT Analizi

Kitosan kriyojel mikrokürelerin üzerindeki MEF hücrelerinin canlılığı MTT analizi ile test edilmiştir. Analizin prensibi, MTT tuzu ihtiva eden sarı renkli MTT çözeltisinin hücre mitokondrisinde bulunan mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanır. İndirgenen formazan kristallerinin yoğunluğu, kültür ortamında bulunan hücrelerin mitokondriyal aktivitesi hakkında, yani buna bağlı olarak hücre canlılığı hakkında bilgi vermektedir.

Test için ilk olarak, doku iskelesinin içinde bulunduğu besi ortamı alınmış ve her bölüme 500 µL MTT çözeltisi ilave edilmiştir. Mor renkli çökelti görünür hale gelene kadar yaklaşık 1 saat inkübe edilmiştir. Görünür mor çökeltilerin oluşmasından sonra, her bölüme 1000 µL izopropanol (Merck, Almanya) ilave edilmiştir. Plakalar, mor çökelti tamamen çözülene kadar yaklaşık 30 dakika inkübe edilmiştir. Her bölümün çözünmüş formazan kristalleri, UV-Vis spektrofotometrede (Shimadzu UV-VIS, UVmini-1240, Japonya) 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Deneyler, üç tekrarlı (n=3) yapılmıştır. Hücre canlılığı, kontrol gruplarına göre normalize edilmiştir.

3.7.2. Direkt Sitotoksosite

Mikroküreler alkol (%70-100) ile steril edildikten sonra üç kez besiyeri ile yıkanmıştır. Direkt sitotoksosite testi için mikroküreler eşit ağırlıkta (0.02 g) bölünerek plakalara (24'lük well plate) eklenmiştir (n=3). Mikroküre doku iskelelerinin üstüne ve kontrol grubu olarak plakalara eşit olarak 100000 hücre eklenmiştir. Tüm plakalar 1, 3 ve 5 gün süreyle 37°C' de %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra besiyeri ortamdaki çekilmiş, MTT assay ile canlılık testi yapılmıştır.

3.7.3. İndirekt Sitotoksosite

Mikroküreler eşit ağırlıkta (0.02 g) bölünerek plakalara (24'lük well plate) yerleştirilmiş (n=3) ve 1, 3 ve 5 gün boyunca besiyeri ortamında 37°C' de inkübe edilmiştir. Daha sonra bu besiyeri ortamdaki alınarak indirekt sitotoksosite testi için kullanılmıştır. İndirekt test için 15000, 10000 ve 5000 MEF hücresi plakalara koyulmuş ve besiyeri doku iskelesi ile inkübe edilmiştir. Kontrol grubu için ise normal (DMEM + %10 FBS + ve 55 µM Beta Mercaptoethanol) besiyeri eklenmiştir. 1 gün için 15000 eklenmiş hücre plaka; 3 gün için 10000 eklenmiş hücre plaka ve 3 günlük inkübasyon için 5000 hücre eklenmiş plaka kullanılmıştır. Tüm plakalar 37°C' de %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda MTT assay ile canlılık testi yapılmıştır.

3.7.4. Hücre Morfoloji Analizi

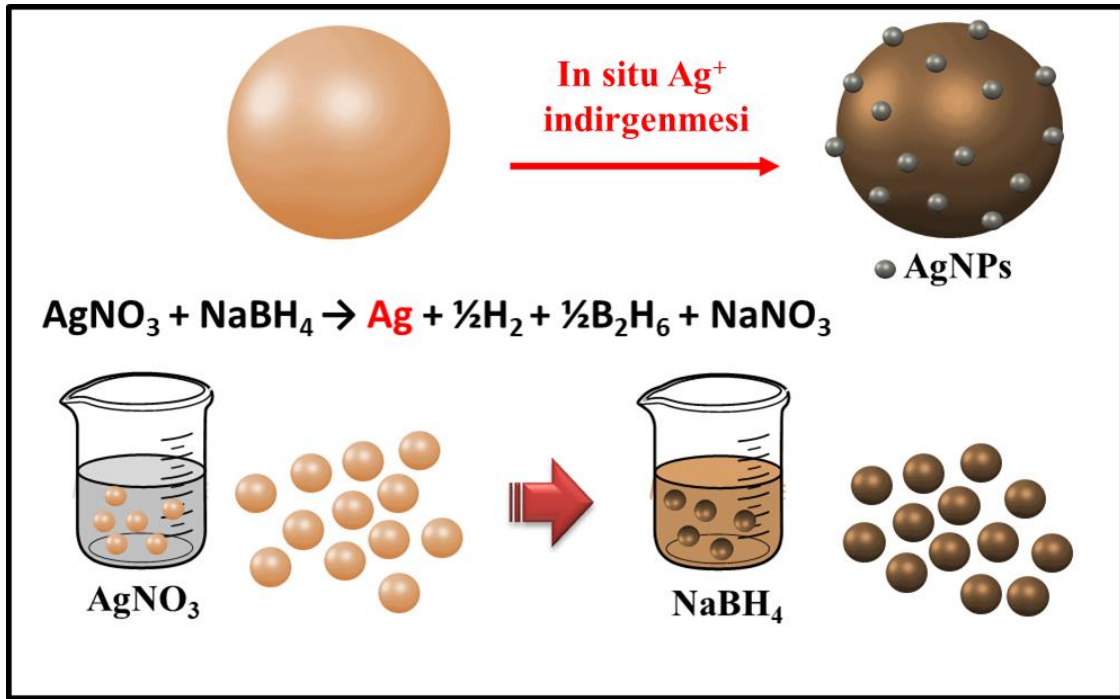
Doku iskelesi üzerine ekilen hücrelerin morfolojisini inceleyebilmek ve değerlendirebilmek için SEM (FE-SEM Zeiss/Supra55, Quanta 400F Alan Emisyonu, ABD) kullanılmıştır. 0.02 g mikroküre için 100000 Mef hücresi ekilmiştir. Hücrenin ekiminden 5 gün sonra, doku iskeleleri 4°C'de 2 saat boyunca %2.5 glutaraldehit ile çapraz bağlanarak hücrelerin bulundukları yer ve şekilde sabitlenmeleri sağlanmıştır. Sabitleme işlemi sonrasında, numuneler PBS ile yıkanarak ve farklı konsantrasyonlarda etanol (30, 50, 70, 90%) kullanılarak dehidre edilmiştir. SEM değerlendirmeleri için örnekler oda sıcaklığında etüvde kurutulmuş ve sonrasında numuneler altın ile kaplanarak hücre morfolojileri incelenmiştir.

3.8. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Üretim, karakterizasyon, kontrollü ilaç salımı ve biyouyumluluk çalışmaları tamamlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin biyolojik aktivite özelliklerinin belirlenmesi için antimikrobiyal analizleri yapılmıştır. Antimikrobiyal özelliğe sahip kitosan polimeri ile üretilmiş mikrokürelerin mevcut aktivitelerine ek olarak, antimikrobiyal özelliklerini arttırmak için mikroküreler üzerinde AgNPs sentezlenmiştir. Aşağıdaki bölümde AgNPs sentezi ve antimikrobiyal çalışmalar hakkında detaylı bilgiler sunulmuştur.

3.8.1. Mikrokürelerin AgNP'lerin ile Kaplanması

AgNP'lerin kitosan kriyojel mikroküreleri üzerinde in-situ sentezi, bazı modifikasyonlar ile önceki çalışmalarda anlatıldığı gibi bir indirgeyici ajan (NaBH_4) kullanılarak gümüş tuzunun (AgNO_3) kimyasal indirgeme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir [68]. (10 mg), İlk olarak, sabit miktarda kurutulmuş mikroküreler (10 mg), 4 saat boyunca oda sıcaklığında hazırlanan AgNO_3 çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. AgNO_3 konsantrasyonunun AgNPs üretimi üzerindeki rolünü değerlendirmek için üç farklı konsantrasyonda (5, 10 ve 20 mmol.L⁻¹) AgNO_3 çözeltileri hazırlanmıştır. Daha sonra AgNO_3 çözeltisinde şişmiş mikroküreler süzölmüş ve birkaç kez distile su ile yıkanmıştır. Ardından Ag^+ iyonu dahil edilmiş kitosan mikroküreler, NaBH_4 çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Bu reaksiyon, 4°C'de 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. İndirgeme işleminin sonunda, AgNPs kaplı kitosan mikrokürelerinin rengi açık sarıdan koyu kahverengiye değişmiştir. AgNP'lerin kitosan mikroküreleri üzerindeki sentez adımları Şekil 3.4'de gösterilmektedir. Çalışmanın devamında numuneler CH ve xAg-CH olarak adlandırılmıştır; burada CH, chitosan'ın kısaltması iken ve x, mmol.L⁻¹ cinsinden AgNO_3 çözeltisinin konsantrasyonunu temsil etmektedir.



Şekil 3. 4. Kitosan mikrokürelerin antimikrobiyal özelliklerini arttırmaya yönelik in situ Ag⁺ indirgenme reaksiyonuna dayanan yöntemin şematik gösterim

3.8.2. Karakterizasyon Çalışmaları

UV-Vis spektrofotometresi (Chebios Optimum-One UV-vis, İtalya) kitosan mikrokürelerinde AgNP'lerin oluşumunu doğrulamak için kullanılmıştır, absorpsiyon spektrumu, 350-600 nm dalga boyu aralığında analiz edilmiştir.

AgNP yüklü kitosan mikrokürelerin kimyasal bileşimi, 600-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında FTIR spektrofotometresi (PerkinElmer, FT-IR/FIR/NIR Spectrometer Frontier-ATR, ABD) ile belirlenmiştir.

Kitosan mikrokürelerde AgNP'lerin varlığı, SEM analizinden elde edilen görüntüler ve element bileşiminin kantitatif analizini sağlayabilen EDX dedektörü ile doğrulanmıştır.

3.8.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Kitosan ve AgNPs kaplı kitosan mikrokürelerinin antimikrobiyal aktivitesini göstermek için kullanılan mikroorganizmalar şunlardır: *Enterococcus hirae* (ATCC 10541), *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Legionella pneumophila subsp. pneumophila* (ATCC 33152), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) ve *Candida albicans*.

Antimikrobiyal çalışmalardan önce tüm cam malzemeler ve kültür ortamı 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) testi, örneklerin antimikrobiyal yeteneklerini belirlemek için iki kat seri kültür seyreltme deneyi ile

gerçekleştirilmiştir. MIC, mikroorganizmaların görünür büyümesini engelleyen test numunelerinin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır. MIC değerleri, inkübasyondan sonra bulanık metrik deney ile belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda (2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ve 0 mg/mL) mikroküreler içeren seri kültür ortamları, $2 \cdot 10^7$ - 10^8 koloni oluşturan birim CFU/mL içeren bir bakteri kültürü ile ayrı ayrı karıştırılmıştır. Kültür ortamları, döner bir çalkalayıcıda 37°C ve 120 rpm'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu bölümde doku mühendisliği uygulamalarında doku rejenerasyonuna yönelik ilaç salımı yapabilen enjekte edilebilir şekilde minimum invazyon ile kullanılmak üzere hazırlanan küre formunda kitosan kriyojel doku iskelelerinin üretimi, temel karakterizasyon çalışmaları, ilaç yükleme ve salım çalışmaları, ilaç salım mekanizmaları, biyouyumluluk ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili deneysel sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Sentezlenen mikroküre formundaki kriyojellerin karakterizasyonu; farklı fizyolojik koşullar için şişme oranı ve kinetikleri, *in vitro* degradasyon davranışları karakterize edilmiş; kimyasal yapıları ve gözenek morfolojileri FTIR, SEM ve optik mikroskop ile incelenmiştir. Bu veriler ışığında, mikrokürelerin birbiri ile bağlantılı bir gözenek yapısı sergilediği, yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğu, biyobozunur olduğu ve canlı vücuduna enjeksiyonla verilmeye uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

İlaç olarak seçilen hidrofobik ve hidrofilik özellikteki boyar maddelerin mikrokürelere yüklenmesi işlem değişkenleri olarak karıştırma hızı, sıcaklık, başlangıç boyar madde konsantrasyonu gibi değişkenler kullanılarak irdelenmiştir. Optimum koşullarda seçilen ilaç yüklü mikrokürelerin salım davranışları ve kinetik modelleri farklı fizyolojik sıvılar için incelenmiştir.

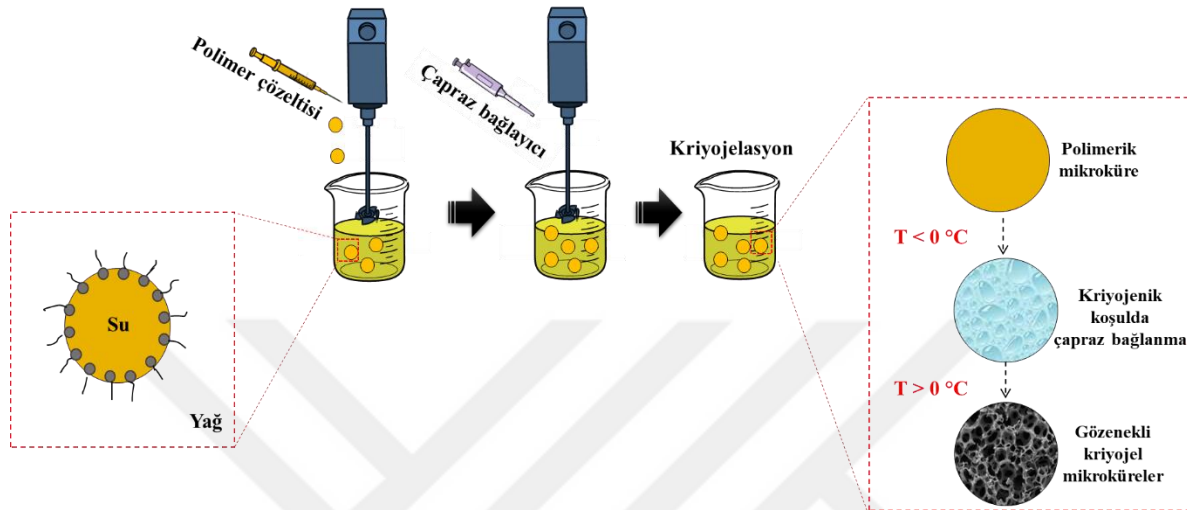
İlaç yükleme ve salım çalışmaları tamamlanan mikrokürelerin biyouyumlulukları ve antimikrobiyal özellikleri detaylı olarak belirlenmiştir.

4.1. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Üretimi

Enjekte edilebilir doku iskeleleri özellikle düzensiz şekilli doku kusurlarının minimal invaziv cerrahi operasyonla doldurularak yenilenmesine veya yeni doku oluşumuna izin veren sistemlerdir. Hatta sergiledikleri gözenekli yapı sayesinde difüzyon ve kütle transferine imkan verdikleri için ilaç salım uygulamalarında da kullanılma potansiyeli oldukça yüksektir. Tez çalışması kapsamında yağda su emülsiyonu ve kriyojenik koşulda çapraz bağlama reaksiyonu birarada yürütülerek kriyojel mikroküreler başarı bir şekilde üretilmiştir (Şekil 4.1). Çalışmanın yenilikçi tarafı klasik emülsiyon yöntemi sonunda çapraz bağlamanın kriyojenik koşullarda gerçekleştirilerek mikron boyutta kütleli olarak hafif ama oldukça geniş yüzey alanına sahip gözenekli küresel parçacıkların üretilmesidir. Üretilen mikrokürelerin görüntüleri Şekil 4.12’de verilmiştir. Kuru formda oldukça hafif ve elektriklenmeye müsait olan malzemeler, su içerisinde süspanse edildiğinde şekillerini korumaya devam etmekte ve zamanla suyu absorplama özelliklerinden dolayı ağırlaşarak dibe çökmektedirler.

Polimer çözeltilerinin viskozite değerleri yağ faz içerisinde meydana gelen damlacıkların boyutunu, morfolojisini ve stabilitesini etkilemektedir. Bu viskozite değeri polimer çözeltisinin

dağılma ortamına damlatılabilirliği açısından küre oluşumuna izin verecek özellikte olmalıdır. Daha önceki çalışmalarımız dikkate alındığında tez çalışmasında kullanılan kitosan polimerinin ağırlıkça %2'lik konsantrasyonda, %6'lık (v/v) asetik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmasına karar verilmiştir. Homojen bir karışımın elde edilmesi için kitosan çözeltisi en az 24 saat süre ile hafif karıştırma hızında çözünmeye bırakılmıştır.



Şekil 4. 1. Tez çalışması kapsamında yağda su emülsiyonu ve kriyojenik koşulda çapraz bağlama reaksiyonu birarada yürütülerek kriyojel mikrokürelerin üretilmesinin şematik gösterimi

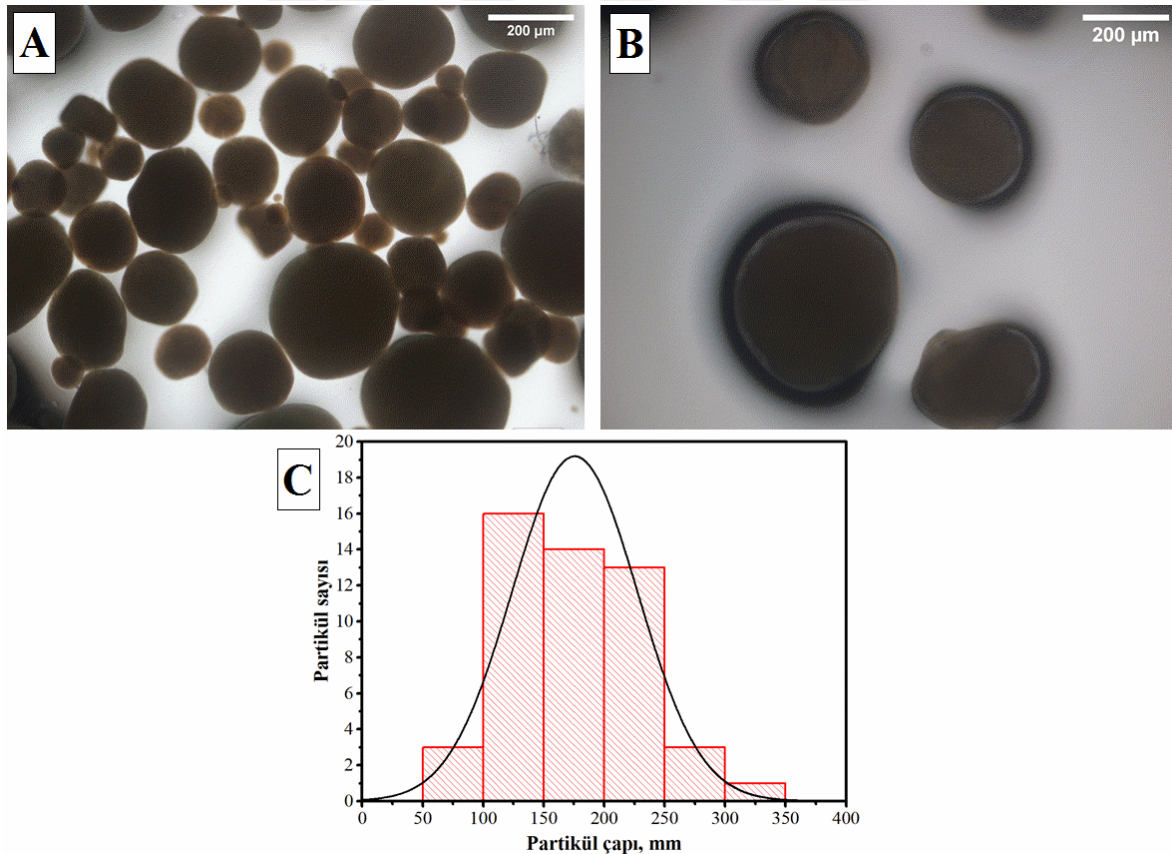


Şekil 4. 2. Üretilen mikrokürelerin petri kabı içerisindeki kuru formda ve enjektör içinde süspansiyon haldeki görüntüsü

4.2. Kitosan Kriyojel Mikrokürelerin Karakterizasyonu

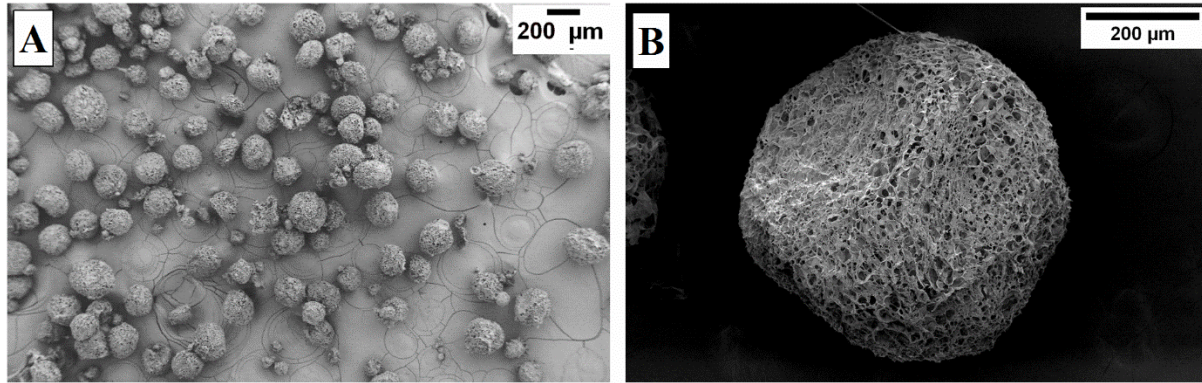
4.2.1. Morfolojik Değerlendirme

Üretilen mikro parçacıkların dış morfolojik yapıları Şekil 4.3A ve 4.3B’de verilen optik mikroskop görüntüleri ile değerlendirilmiştir. Ayçiçeği yağı ve yardımcı maddelerden (Span 80 ve petrol eteri) oluşturulan organik faz içerisine kitosan polimerinin sulu asetik asit içerisinde çözünmesiyle hazırlanan çözeltinin damlatılması sonucu meydana gelen küresel damlacıklar glutaraldehit ile çapraz bağlanarak küresel formlarını korudukları görülmektedir. Image-J yazılımı kullanılarak optik mikroskop görüntüleri üzerinden ölçülen parçacık boyutlarının kullanılmasıyla mikrokürelerin parçacık boyut dağılım histogramı elde edilmiştir (Şekil 4.3C). Farklı büyütmelerde çekilen görüntülerden en az 50 parçacığın ölçülmesiyle ortalama partikül çapı $175.68 \pm 50.95 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer ile küresel partiküllerin mikron boyutta olduğu doğrulanmıştır. Ancak, histogram grafiği incelendiğinde mikron boyuttaki partiküllerin yanında azda olsa makro boyutta partiküllerin de olduğu görülmektedir. Bu nedenle çalışmanın devam eden bölümlerinde mikroküreler $250 \mu\text{m}$ elek açıklık boyutuna sahip elekten geçirilerek homojen partikül boyutunda kullanılmıştır.



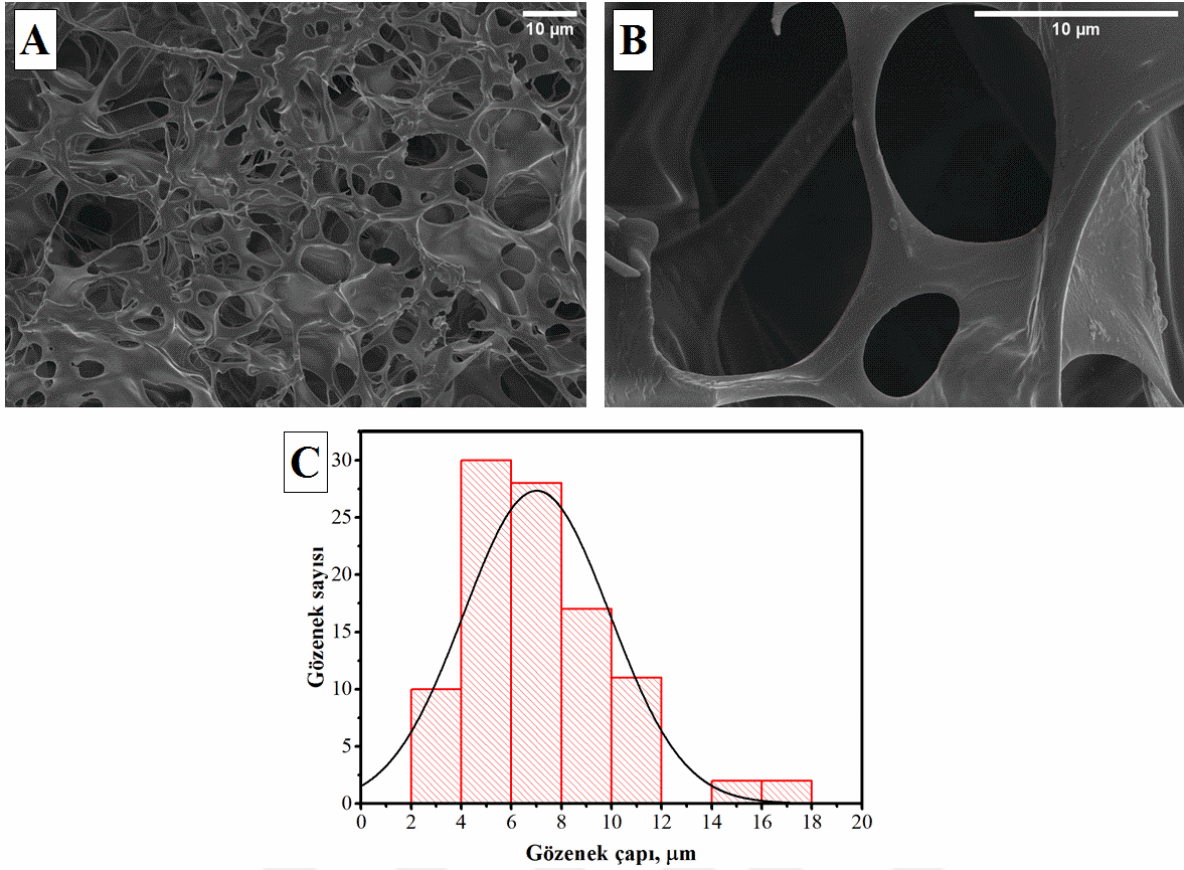
Şekil 4. 3. A, B) Mikrokürelerin dış morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan optik mikroskop görüntüleri, C) Mikrokürelerin parçacık boyut dağılım grafiği

Üretilen parçacıkların küresel yapıları SEM mikroskobu ile de ortaya konmuştur. Şekil 4.4A ve B’de sunulan görüntüler incelendiğinde, küresel, pürüzsüz yapıda ve homojen dağılımda mikroküreler net bir şekilde görüntülenmiştir.



Şekil 4. 4. A) Mikrokürelerin dış morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılan SEM mikroskop görüntüleri, B) Tek bir küresel partiküle ait SEM mikroskop görüntüsü

Üretilen mikrokürelerin iç morfolojilerinin değerlendirilebilmesi için Şekil 4.5A ve B’de sunulan SEM görüntülerinden yararlanılmıştır. Kitosan mikrokürelerin, kriyojelasyon yönteminin sonucu olarak, birbiri ile bağlantılı gözenekli bir yapı sergilediği görülmektedir. Image-J yazılımı kullanılarak SEM görüntüleri üzerinden ölçülen gözenek boyutlarının kullanılmasıyla mikrokürelerin gözenek boyut dağılım histogramı elde edilmiştir (Şekil 4.5C). Farklı büyütmelerde çekilen görüntülerden en az 100 gözenegin ölçülmesiyle mikroküre ortalama gözenek çapı $7.01 \pm 2.90 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. Aynı zamanda histogram grafiği incelendiğinde mikrokürelerin gözenek yapısının mikro ve nano ölçekli olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4. 5. A, B) Mikrokürelerin iç morfolojik yapısının değerlendirilmesinde kullanılan SEM mikroskop görüntüleri, C) Mikrokürelerin gözenek boyut dağılım grafiği

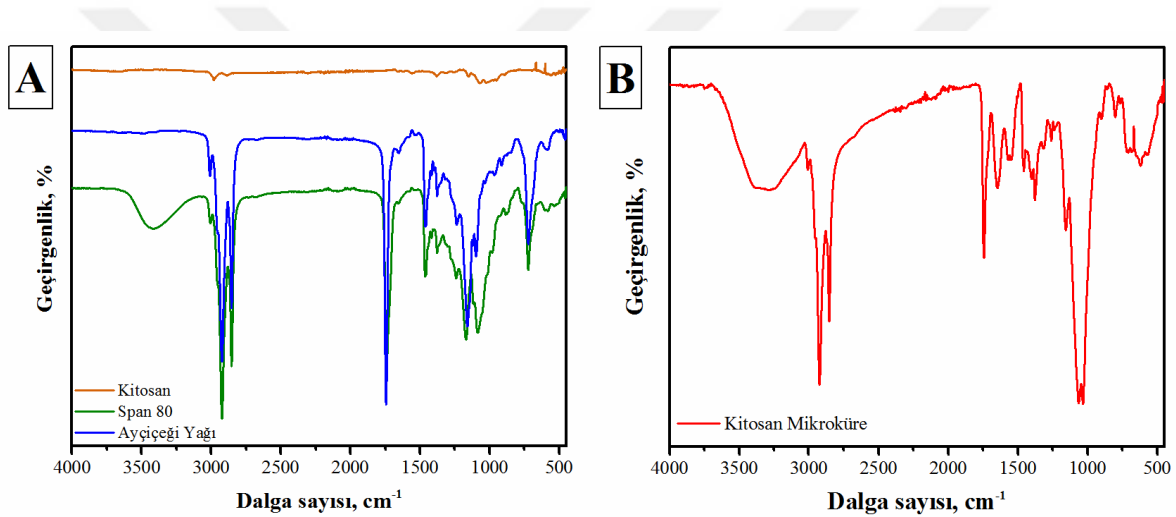
4.2.2. Kimyasal Bağ Yapısı ve Çapraz Bağlanma Reaksiyonu

Kriyojel mikrokürelerin ve hazırlanmasında kullanılan hammaddelerin (kitosan, ayçiçeği yağı ve span 80 emülgatörü) kimyasal yapısı FTIR spektrumları kullanılarak analiz edilmiş ve Şekil 4.6'da sunulmuştur. Kitosana ait karakteristik pikler incelendiğinde; $3448\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$ dalga boyundaki geniş bandın -OH grubuna, 1560 cm^{-1} civarındaki pikin amit I NH_2 eğilmesi pikine, 1560 cm^{-1} de polimer zincirinde bulunan Amit I (NH_2) grubuna ve Amit II (NHCOOH_3) grubuna ait pikler görülmektedir. 2926 cm^{-1} dalga boyundaki pikin ise yine kitosanın karakteristik piki olan CH_2 'nin asimetrik eğilme pikine ait olduğu görülmektedir [69,70].

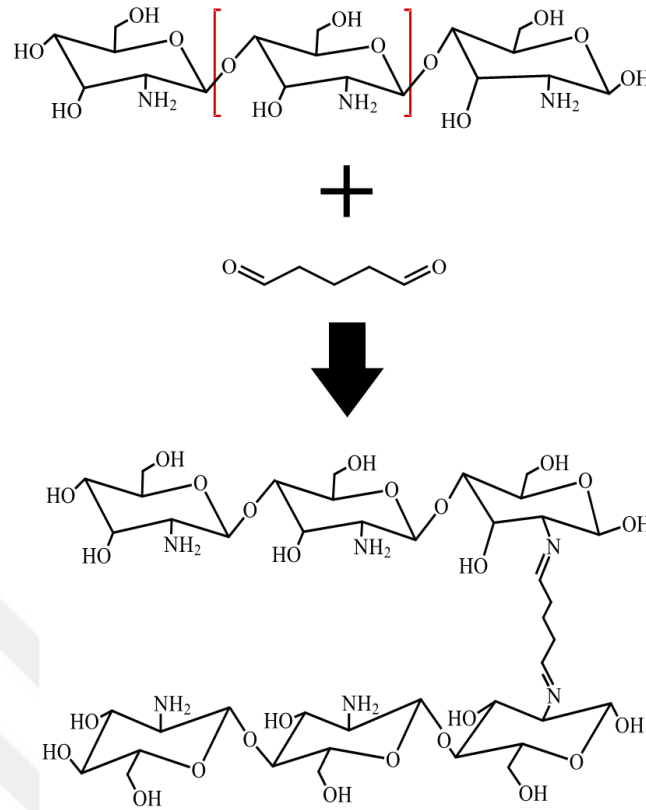
Emülsiyonun oluşturulduğu organik fazı bileşenlerinden Span 80, ayçiçeği yağı ve petrol eteri emülsiyonun oluşmasını sağlayan bileşenlerdir. Bu bileşenlerden petrol eteri uçucu bir bileşendir ve mikroküre üretim prosesi sırasında buharlaşarak malzemeden ayrılmıştır. Ancak, Span 80 ve ayçiçeği yağı hidrofobik yapılarından dolayı yıkama esnasında malzemede kalabilirler. Bu nedenle span 80 ve ayçiçeği yağına ait FTIR spektrumları elde edilmiştir (Şekil 4.5A). Böylelikle üretilen mikrokürelerden yağ fazın yıkamayla uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı hakkında bilgi vermektedir. FTIR sonuçlarında, 1740 cm^{-1} bandında yağların sahip olduğu

karakteristik lipid - ester (C=O) bağının varlığı görülürken, doymamış yağ asitlerinin sahip olduğu etilen bağda (C - H) 2851 - 2923 cm^{-1} band aralığında mevcuttur.

Çapraz bağlanmış mikrokürelere ait spektrum incelendiğinde (Şekil 4.6B) ; 3431 cm^{-1} 'de -OH ve -NH gruplarının absorpsiyon yoğunluğu, kitosaninkinden biraz daha düşüktür, bu da birincil amin grubunun gluteraldehit ile çapraz bağlama reaksiyonunda yer aldığını gösterir [71]. 1725 cm^{-1} dalga boyunda ortaya çıkan C=O bandı, daha büyük bir çapraz bağlama zinciri oluşturmak için gluteraldehitin sulu çözelti içinde kendi kendine polimerizasyonu ile ilgilidir [72]. Gluteraldehitin aldehit grupları ile kitosanın serbest amino grupları arasında Schiff bazı reaksiyonu ile oluşan çapraz bağlanma, 1646 cm^{-1} 'de yer alan N=C imin bağının varlığı ile kanıtlanmıştır. Kitosan ve gluteraldehit arasında meydana gelen reaksiyon Şekil 4.7'de özetlenmiştir.



Şekil 4. 6. Kitosan, Span 80 ve ayçiçeği yağına ait FTIR spektrumlar. B) Kitosan kriyojel mikrokürelere ait FTIR spektrumu



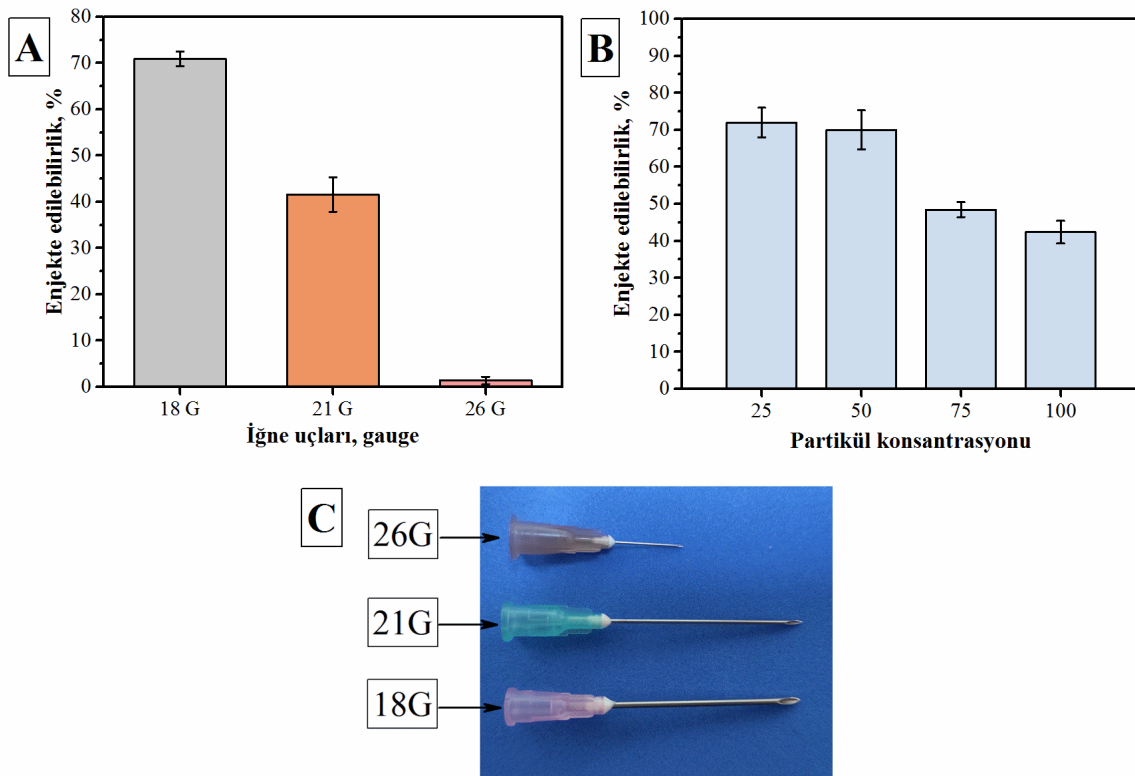
Şekil 4. 7. Kitosan ve glutaraldehit arasında gerçekleşen çapraz bağlanma reaksiyonu

4.2.3. Enjektelerde Edilebilirlik

Uygulamaya bağlı olarak, ilaç dağıtım sistemlerinin tasarımı, salım kinetiğine, malzemenin biyouyumluluğa, degradasyonuna, mikrobiyal özelliklerine ve enjektelerde edilebilirliğine bağlı olarak değişmektedir. Doku rejenerasyonu/oluşumu veya ilaç salımı uygulamalarını içeren doku mühendisliği uygulamalarında biyomalzemelerin minimal invaziv yolla direkt enjeksiyonu hem hasta konforu hem de iyileşme süreci açısından en etkili tedavi olarak kabul edilmektedir.

Tez çalışması kapsamında, daha önce monolit formda üretilen kitosan kriyojel yapı iskelelerini mümkün olduğunca birbirine bağlı gözenek yapısını ve yüksek porozitesini koruyarak enjektelerde edilebilirliğe uygun şekil, boyut ve çapta ilaç salım sistemi üretilmesi hedeflenmiştir. Enjektelerde edilebilirlik; kullanılan iğnenin ölçüsü, parçacık boyutu, parçacık şekli ve konsantrasyonu gibi faktörlere bağlı olarak değişebilir. Mikropartiküllerin enjeksiyon yoluyla yüksek verimli transferi, hastaya doğru dozun verilmesinde önemli bir faktördür [73]. Bu doğrultuda, çalışmanın bu kısmında üretilen mikrokürelerin enjektelerde edilebilirliği farklı konsantrasyonlarda hazırlanan süspansiyonlarının farklı iğne uçlarından (18 Gauge, 21 Gauge ve 26 Gauge) geçme potansiyellerine göre değerlendirilmiştir. Enjeksiyon sıvısı olarak distile su kullanılmıştır. Partikül konsantrasyonu ve boyutun enjektelerde edilebilirlik üzerindeki etkisine

ilişkin elde edilen sayısal değerler ve kullanılan iğneler Şekil 4.8'de sunulmuştur. Ortalama partikül çapı $175.68 \pm 50.95 \mu\text{m}$ olup, yaklaşık 80-300 μm partikül boyutu aralığında üretilen mikroküreler, 18 G iğneden (iç çap: 0.838 mm) kolayca geçerken, tahmin edildiği gibi, daha küçük çaplı iğne uçlarından geçerken enjekte edilebilirlik yüzdesi azalmıştır (Şekil 4.7A). Mikroküreler, çapı 26 G olan iğne ucundan transfer edilememiştir. Ortalama partikül çapı 26 G iğne (iç çap: 0.26 mm) ucundan geçebilecek kadar büyük olmasına rağmen zamanla iğne ucunun içindeki daha büyük partiküllerle çakışmaktadır, bu partiküllerin geçmesi için daha büyük bir kuvvet gerekmektedir ve bir süre sonra, bu kuvvet enjeksiyon sırasında partiküllerin hızlı sedimentasyon ile iğne ucunu tıkamasına neden olur. Bu nedenle optimum enjekte edilebilirlik performansı için partiküllerin partikül boyutuna uygun iğne ucunun seçilmesi gerekmektedir [74]. Tez çalışmasında üretilen mikroküreler için en uygun iğne ucu 18 G olarak seçilmiştir.



Şekil 4. 8. Mikroküre formunda hazırlanan doku iskelelerinin A) farklı iğne uçlarına sahip enjektörlerden geçme oranı, B) partikül konsantrasyonuna bağlı enjekte edilebilirlik değerleri ve C) kullanılan iğne çapları

Enjekte edilebilirlik için belirlenen en uygun iğne ucunun ardından, partikül konsantrasyonuna bağlı enjekte edilebilirlik değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.8B). Partikül konsantrasyonu enjekte edilen 1 mL'lik süspansiyon içerisinde yer alan mikroküre sayısı olarak tanımlanmıştır. Artan partikül konsantrasyonunun ancak belirli bir konsantrasyon eşiği

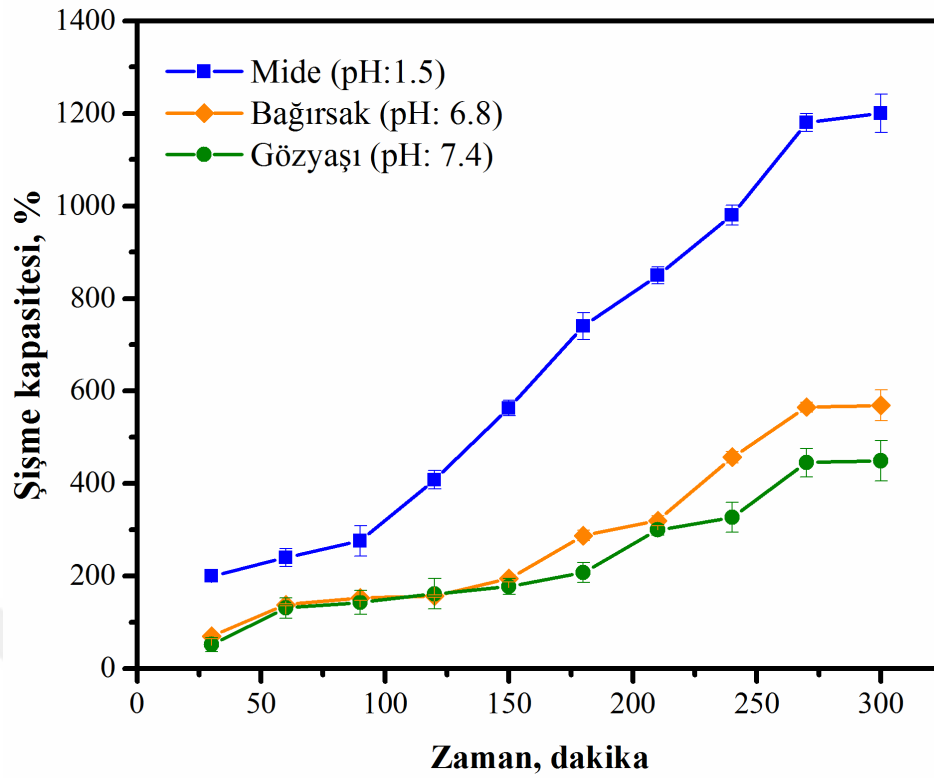
aşıldıktan sonra (yani enjeksiyon hacmi başına 75 ila 100 partikül arasında) etkili olduğu bulundu. 25-50 partikül yüklü çözeltilerin enjekte edilebilirliği hemen hemen aynıken, 75-100 partikül yüklü çözeltilerinin enjekte edilebilirliği ise konsantrasyon artışı ile kısmen azalma göstermiştir. Tüm bu sonuçlar, enjekte edilebilirliğin iğne boyutuna ve partikül konsantrasyonuna bağlı olduğunu ve çoğu durumda 18G iğnenin 21G iğneden daha yüksek parçacık iletimine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

4.2.4. Farklı Fizyolojik Koşullarda Mikrokürelerin Şişme Davranışlarının Belirlenmesi

Tez çalışması kapsamında üretilen çapraz bağlı kitosan kriyojel mikroküreler hidrofilik matrislerdir. Hidrofilik polimer zincirlerinin sulu bir ortamda çözünmesini önlemek ve süper emici bir jel oluşturmak için çapraz bağlama gereklidir [75]. Çapraz bağlama sonucu sulu ortamda çözünme olmaz, ancak kriyojenik koşullarda gerçekleşen çapraz bağlanma sonucu oluşan gözeneklilik yapı ve matrisin hidrofilitesine bağlı olarak yüksek şişme davranışı gözlenebilir. Bu mikrokürelerin sulu ortamlarda hacimsel değişime uğrayıp uğramadıklarının tespiti, malzemelerin uygulama alanlarının belirlenmesinde ve kontrollü salım sistemlerinde kontrol altında tutulması gereken taşıyıcı sistemlerin salım hızları ve salım sürelerinin saptanmasında belirleyici rol oynamaktadır. Bu nedenle, üretilen mikrokürelerin implante edilebilecekleri potansiyel ortamlardaki sıvı tutma kapasitelerinin belirlenebilmesi için şişme davranışları incelenmiştir.

Mikrokürelerin kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılabilirliğinin test edilebilmesi için farklı yapay vücut sıvısı ortamları olarak insan vücudunda karşılaşılabilecek ortamlar ve pH değerleri ile uyumlu olması için ince bağırsak, mide ve göz yapay sıvıları seçilmiştir. Bu amaçla, mide ortamını yansıtan pH 1.5, ardından bağırsak ortamını yansıtan pH 6.8 ve göz ortamını yansıtan pH 7.4 gözyaşı sıvısı içerisinde maksimum şişme kapasitesine ulaşmaya kadar oda sıcaklığında şişme testleri gerçekleştirilmiştir. Mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlardaki şişme değerlerinin zamanla değişimi Şekil 4.9'da görülmektedir.

Tüm fizyolojik ortamlarda, mikrokürelerin yüksek sıvı tutma kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bu, kriyojellerin gözenekli yapısından kaynaklanmaktadır. Bu makro gözenekli yapı; kısa mesafelerde ve ince duvarlar içerisinde su moleküllerinin hızla taşınmasını sağlamaktadır. Bu nedenle de, özellikle ilk 30 dakikalık süreçte mikroküreler hızlı bir şişme davranışı sergilemişlerdir. Mikrokürelerin şişme değerleri artan pH ile birlikte kitosanın amin grupları ile uyumlu olarak azalmıştır. Bu kitosanın serbest halde kalan NH_2 gruplarının asidik ortamda iyonlaşarak NH_3^+ formuna dönüşmesi ve bu dönüşümün matris ağının genişlemesine ve daha fazla suyu bünyesine almasına sebep olmasından kaynaklanır [76].



Şekil 4. 9. Mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlardaki şişme değerlerinin zamanla değişimi

4.2.5. Mikrokürelerin Şişme Kinetiğinin Belirlenmesi

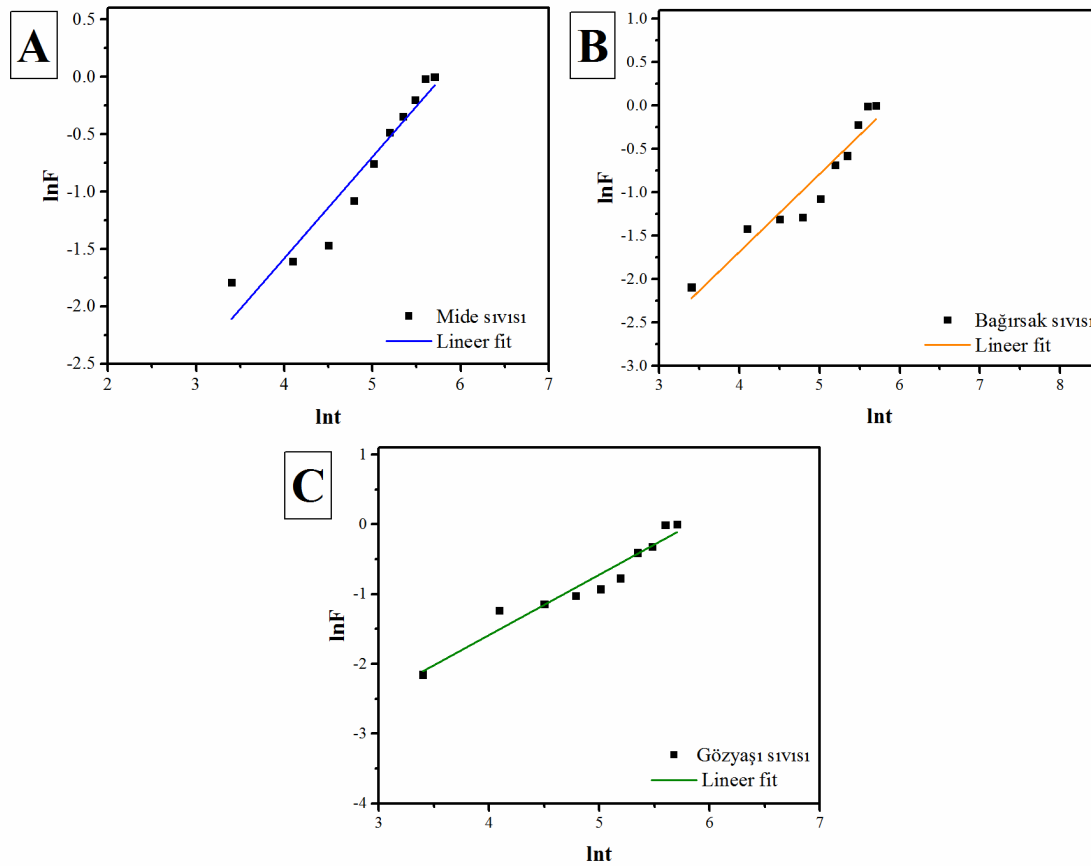
Mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlarda şişme davranışlarını incelemek amacıyla şişme kinetikleri Fick kanununa göre araştırılmıştır. Bunun için Eşitlik 14 ve Eşitlik 15'ten yararlanarak Şekil 4.10'da sunulan $\ln F - \ln t$ grafikleri elde edilmiştir. Şişme kinetiği verileri incelendiğinde, farklı fizyolojik koşullar için arasında şişme davranışı açısından belirgin bir farklılık gözlenmemektedir.

Kinetik verilere göre, mide sıvısı içerisinde şişme davranışı incelenen mikroküreler ilk 150 dakikada denge şişme değerinin yaklaşık %50'sine ulaşırken, bağırsak ve gözyaşı ortamları için bu değere en az 180 dakikada ulaşılmıştır. Absorpsiyon hızı açısından değerlendirildiğinde, mikroküreler yapay mide sıvısını diğer fizyolojik ortamlara nazaran yaklaşık 2 kat daha hızlı bir şekilde absorblamaktadır.

Mikrokürelerin şişme davranışının modellenmesi için, sıvının hidrojele difüzyon türünün, difüzyon hızının ve hidrojin şişmesinde etkin olan kuvvetlerin anlaşılması gerekmektedir. Genellikle su moleküllerinin absorpsiyonu, 1. Fick yasasının, ağ yapılı şişebilen polimerlere uyarlanmış şekli olan "Fick difüzyon kanunu" ile açıklanmaktadır. Jellerin şişme davranışları "difüzyon kontrollü" veya "relaksasyon (gevşeme) kontrollü" olabilmektedir.

$\ln F$ ve $\ln t$ değerleri arasında çizilen grafikten elde edilen doğrunun eğimi ile (n) kinetik parametresi bulunabilir. $0.5 < n < 1$ olması durumunda difüzyon mekanizması, Fick olmayan (Non-Fickian) tiptedir. Bu durumda suyun mikrokürelere difüzyon hızı, polimer zincirlerinin gevşeme hızından daha büyüktür. Dolayısıyla Fick olmayan difüzyonda, hidrojelın şişme hızını, polimer zincirlerinin gevşeme (relaksasyon) hızı belirler.

Çalışma kapsamında, tüm fizyolojik koşullarda gerçekleşen şişme davranışlarına bağlı olarak elde edilen “ n ” değerleri, $0.5 < n < 1$ şartını sağlamaktadır. Bu durumda suyun jele olan difüzyon hızı polimer zincirlerinin gevşeme hızından daha büyük olduğundan, jellerin şişme hızını, yavaş olan adım yani polimer zincirlerinin gevşeme hızı belirler. Sonuç olarak burada Fick olmayan tipte (Non-Fickian) bir difüzyon söz konusudur [77].



Şekil 4. 10. Mikrokürelere farklı fizyolojik ortamlardaki şişme davranışlarına ait $\ln F$ 'ye karşı $\ln t$ grafiği

Tablo 4. 1. Mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlarda şişme kinetiğine ait kinetik parametreler ve korelasyon katsayısı değerleri

Fizyolojik ortam	n	R ²
Mide (pH 1.5)	0.883	0.926
Bağırsak (pH 6.8)	0.898	0.916
Göz yaşı (pH 7.4)	0.865	0.939

4.2.6. Bozunma Davranışı

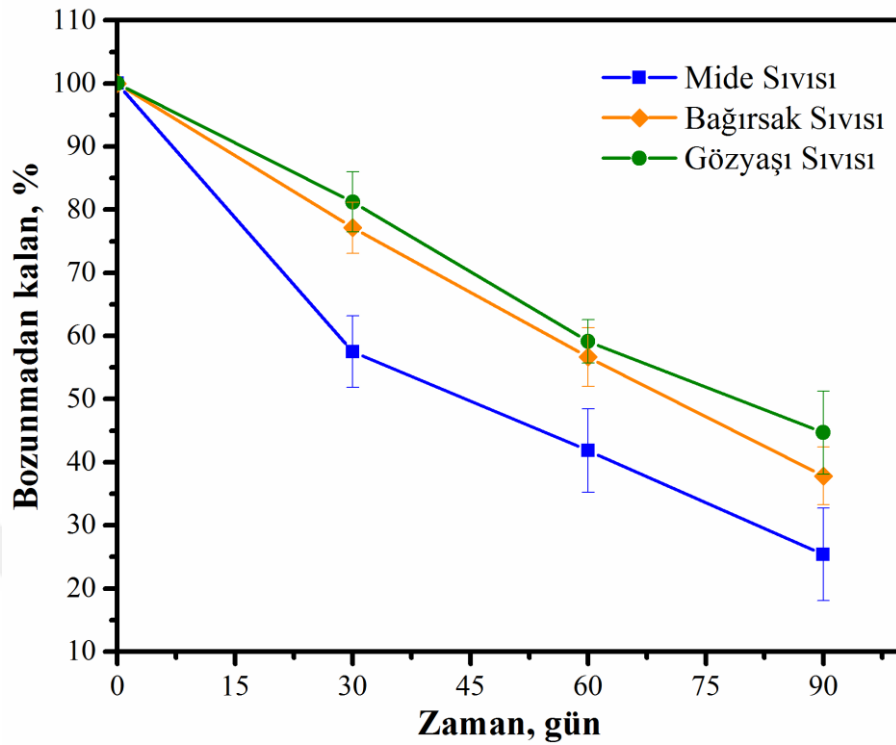
Genellikle biyobozunur/biyouyumlu olarak adlandırılan birçok polimer (özellikle kitosan) ve bunların nano/mikropartikülleri, ilaç dağıtımı ve diğer tıbbi amaçlar için araştırılmış; ancak bozunma mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Polimerlerin bozunması hidroliz, oksidasyon ve enzimatik reaksiyonlarla gerçekleşir. Kitosan, *in vivo* olarak çeşitli enzimler tarafından, özellikle de tüm memeli dokularında bulunan spesifik olmayan bir proteaz olan lizozim tarafından parçalanır ve daha sonra toksik olmayan oligosakkaritlere bölünerek vücuttan atılır [78]. Hidrolitik mekanizma ile bozunma ise polimerdeki zayıf bağların su ile reaksiyonunu içerir ve bozunma reaksiyonunun hızı suyun polimer matrisine erişilebilirliğine bağlıdır [79].

Bu bölümde kriyojel mikrokürelerin degradasyon davranışları, şişme davranışlarının incelendiği farklı fizyolojik koşullar için *in vitro* ortamda hidrolitik olarak incelenmiştir (Şekil 4.8). Çalkalamalı inkübatörde 37°C’de seçilen ortamlar içerisinde takip edilen tüm örnekler, belirlenen zaman aralıklarında yıkanmış, bir gün süreyle -24°C’de dondurucuda bekletilmiş ve 24 h süre ile liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin tartımları yapılmıştır.

Kitosan taneciklerinin *in vitro* bozunmaya bağlı ağırlık kaybı Şekil 4.11’de sunulmuştur. Şekil 4.10’da görüldüğü gibi tüm mikroküreler bozunmuştur ve ağırlık kayıpları birinci ayın sonunda mide sıvısı için %57.51±5.68, bağırsak sıvısı için %77.14±4.04 ve gözyaşı sıvısı için %81.21±4.75 olarak hesaplanmıştır. Tüm örnekleri için inkübasyon süresi arttıkça ağırlık kaybı oranı artmıştır. Farklı pH değerlerine sahip fizyolojik ortamlar için, GA ile çapraz bağlanmış kriyojellerin degradasyon oranı; kitosanın düşük pH’larda yüksek şişme oranı ve gözenek boyutu dağılımı ile ilişkilendirilebilir (Şekil 4.8). Daha yüksek bir şişme oranına sahip kriyojel daha hızlı degrade olur. Diğer bir ifadeyle, daha yüksek bir şişme oranına sahip kriyojelde daha fazla su emilimi olur ve büyük gözenekleri sayesinde suyun daha hızlı taşınması sağlanır.

pH’a duyarlı şişmeye bağlı olarak, asidik ortamda en çok ağırlık kaybı görülsede *in vivo* koşulların aşırı dinamik ve karmaşık doğası gereği *in vitro* ve *in vivo* veriler arasında doğrudan bir karşılaştırma yapmak oldukça zordur. Yine de elde edilen veriler ışığında bozunma hızına

bağlı olarak belirlenecek implantasyon bölgesinde mikroküreler için ilaç salımı yapabilecekleri süre üzerinde tahminler yapılabilir.



Şekil 4. 11. Kitosan Kriyojel mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlarda zamana bağlı *in vitro* bozunma davranışı

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde yapılan analizler sonucunda, doku mühendisliği yaklaşımı ile ilaç salım uygulamaları için emülsiyon ve kriyojelasyon tekniklerinin birarada kullanılmasıyla üretilen mikro yapıdak küresel partiküllerin kimyasal olarak başarı ile çapraz bağlandığı ve bu çapraz bağlanmanın bir sonucu olarak gözenekli bir yapı sergilediği görülmüştür. Farklı implantasyon bölgeleri için şişme değerleri ve degradasyon profillerinde farklılık olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle devam eden bölümde ilaç yükleme çalışmaları ardından ilaç salım çalışmalarının da aynı fizyolojik ortamlar için ayrı ayrı salım çalışmalarının yapılmasına ve kinetik modellerin belirlenmesine karar verilmiştir.

4.3. İlaç Yükleme Çalışmaları

Model ilaç olarak Nile Red (NR, hidrofobik ilaçlara model), Rhodamine-B (RB, hidrofilik ilaçlara model) boyar maddelerinin enjekte edilebilir mikrokürelere Emilimi (adsorpsiyonu) aşağıdaki çalışma koşullarından elde edilen sonuçlar irdelenerek detaylı olarak tartışılmıştır.

Üretilen mikrokürelerin hem hidrofilik hem de hidrofobik model ilaçlar için en yüksek yükleme kapasitesinin belirlenmesi için, farklı sıcaklık (25, 35 ve 60°C), farklı karıştırma hızı (500, 1000 ve 1500 rpm) ve farklı boyar madde konsantrasyonlarına (0.05, 0.1 ve 0.5 mg/mL) bağlı olarak farklı serilerde ilaç yükleme deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Kitosan hidrofilik karakterli, doğrusal zincirli yapısı ve çeşitli bileşikler adsorplama kapasitesine sahip bir polimerdir.

İlk olarak, 0.05-0.5 mg.mL⁻¹ aralığında değişen miktarlarda başlangıç boyar madde konsantrasyonunun NR ve RB yükleme verimine etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2’de görülmektedir. RB incelendiğinde, % yükleme kapasitesinin (%YK) boyar madde derişiminin 0.05 mg/mL’den, 0.1 mg/mL’ye ve 0.5 mg/mL’ye kadar artırılması ile %71.32’den, %80.69’a arttığı ve ardından %77.48’e azaldığı görülmüştür. Yükleme oranındaki ilk artış kitosan mikrokürelerin yüzeyinde artan boyar maddenin adsorbe olacağı uygun bölge sayısının varlığından kaynaklanmaktadır. Ancak, artışın devam etmesiyle doymamış aktif grup kalmadığından desorpsiyon başlamış ve %YK’de az da olsa bir azalma sonucu önemli bir değişiklik olmamıştır [80]. Bu nedenle RB için optimum boyar madde konsantrasyonu 0.1 mg.mL⁻¹ olarak belirlenmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu miktar kullanılmıştır.

NR incelendiğinde, %YK’nin boyar madde derişiminin 0.05 mg/mL’den, 0.1 mg/mL’ye ve 0.5 mg/mL’ye kadar artırılması ile sırasıyla %50.67’den, %51.00’e ve ardından %51.21’e arttığı görülmüştür. Konsantrasyon artışına bağlı meydana gelen bu anlamsız fark kitosanın hidrofobik maddelere karşı olan zayıf ilgisinden olabilir. Yaklaşık %50 civarında elde edilen YK değerleri, etanol içinde hazırlanan NR boyar maddesinin, etanol ile beraber mikroküre gözeneklerine difüzlenmesinin bir sonucu olabilir. Çalışmanın devam eden kısımlarında NR boyar madde konsantrasyonu 0.05 mg/mL olarak belirlenmiştir. YK verimimi arttırmak için, Schiff baz reaksiyonu yoluyla kitosanın yapısındaki amino gruplarına alkil zincirlerinin bağlanması ile hidrofobik olarak modifiye edilmiş kitosan elde edilerek, hidrofobik ilaçlar için afinitesini arttırmaya yönelik denemeler yapılabilir [81].

Tablo 4. 2. Farklı başlangıç boyar madde konsantrasyonlarının ilaç yükleme verimi üzerine etkisi

Boyar madde konsantrasyonu, mg/mL	YK _{RB} , %	YK _{NR} , %
0.05	71.32±2.60	50.67±1.53
0.1	80.69±0.72	51.00±4.12
0.5	77.48±2.41	51.21±7.15

Başlangıç boyar madde konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından, yükleme kapasitesine sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. 25, 35 ve 60°C sıcaklık aralığında mikrokürelere yüklenen NR ve RB miktarları belirlenerek YK% değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3’de görülmektedir. Görüldüğü üzere, her iki boyar madde için de 25°C’den 35°C’ye artan sıcaklıkla adsorpsiyon kapasitelerinin arttığını görülmektedir. Bu oldukça yaygın olan beklenen bir sonuçtur. Artan sıcaklık, sadece boya moleküllerinin hareketliliğini artırmakla kalmayıp aynı

zamanda kitosanın içyapısı içinde bağların genişlemesine bağlı olarak şişme etkisine neden olmuştur. Şişme ile beraber boyar madde ihtiva eden çözeltiler mikrokürelerin gözeneklerine dolmuştur.

Tablo 4.3 incelenmeye devam edildiğinde, şişme etkisine ek olarak RB için 35°C'den 60°C'ye artan sıcaklıkla adsorpsiyon kapasitelerinin YK'sinin sıcaklıkla artması RB molekülleri ve kitosan arasında sıcaklığa bağlı endotermik bir kimyasal etkileşimin meydana geldiğini göstermektedir. Benzer sonuçlar, Hossain ve diğerlerinin yapmış oldukları çalışma da ortaya konmuştur [82]. YK yüzdesi NR için değerlendirildiğinde, 35°C'den 60°C'ye artan sıcaklıkla önemli bir oranda artış olmasada, sıcaklık artışıyla etil alkolde kaynama görüldüğü ve bunun da moleküllerin difüzyonunu arttığı düşünülmektedir. Böylelikle çalışmanın devamında, optimum ilaç yükleme sıcaklığı, her iki boyar madde RB ve NR, için 60°C olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. 3. Farklı sıcaklıkların ilaç yükleme verimi üzerine etkisi

Sıcaklık, °C	YK _{RB} , %	YK _{NR} , %
25	81.86±1.06	51.39±3.65
35	84.08±2.09	52.04±2.81
60	86.87±1.49	55.92±0.85

Başlangıç boyar madde konsantrasyonu ve sıcaklığın belirlenmesinin ardından, yükleme kapasitesine karıştırma hızının etkisi araştırılmıştır. Kitosan mikrokürelere RB ve NR boyar maddelerinin adsorpsiyonuna çalkalama hızının etkisini belirlemek amacıyla değişik çalkalama hızlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. 50, 100 ve 200x rpm karıştırma hızı aralığında mikrokürelere yüklenen NR ve RB miktarları belirlenerek YK% değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'de görülmektedir. Her iki boyar madde içinde, 100 rpm'den 200 rpm'e çıkan yüksek çalkalama hızı adsorplanan madde miktarının daha fazla olmasına yol açmıştır. Ancak, 100 rpm altında çalkalama hızı yüklenen boyar madde miktarını belirgin bir şekilde etkilememiştir. Genel olarak, mikrokürelerin parçacık çaplarının küçük olması adsorplanan moleküllerin parçacıkların etrafına adsorplanmalarının zorlaşmasına ve kütle transfer sınırlamasının oluşmasına neden olmuştur. Düşük çalkalama hızlarında, adsorplanan madde miktarında çok fazla değişimin olmadığı ancak yüksek ilaç yükleme kapasitesi değerlerinde yüksek çalkalama hızının etkin olduğu görülmektedir [83]. Bu sonuçlar doğrultusunda, çalışmanın devamında, optimum çalkalama hızı, her iki boyar madde, RB ve NR, için 200 rpm olarak belirlenmiştir.

Tablo 4. 4. Farklı çalkalama hızlarının ilaç yükleme verimi üzerine etkisi

Karıştırma hızı, rpm	YK _{RB} , %	YK _{NR} , %
50	83.18±1.19	54.46±3.31
100	86.87±0.37	54.59±3.87
200	89.32±1.57	61.51±0.70

Kitosan kriyojel mikroküreler RB ve NR boyar maddelerinin adsorpsiyonu yani maksimum yükleme kapasiteleri için optimum koşullar bulunmuştur. Her iki boyar madde için farklı koşullarda ilaç yükleme deneylerinden elde edilen optimum koşullar Tablo 4.5’de özetlenmiştir. Sonuçlar her iki bileşenin kimyasal yapılarının farklılığından kaynaklanmaktadır. Çalışmanın devamında farklı fizyolojik koşullar için ilaç salım çalışmaları Tablo 4.5’de belirtilen optimum koşullar altında model ilaç yüklenmiş mikroküreler ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. 5. Her iki model ilaç için optimum ilaç yükleme kapasitelerinin elde edildiği çalışma parametreleri

Boyar madde	Konsantrasyon, mg/mL	Sıcaklık, °C	Çalkalama hızı, rpm
RB	0.1	60	200
NR	0.05	60	200

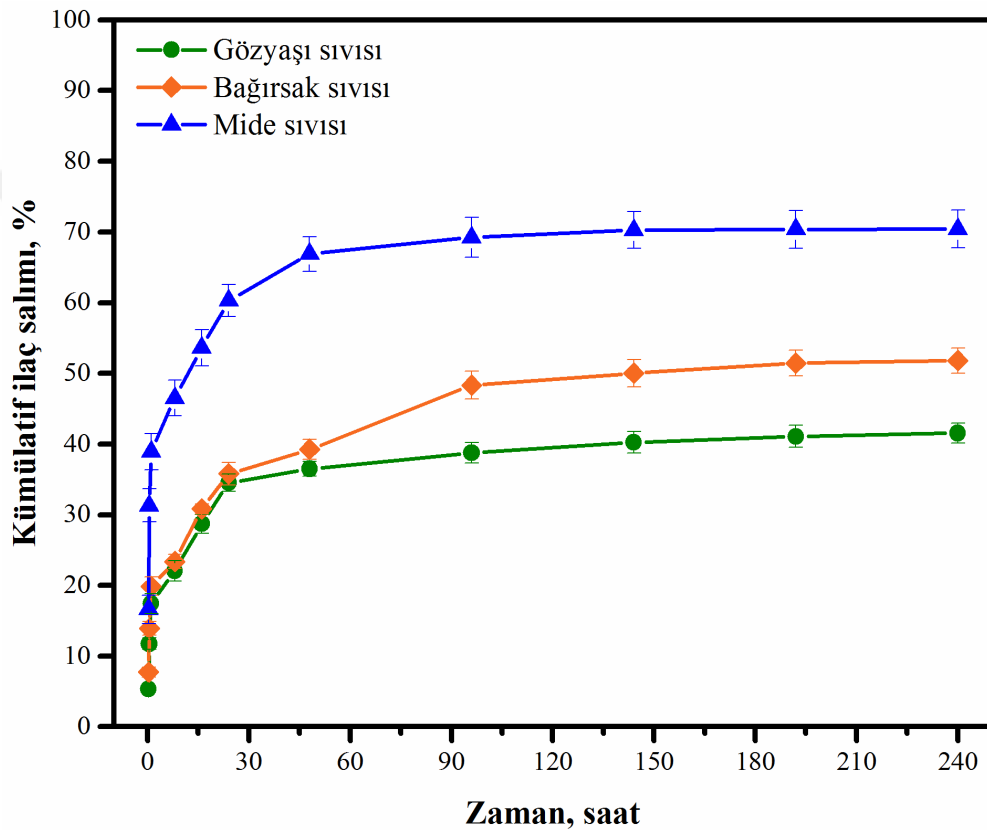
4.4. Mikrokürelerin İlaç Salım Davranışlarının Belirlenmesi

Bir önceki bölümde (Tablo 4.5) seçilen optimum çalışma parametrelerine göre maksimum yükleme kapasitesine sahip RB ve NR yüklenmiş mikrokürelerin salım çalışmaları vücut ortamını taklit etmek için 37°C sıcaklık ve 50 rpm çalkalama hızında sıcaklık kontrollü bir inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı olarak farklı pH’larda hazırlanmış mide, bağırsak ve gözyaşı yapay vücut sıvısı ortamlarından yararlanılmıştır. Her iki boyar madde için tüm fizyolojik koşullarda zamana bağlı salınan ilaç miktarı kümülatif olarak hesaplanmış ve grafiğe geçirilmiştir.

4.4.1. Farklı Fizyolojik Koşullar İçin Mikrokürelerden RB Salım Profili ve Salım Mekanizmalarının Belirlenmesi

Suda çözünebilir, hidrofilik yapıdaki ilaçları temsil etmek üzere seçilen RB’nin salım davranışı incelenmiştir. Şekil 4.12’de salım profili her bir fizyolojik ortam için iki fazlı değerlendirilmiştir. İlk ani salım öncelikli olarak RB difüzyonu tarafından kontrol edilmekte ve genellikle mikroküre yüzeyine bağlı ve yakın bulunan ilaç moleküllerinden kaynaklanmaktadır.

İlacın vücut içerisindeki salımı sırasında gerçekleşen ani salımların yan etkilere sebep olduğu ve ilacın etkinliğini azalttığı unutulmamalıdır. pH 1.5 olan mide sıvısı ortamında RB'nin ani salımı diğer yapay vücut sıvısı ortamlarına göre (pH 6.8 ve pH 7.4) daha yüksektir. Diğer bir deyişle, asidik pH'da boya salınımı fizyolojik ve bazik pH değerlerine göre daha hızlıdır. Çünkü RB yapısındaki karboksilik asit gruplarının asidik ortama yaklaştıkça protonasyonu sonucu katyonik hale gelir ($pK_a \sim 4.2$) ve önemli bir miktar boyar madde ilk 1 saatlik sürede salınır (1 h'de $\%38.90 \pm 2.56$ salım). RB'nin asidik ortamlardaki salım profili benzer çalışmalar ile uyushmaktadır [84,85].

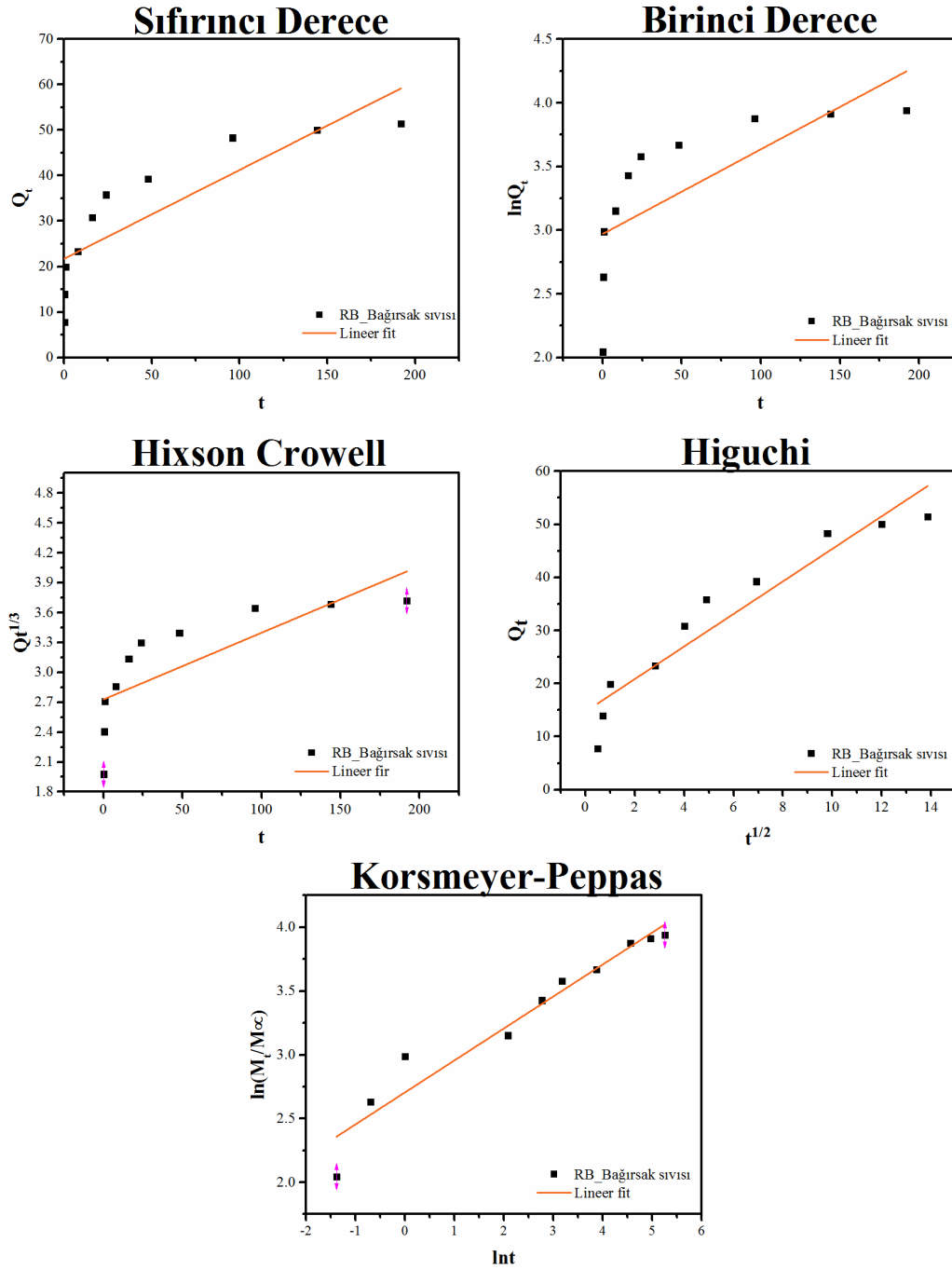


Şekil 4. 12. Mikrokürelerden farklı fizyolojik ortamlarda zamana (15, 30 min; 1, 8, 16 saat; 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 gün) bağlı RB ilaç salımı

İlaç salım mekanizmasını inceleyebilmek için, salım profilleri farklı modellere uyarlanmıştır. RB yüklenmiş mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki *in vitro* salım hızı kinetiği sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson Crowell, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modellerine göre incelenmiş ve ilaç salım kinetiği grafikleri Şekil 4.13'da sunulmuştur. Ayrıca kinetik model parametreleri (R^2 , k ve n) Tablo 4.6'da verilmiştir.

Şekil 4.13'de mikrokürelerin bağırsak sıvısı içerisindeki salım profilinin sıfırıncı mertebe, birinci derece ve Hixson Crowell kinetik modellere uyumunun incelendiği grafikler verilmiştir. Lineer regresyon sonucunda, sıfırıncı mertebe, birinci derece ve Hixson Crowell salım

modellerinin, salım değerleri ile uyumlu olmadığı sonucuna varılmıştır (Tablo 4.6). Buradan, salımın konsantrasyona bağlı olduğu sonucu çıkarılabilir. Ayrıca, Hixson-Crowell modeli regresyon sonucunun düşük çıkması, salımın tabakalar halinde olmadığını da göstermiştir.



Şekil 4. 13. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği grafikleri

Tablo 4.6 incelenmeye devam edildiğinde, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modelleri ile yapılan lineer regresyon sonucunda, her iki modelin de, mikrokürelerin bağırsak sıvı içerisindeki salım profilleri ile uyumlu olduğu anlaşılmıştır. Korsmeyer-Peppas modeline göre elde edilen

salım üssünün değeri onbir salım çalışmasında da $n < 0.5$ olduğundan, salım kinetiği yarı Fickian (quasi Fickian) özellik göstermektedir.

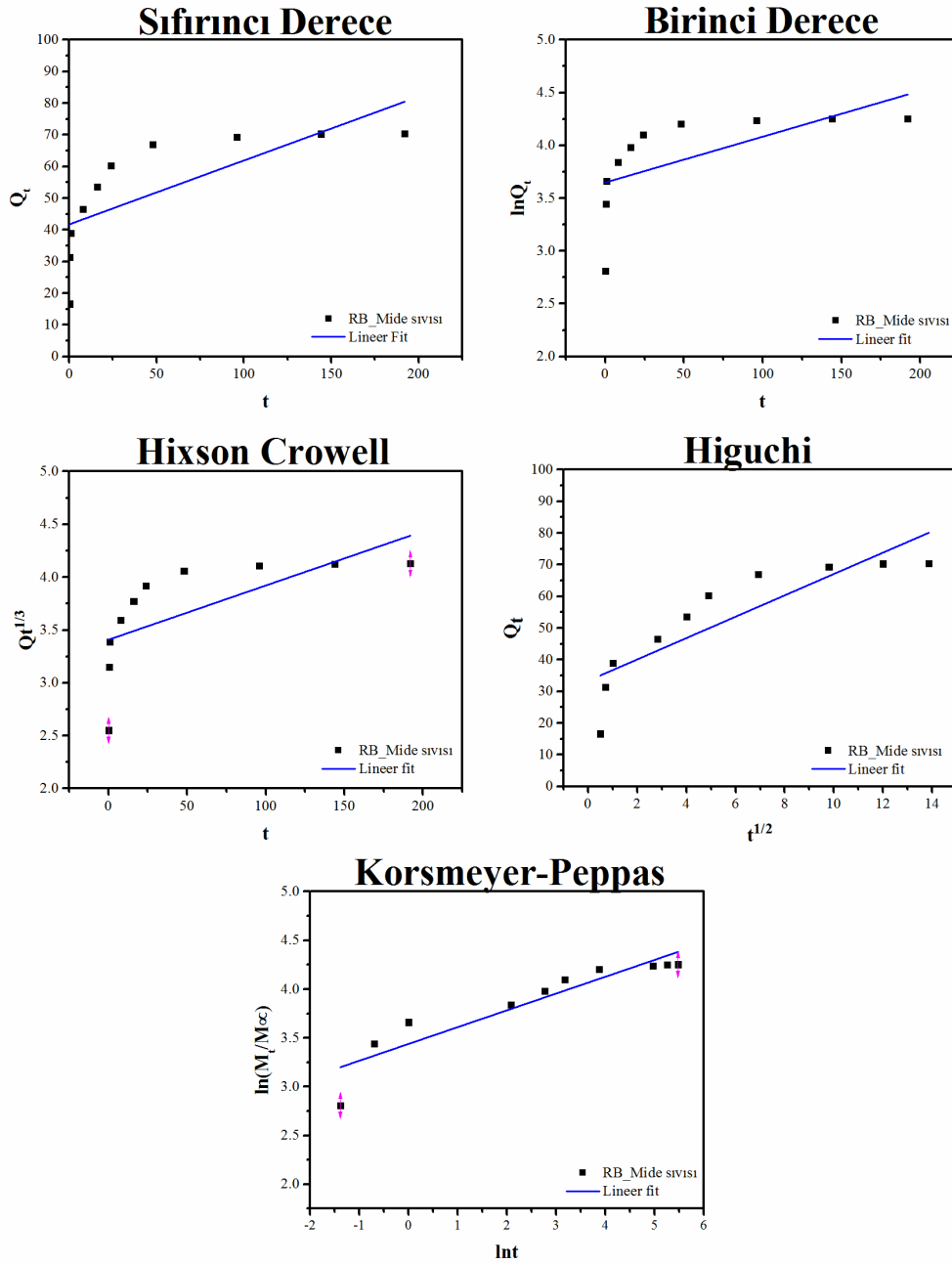
Tablo 4. 6. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması

Kinetik model	Model parametreleri		
	n	k	R ²
Sıfırıncı derece	-	0.186	0.732
Birinci derece	-	0.006	0.509
Hixson Crowell	-	0.006	0.589
Higuchi	-	2.982	0.904
Korsmeyer-Peppas	0.243	15.029	0.938

RB yüklenmiş mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki *in vitro* salım hızı kinetiği sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson Crowell, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modellerine göre incelenmiş ve ilaç salım kinetiği grafikleri Şekil 4.14’de sunulmuştur. Ayrıca kinetik model parametreleri (R², k ve n) Tablo 4.7’de verilmiştir. Mide sıvısı için ilaç salım kinetiği değerleri Korsmeyer -Peppas modeline uyum sağlamıştır. Higuchi Modeli regresyon sonucunun çok yüksek çıkmaması salım sırasında mide sıvısı içerisinde mikrokürelerin henüz bozunmaya uğramadığını gösterebilir. Bozunma sonuçları incelendiğinde salım süresince bozunmanın henüz başlamadığı görülebilir.

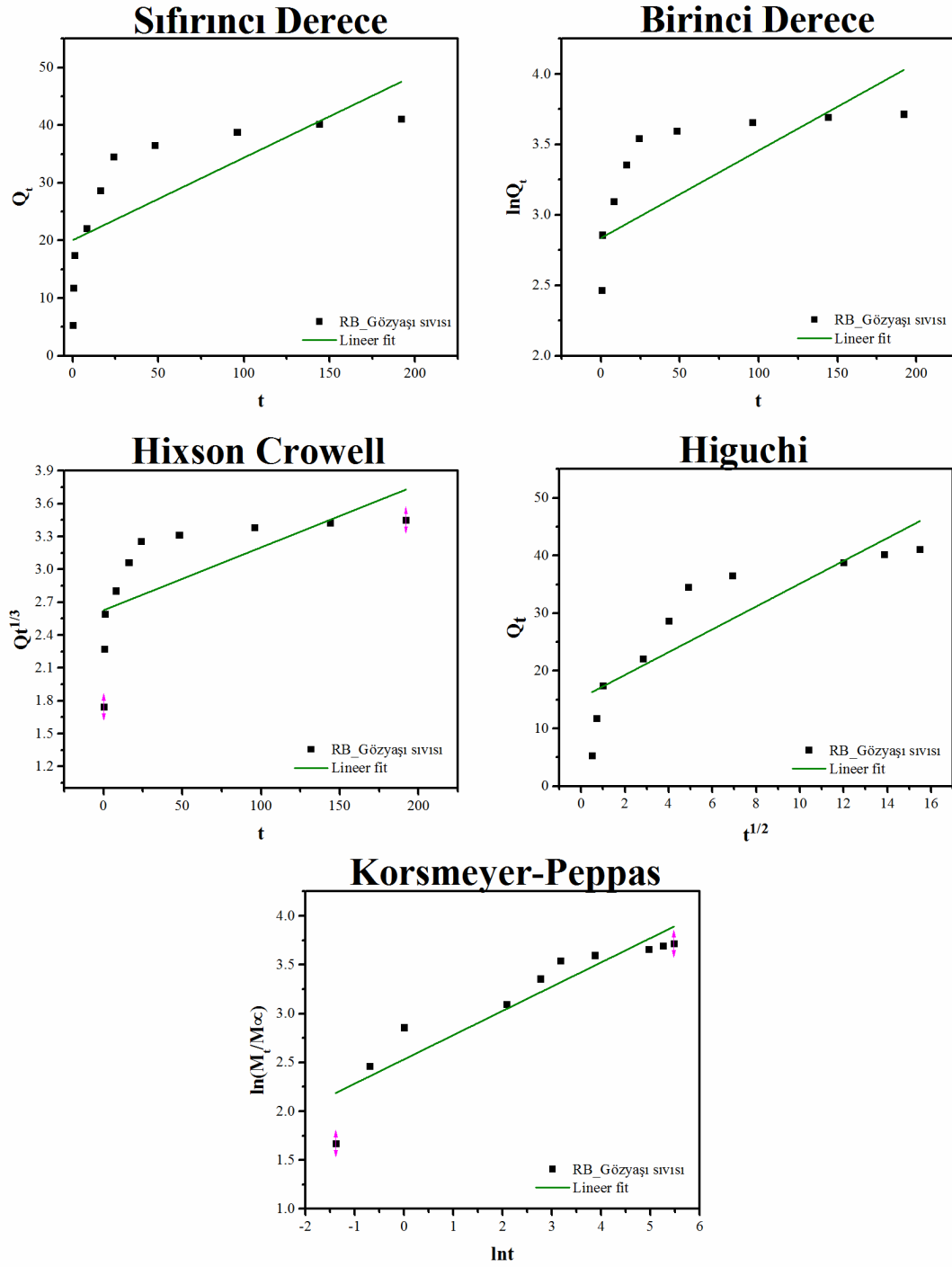
Tablo 4. 7. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması

Kinetik model	Model parametreleri		
	n	k	R ²
Sıfırıncı derece	-	0.189	0.513
Birinci derece	-	0.004	0.372
Hixson Crowell	-	0.005	0.420
Higuchi	-	2.822	0.726
Korsmeyer-Peppas	0.181	30.877	0.895



Şekil 4. 14. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği grafikleri

RB yüklenmiş mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki *in vitro* salım hızı kinetiği sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson Crowell, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modellerine göre incelenmiş ve ilaç salım kinetiği grafikleri Şekil 4.15’de sunulmuştur. Ayrıca kinetik model parametreleri (R^2 , k ve n) Tablo 4.8’de verilmiştir.



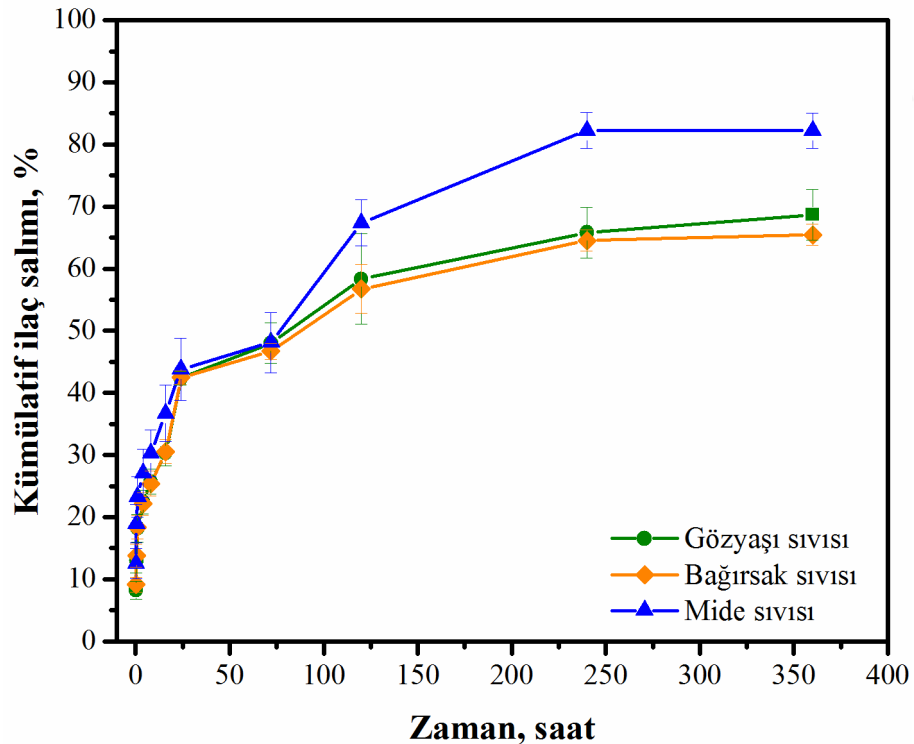
Şekil 4. 15. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği grafikleri

Tablo 4. 8. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki RB ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması

Kinetik model	Model parametreleri		
	n	k	R ²
Sıfırıncı derece	-	0.131	0.533
Birinci derece	-	0.006	0.362
Hixson Crowell	-	0.005	0.421
Higuchi	-	2.244	0.754
Korsmeyer-Peppas	0.248	12.550	0.868

4.4.2. Farklı Fizyolojik Koşullar İçin Mikrokürelerden NR Salım Profili ve Salım Mekanizmalarının Belirlenmesi

RB için salım profillerinin, kinetik modellerin ve modele bağlı parameterlerin belirlenmesinin ardından, NR için de benzer olarak çalışmalara devam edilmiştir. Bu kapsamda, Şekil 4.16'da mikrokürelerin farklı fizyolojik ortamlardaki zamana bağlı salım profilleri sunulmuştur.

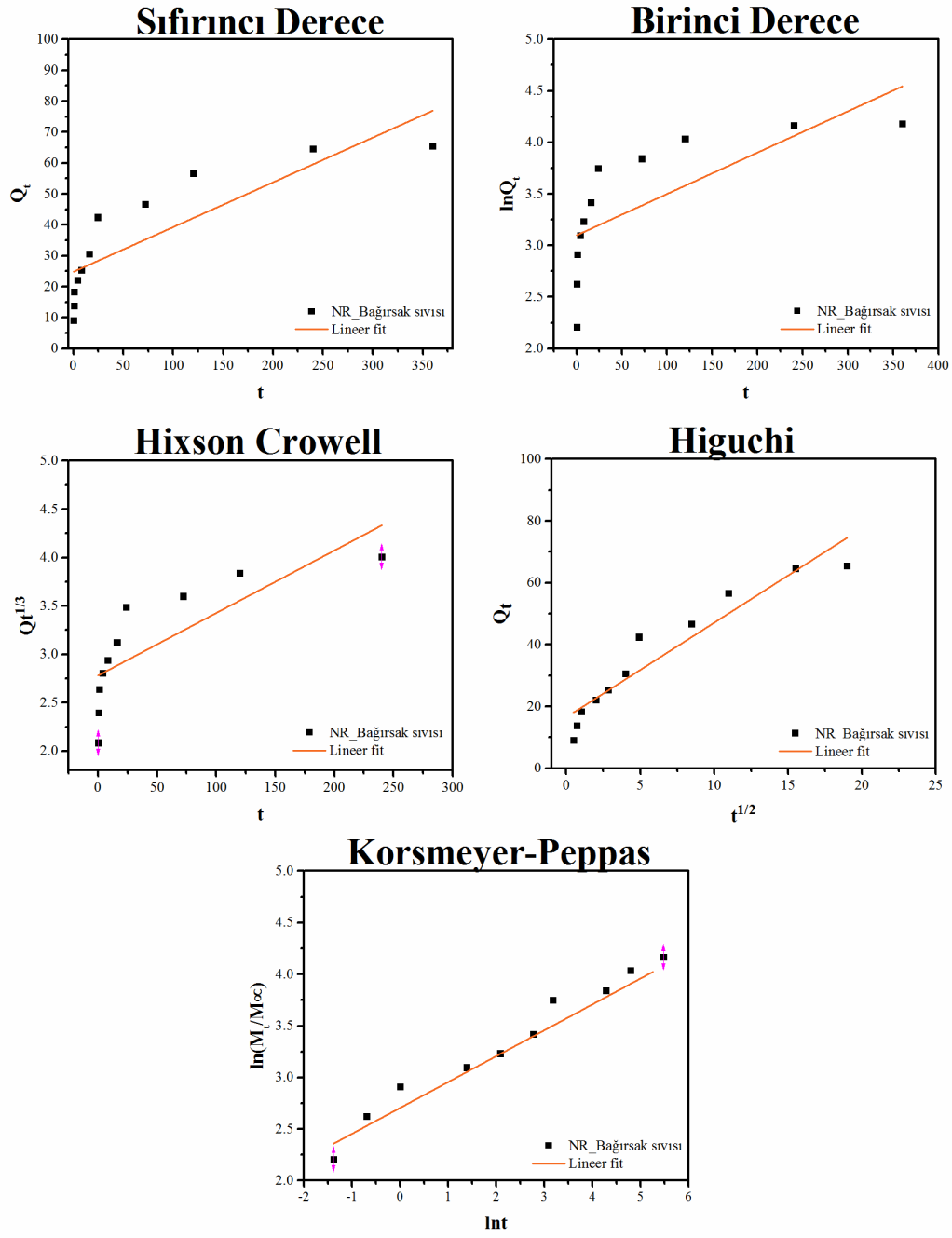
**Şekil 4. 16.** Mikrokürelerden farklı fizyolojik ortamlarda zamana (15, 30 min; 1, 4, 8, 16 saat; 1, 3, 5, 10 ve 15 gün) bağlı NR ilaç salımı

Şekil 4.16’da görüldüğü gibi, tüm salım ortamlarında iki fazlı salım profili görülmüştür. Yapılan salım çalışması kapsamında, salım hızının ani ve çok yüksek olduğu söylenebilir. Tüm numunelerde ilk ani salım oranı fazladır. Yaklaşık 30 dakikalık bir sürede yüksek salım miktarlarına ulaşılmıştır. Bunun nedeninin NR’in hidrofobik yapısından dolayı mikrokürelerin yüzeyine yakın bölgelerde ya da duvarlara bağlanmadan gözeneklerin içinde yer almasından kaynaklandığını düşünülmektedir. Başka bir ifadeyle, ilk ani salım öncelikli olarak NR difüzyonu tarafından kontrol edilmekte ve genellikle mikroküre yüzeyine bağlı ve yakın bulunan ilaç moleküllerinden kaynaklanmaktadır [86]. Kontrollü ilaç salım sistemi olarak kitosan kriyojel mikrokürelerle NR ve benzeri hidrofobik yapıdaki ilaçların taşınması, ilaç salımı sırasında doz miktarının kontrollü bir şekilde salınması için oldukça dikkat edilmesi gereken bir husustur.

Salım davranışına ek olarak NR yüklenmiş mikrokürelerin salım profilleri beş farklı kinetik modele göre değerlendirilmiştir. Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19’da, mikrokürelerin yapay bağırsak, yapay mide ve yapay gözyaşı ortamları için sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson Crowel, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modellerine göre salım verilerinin kinetik modellere uygunluğu tatrılmıştır.

Şekil 4.17’de sunulan yapay bağırsak grafiklerinden elde edilen ve Tablo 4.9’da sunulan parametereler değerlendirildiğinde, en yüksek regresyon değerinin Korsmeyer-Peppas kinetik modelde elde edildiği görülmektedir. Aynı zamanda salım hızı verilerinin Higuchi kinetiğine de uyum gösterdiği söylenebilir. Mikrokürelerin bu kinetiğe uyum göstermeleri, matris yapısından etkin madde salımının difüzyonla gerçekleştiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, kitosan ile hazırlanan çapraz bağlı matris sistemler suda çözünmediği için, etkin madde salımlarında heterojen matrinden etkin madde salım kinetiğini açıklayan Higuchi kinetiğine uyum gösterdikleri söylenmektedir [87].

Kinetik incelemelerde birinci derece kinetik model regrasyon katsayısı da dikkat çekmektedir. Hatta salım hızının dengeye gelmediği ve ani salımın gerçekleştiği ilk 16 saat için salım profili incelendiğinde regrasyon katsayısının $R^2=0.9$ olarak uyum sağladığı görülmektedir. Bunun nedeninin partiküllerin yüzeyinde bulunan kristal haldeki etkin maddenin hızla açığa çıkması olduğu düşünülmektedir.

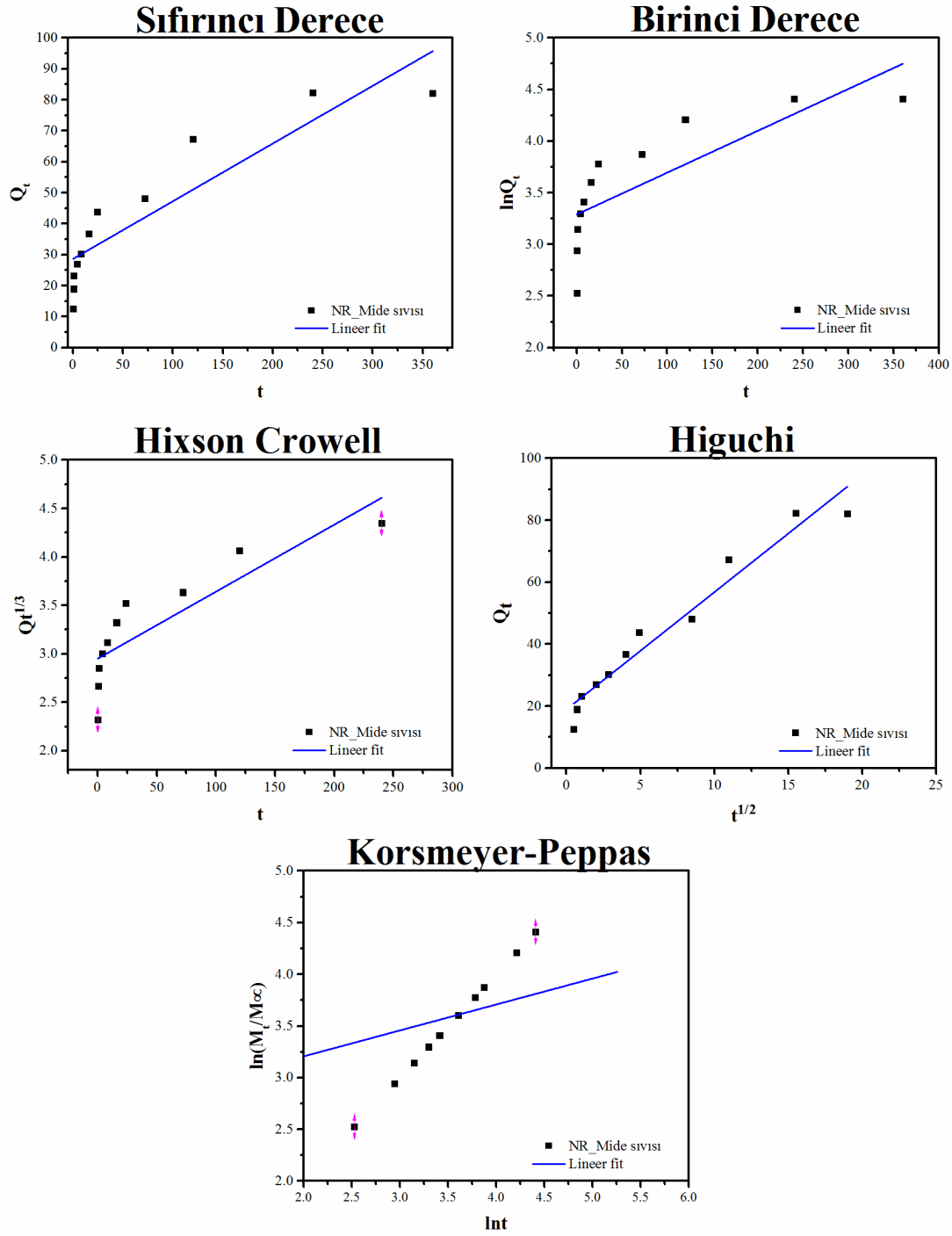


Şekil 4. 17. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği grafikleri

Tablo 4. 9. Kitosan mikrokürelerin yapay bağırsak sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması

Kinetik model	Model parametreleri		
	n	k	R ²
Sıfırıncı derece	-	0.145	0.724
Birinci derece	-	0.004	0.535
Hixson Crowell	-	0.004	0.605
Higuchi	-	3.053	0.909
Korsmeyer-Peppas	0.259	15.640	0.975

Şekil 4.18’de sunulan yapay mide grafiklerinden elde edilen ve Tablo 4.10’da sunulan parametreler değerlendirildiğinde, en yüksek regresyon değerinin Korsmeyer-Peppas kinetik modelde elde edildiği görülmektedir. Bunun yanında Higuchi ve sıfırıncı derece kinetik modelleri de uyum sağlamıştır.



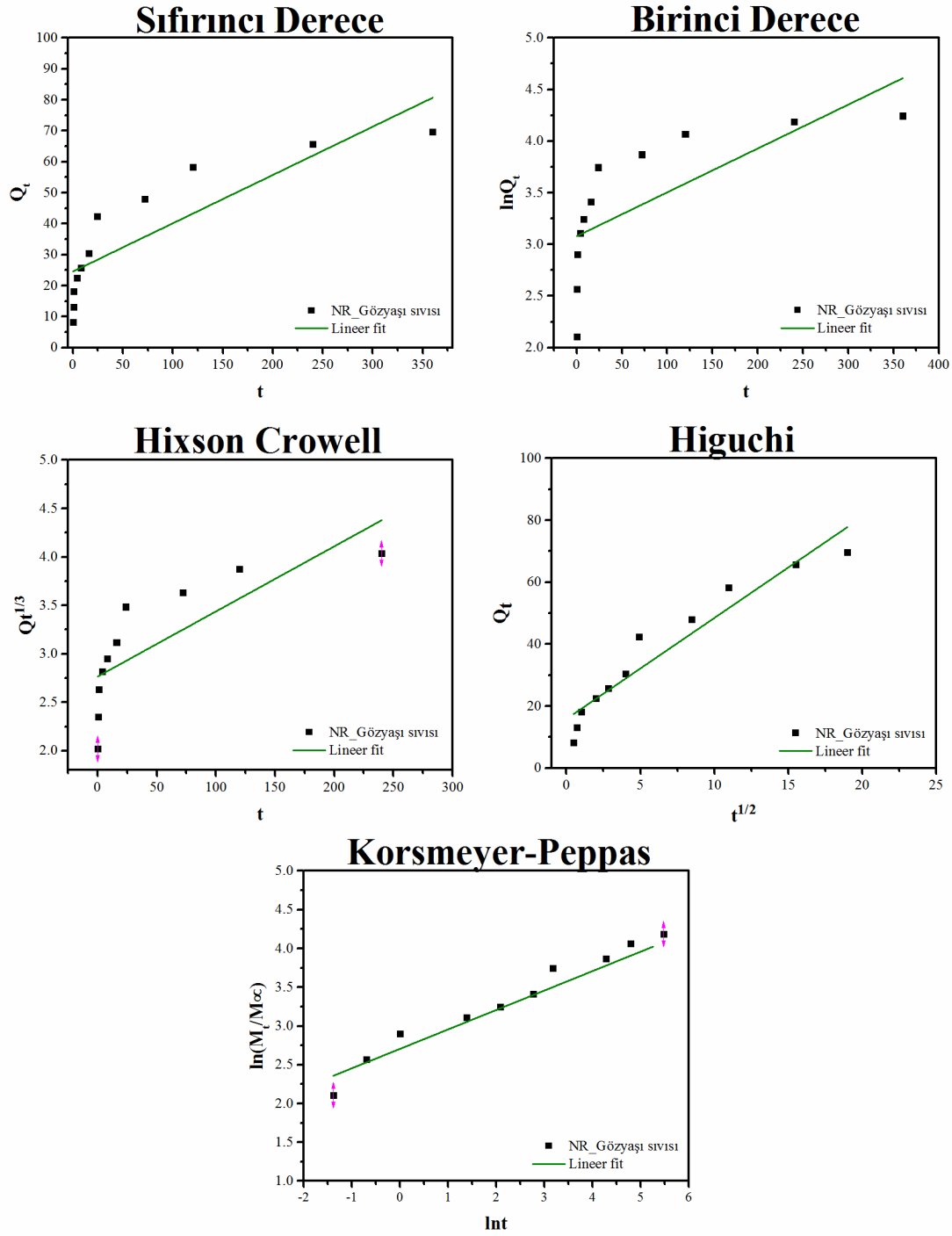
Şekil 4. 18. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği grafikleri

Tablo 4. 10. Kitosan mikrokürelerin yapay mide sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması

Kinetik model	Model parametreleri		
	n	k	R ²
Sıfırıncı derece	-	0.186	0.818
Birinci derece	-	0.004	0.632
Hixson Crowell	-	0.005	0.706
Higuchi	-	3.788	0.954
Korsmeyer-Peppas	0.241	19.885	0.973

Şekil 4.19’de sunulan yapay gözyaşı grafiklerinden elde edilen ve Tablo 4.11’de sunulan parametreler değerlendirildiğinde, en yüksek regresyon değerinin Korsmeyer-Peppas kinetik modelde elde edildiği görülmektedir. Bunun yanında Higuchi ve sıfırıncı derece kinetik modelleri de uyum sağlamıştır denilenebilir.

Genel olarak mikrokürelerden NR salımının, mikrokürelerin matris yapısında olmaları nedeniyle, teorik olarak Higuchi kinetiğine uyum göstermeleri beklenmiştir. Bütün deneylerin kinetik parametreleri incelendiğinde her üç ortamda gerçekleşen salımın Higuchi kinetiğine uyum sağladığı ve bunun yanında Korsmeyer-peppas kinetiğe de uyum sağladığı görülmüştür. Çıktılarda sıfırıncı dereceden ziyade Higuchi kinetiğine uyumun olması, etkin maddenin (suda çözünürlüğü çok düşük olan NR) suda çözünürlüğünün çok düşük olmasına ve matris içinde kristaller halinde bulunmasına rağmen çözünme hızının çözünürlük kontrollü olmadığının ve formülasyon çalışmalarında matris yapının elde edildiğinin bir göstergesi olarak düşünülmektedir.



Şekil 4. 19. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği grafikleri

Tablo 4. 11. Kitosan mikrokürelerin yapay gözyaşı sıvısı içerisindeki NR ilaç salım kinetiği model parametrelerinin karşılaştırılması

Kinetik model	Model parametreleri		
	n	k	R ²
Sıfırıncı derece	-	0.131	0.533
Birinci derece	-	0.006	0.362
Hixson Crowell	-	0.005	0.421
Higuchi	-	2.244	0.754
Korsmeyer-Peppas	0.248	12.550	0.868

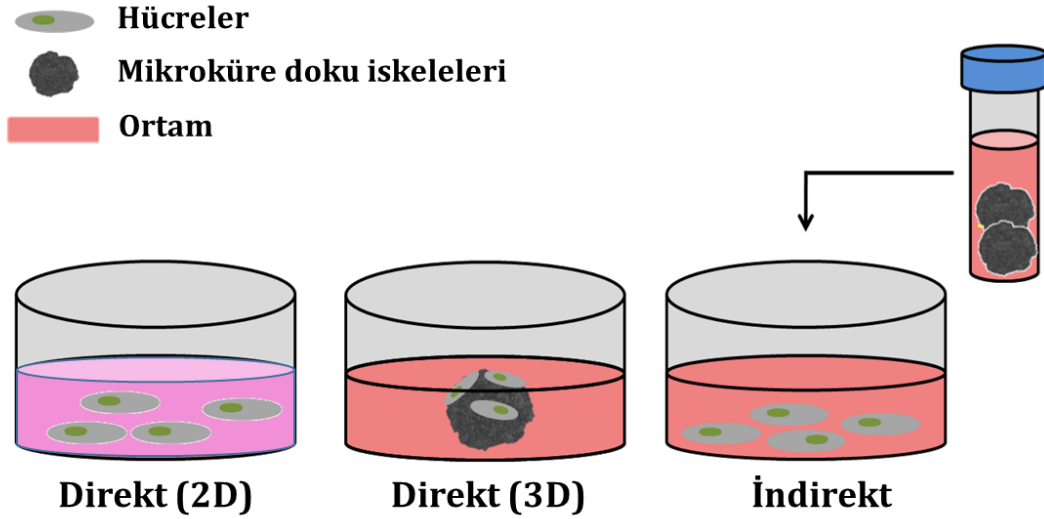
4.5. Biyouyumluluk Çalışmaları

Üretilen biyomalzemelerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilme potansiyelinin ortaya konulabilmesi için biyouyumluluğunun araştırılması gerekmektedir. Böylelikle uygulama sırasında malzemenin vücut sistemine uygun cevap verebilme yeteneği yani kendisini çevreleyen dokuların normal değişimlerine engel olup olmayacağı ve dokuda istenmeyen tepkiler (iltihaplanma, pıhtı oluşumu, vb) meydana getirip getirmeyeceği ortaya konacaktır.

Malzemelerin biyouyumluluğu, genotoksisite, mutajenite, karsinogenite, sitotoksisite, histokompatibilite veya mikrobiyal etkiler gibi birçok parametreyle karakterize edilebilir. Tez çalışması kapsamında üretilen kitosan kriyojel mikrokürelerin biyouyumluluğu sitotoksisite analizleri ile direkt ve indirekt temasla test edilmiştir. Bunun için, mikrokürelere belirlenen miktarda MEF hücreleri eklenmiş ve aynı şekilde belirlenen sürelerde canlılık testleri MTT analizi ile gerçekleştirilmiştir.

4.5.1. Direkt ve İndirekt Sitotoksisite

Biyolojik ve kimyasal maddeler veya bu malzemelerin bozunma ürünleri, hücreleri farklı şekillerde etkileyerek sitotoksisiteye yol açabilirler. Bir maddenin hücrelerin yaşamına etkisinin incelenebilmesi için hücre üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin analiz edilmesi gereklidir. Sitotoksisite belirleme yöntemleri genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik olarak sınıflandırılabilir. Kolorimetrik metodlardan biride çalışmamızda kullanılan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT)'dir. Ayrıca tez çalışması kapsamında mikrokürelerin sitotoksik etkilerinin incelenmesi amacıyla direkt ve indirekt sitotoksisite testleri uygulanmıştır (Şekil 4.20).

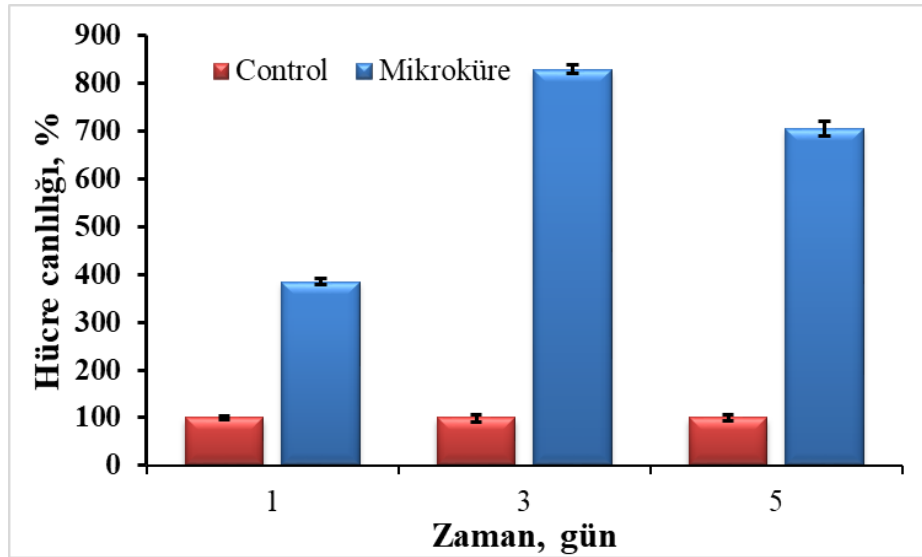


Şekil 4. 20. Direkt ve indirekt deneylerin şematik gösterimi

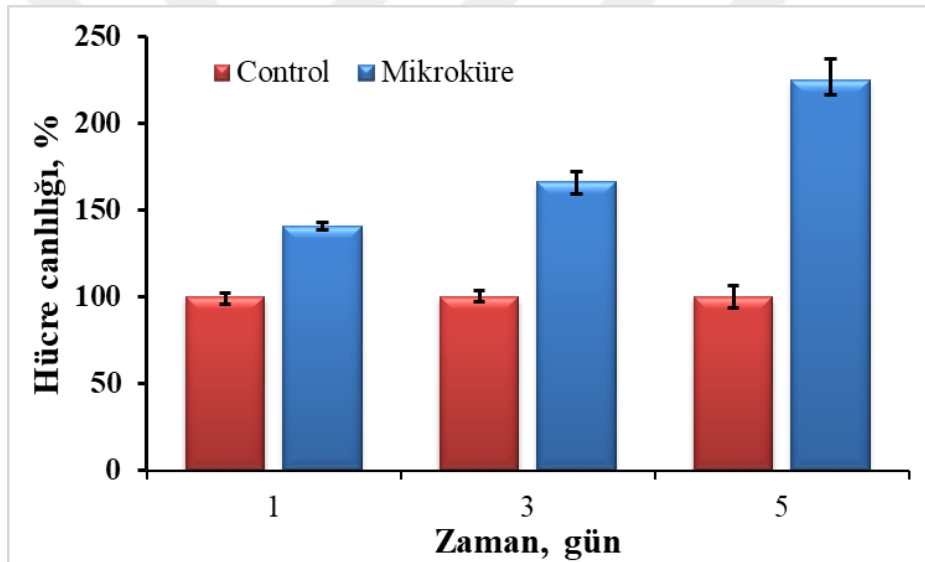
Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de direkt ve indirekt sitotoksosite sonuçları grafikte gösterilmiştir. ISO 10993-5/ EN 30993 standardına göre indirekt testlerde bir malzemenin sitotoksik etkisinin olduğunun göstergesi %70’in altındaki canlılık olarak belirtilmiştir. MTT analiz sonuçları, mikrokürelerin zamanla hücreler için sitotoksik etki yaratmadığını göstermektedir. 1, 3 ve 5 günlük sonuçlarda kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, doku iskelelerinin hücre yaşamasına elverişli olduğu görülmektedir.

Direkt sitotoksosite sonuçlarında, inkübasyon süresi arttıkça hücre çoğalmasının arttığı görülmektedir. Mikroküreler hücrenin yaşaması ve çoğalması için uygun görünmektedir. Kontrol grup (2D) ile karşılaştırıldığında; mikrokürelerde (3D) canlılık oranı daha yüksek görünmektedir. Bu durum mikroküre formunda doku iskelelerinin gözenekli, dolayısıyla daha fazla yüzey alanına sahip olması ile açıklanabilir.

Direkt ve indirekt sitotoksosite test sonuçları 1. günden itibaren farklılık göstermeye başlamıştır. İndirekt sitotoksosite sonuçlarında mikrokürelerin canlılık oranı kontrol grubuna göre daha yüksek görünmektedir. Bu duruma ek olarak indirekt test sonuçlarında zamana bağlı olarak canlılık oranında artma görülmüştür ancak direkt test sonuçlarına göre daha düşüktür. İndirekt koşullarda ortamda doku iskelesi bulunmadığı için, yüzey alanının daha az olması nedeniyle bu sonucun ortaya çıktığı düşünülmektedir. Direkt testte, ortamda bulunan doku iskelesi gözenekli yapısı nedeniyle hücrelere alan oluşturmaktadır.



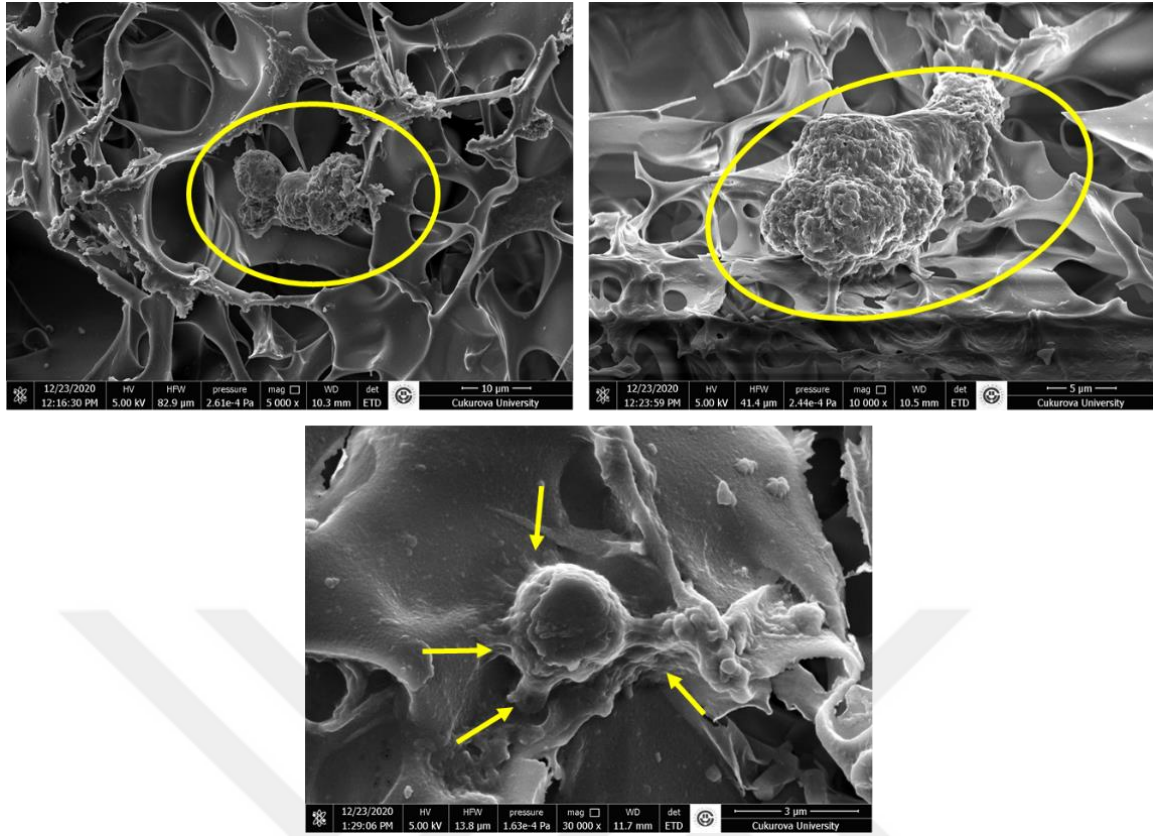
Şekil 4. 21. Mikroküre formunda hazırlanan doku iskelelerinin direkt sitotoksosite sonuçları



Şekil 4. 22. Mikroküre formunda hazırlanan doku iskelelerinin indirekt sitotoksosite sonuçları

4.5.2. Hücre Morfolojisi

Hücre sitotoksosite sonuçlarına ek olarak, mikrokürelerde; hücre morfolojisini incelemek için SEM analizleri yapılmıştır. İnkübasyon süresi 5 gün olarak seçilen doku iskelelerinin görüntüleri Şekil 4.23'de görülmektedir. SEM görüntülerinde, hücrelerin yayılmaları ve doku iskeleleri üzerindeki birbirleriyle yakın morfolojileri dikkat çekmektedir. Bu durum sitotoksosite sonuçlarını destekler nitelikte olup, iki doku iskelesi yapısının da biyouyumlu olduğunu göstermektedir.



Şekil 4. 23. Doku iskelelerine ekilen MEF hücrelerinin 5. gün sonundaki farklı büyütmelerde elde edilen SEM görüntüleri

4.6. Antimikrobiyal Aktivite

Biyomalzemelerin implantasyonu sırasında veya sonrasında oluşabilecek enfeksiyon, doku onarımı üzerindeki etkinliğini azaltır. İmplantasyon sırasında veya sonrasında; bakteriler, virüsler ve mantarlar gibi mikroorganizmalar, doku iskelesi ya da ilaç taşıyıcı malzemenin yüzeyine yapışarak malzeme ile konak doku arasında bir biyofilm oluşturma eğilimindedirler. Bu biyofilm, mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlar ve bağışıklık sistemi gibi dış ve iç çevresel faktörlere direnç gösterdiği temel bir hayatta kalma mekanizması oluşturur. Bir takım mikroorganizmaların neden olduğu bu tür enfeksiyonlar, kan dolaşımı yoluyla iskelet sistemine de yayılabilir. Bu nedenle implante edilecek malzemenin antimikrobiyal aktiviteye sahip olması oldukça önemlidir [88,89].

İmplantla ilişkili enfeksiyonun yayılmasını önlemek için biyomalzemelere bakterisidal/bakteriostatik maddelerin (biyositler) eklenmesi gibi yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; antibiyotikler, gümüş iyonları veya metalik gümüş, furanonlar ve 3-(trimetoksisilil)-propil dimetil oktadesil amonyum klorür gibi biyositler ile nihai malzemenin yüzeyinin kaplanması veya üretiminden önce polimer çözeltisine katılması

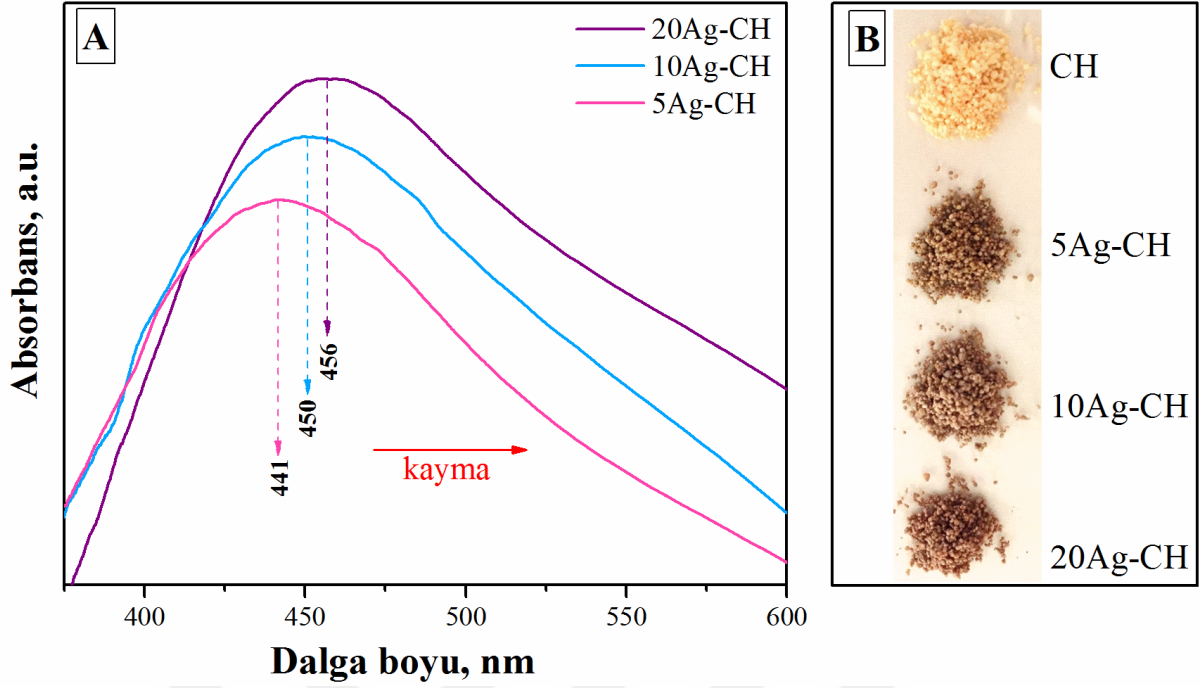
ile antimikrobiyal özelliklere sahip biyomalzeme üretimi yaygın bir yaklaşım haline geldiği görülmektedir.

Antibakteriyel ajanlar arasında, AgNP'ler geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahiptir ve 650'den fazla patojene karşı etkilidir. AgNP'lerin daha yüksek antimikrobiyal aktivitesi, mikroorganizmalar üzerindeki oldukça toksik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan AgNP'lerin insan ve diğer memeli hücrelerine düşük toksisite gösterdiği de bilinmektedir. Bu yaklaşımla, tez çalışması kapsamında üretilen enjekte edilebilir kitosan kriyojel mikrokürelerin antimikrobiyal aktivitesini arttırarak ilaç salımı için implantasyonu sırasında veya sonrasında oluşabilecek enfeksiyon, iltihap ve biyofilm oluşumu gibi istenmeyen durumların ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, malzeme üretiminden sonra mikrokürelerin yüzeyinde AgNPler sentezlenerek, mikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir [90]. Çalışmanın bu bölümünde in-situ AgNP sentezi, temel karakterizasyon işlemleri ve biyolojik aktiviteleri üzerine elde edilen sonuçlar tartışılacaktır.

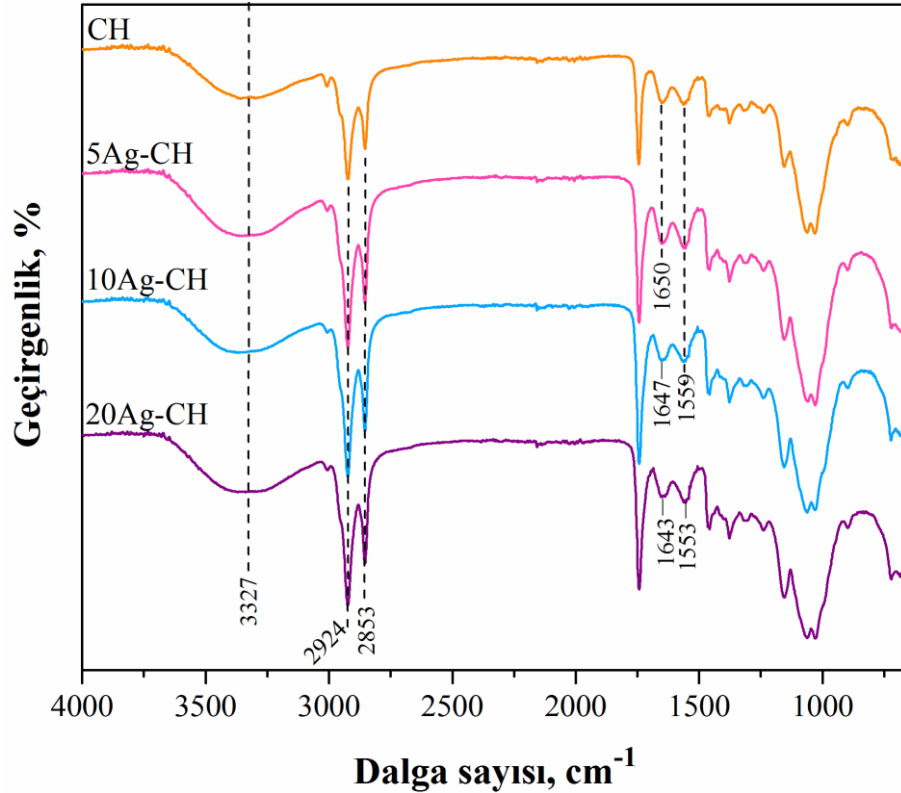
4.6.1. AgNP'lerin Kitosan Mikroküreleri Üzerinde Sentezi

AgNP'lerin kitosan mikroküreleri üzerinde in-situ sentezi UV-Vis spektroskopisi ile kanıtlanmıştır. Düz kitosan mikrokürelerinin süpernatanı, herhangi bir absorpsiyon zirvesi sergilememiştir. Bununla birlikte, Şekil 4.24A'da gösterildiği gibi, farklı miktarlarda AgNP'lerle kaplanmış kitosan mikrokürelerinin süpernatanı, absorpsiyon zirveleri sergilemiştir. 5Ag-CH, 10Ag-CH ve 20Ag-CH numunelerinin absorpsiyon zirveleri sırasıyla yaklaşık 442, 431 ve 439 nm'dir ve bu da mikrokürelerde AgNP'lerin varlığını göstermektedir [91,92]. Ek olarak mikroküreler üzerinde AgNP'lerin sentezi fiziksel olarak renk değişimi ile gözlenmiştir (Şekil 4.24B). Boş kitosan kriyojel mikroküreler sarımtırak bir renkte iken, AgNP sentezi ile açık kahverenden koyu kahverengiye doğru bir renk değişimi sergilemişlerdir.

Kitosan ve AgNP'lerle kaplı kitosan mikrokürelerinin FTIR analizi, kitosan mikrokürelerinin kimyasal yapısını ve mikroküre ağlarında AgNP'lerin sentezini doğrulamak için yapılmıştır. AgNP'lerin mikroküreler üzerinde sentezinden sonra, kitosan'ın karakteristik pikleri hala gözlenmiştir (Şekil 4.25), bu da sentez prosedürünün kitosanın ana yapısını etkilemediğini ortaya koymuştur. Ek olarak, gümüş nanopartiküllerin FTIR'da karakteristik pikleri yoktur. Ancak, gümüş atomu ile kitosan'ın fonksiyonel grupları arasında oluşturulan koordinasyon bağının varlığını gösteren, amin tepelerinin yoğunluğunda artış ve piklerde hafif bir kayma söz konusudur [93,94]. Başka bir deyişle, gümüş partiküller kitosanda bulunan elektronca zengin NH₂ ve OH gruplarına bağlanır ve bu da her iki bağ uzunluğunda da değişikliğe neden olmuştur. Bu bulgular da, kitosan mikrokürelerinde AgNP'lerin varlığını doğrulamıştır.



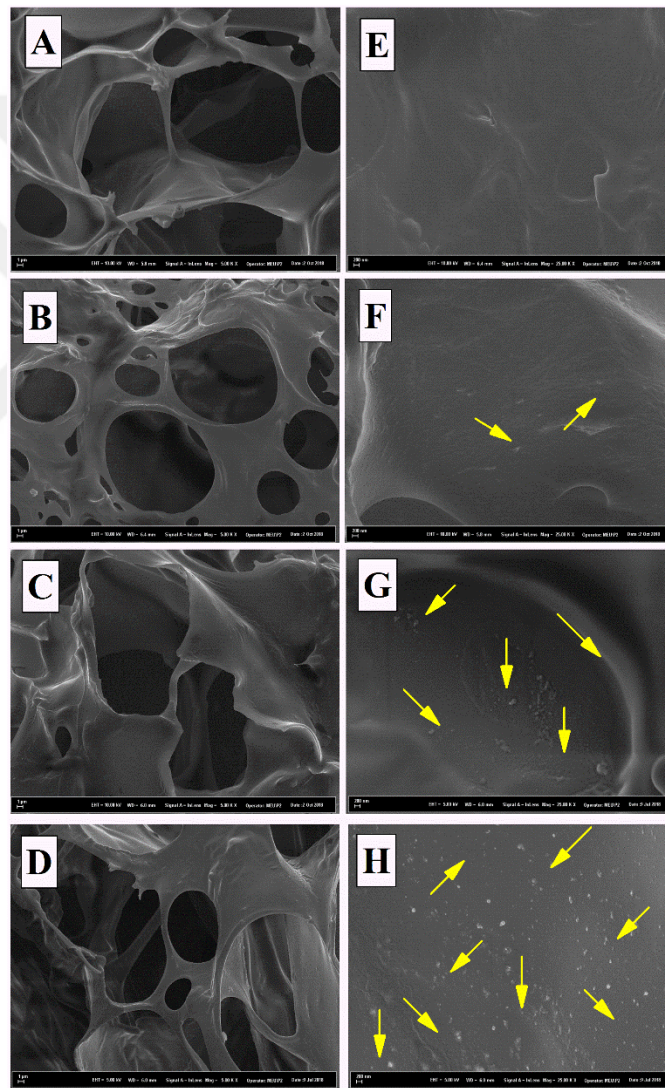
Şekil 4. 24. AgNPs kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerin UV-Vis spektrumları, B: Mikrokürelerin gün ışığı altındaki görüntüleri



Şekil 4. 25. Kitosan ve AgNPs kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerinin FTIR spektrumları

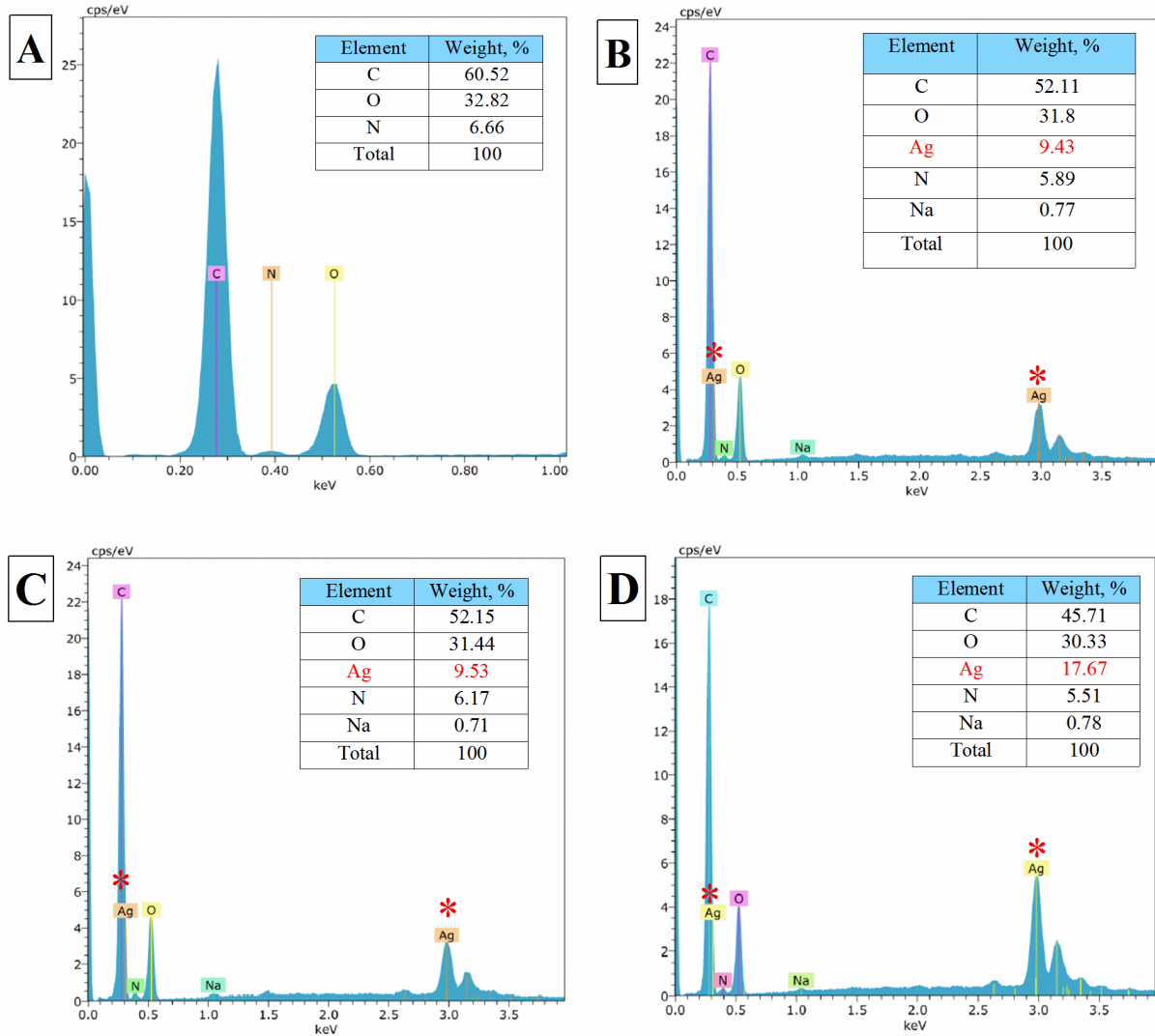
Kitosan mikrokürelerinin morfolojisi ve sentezlenen AgNP'lerin mikrokürelerdeki dağılımı SEM kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.26). Kitosan mikroküreleri daha önceki

bölümlerde de bahsedildiği gibi birbirine bağlı gözenekli bir yapı göstermiştir. Birbirine bağlı gözenekli morfoloji, kriyojelasyon yönteminin bir sonucudur. Gözenek boyutu 5-30 μm aralığındadır (gözeneklerin %50'sinden fazlası 10 ile 20 μm arasındadır). AgNP'lerin SEM ile analizlenebilmesi için gözenek duvarlarının yüksek büyütmelede görüntülerinin alınması gerekmektedir. Kitosan mikrokürelerinin gözenek duvarları incelendiğinde yüzeyin düz bir morfoloji sergilediği göstermektedir (Şekil 4.26E). AgNP yüklü mikrokürelerin gözenek duvarlarında ise oluşan AgNP'lerin morfolojisi ve boyutu açıkça gözlemlenmiştir [95] (Şekil 4.26F-H). AgNO_3 konsantrasyonunun 5 mmol.L^{-1} 'den 20 mmol.L^{-1} 'e yükselmesiyle nanoparçacıkların miktarının açıkça arttığı görülmektedir.



Şekil 4. 26. Kitosan ve AgNP kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerinin SEM görüntüleri (A, E: CH; B, F: 5Ag-CH; C, G: 10Ag-CH ve D, H: 20Ag-CH). Sarı oklar, mikroküre yüzeyinde oluşan AgNP parçacıklarını göstermektedir.

AgNP'lerin kitosan mikrokürelerine dahil edilmesi EDX analizi ile doğrulanmıştır. Boş kitosan ve gümüş partiküllerle kaplanmış kitosan mikrokürelerin kantitatif element analizi Şekil 4.27'de gösterilmektedir. EDX analizi sonuçları, mikroküre ağlarında AgNP'lerin oluşumunu desteklemiştir [95].



Şekil 4. 27. Kitosan ve AgNPs kaplı kitosan kriyojel mikrokürelerinin EDX spektrumları (A: CH; B: 5Ag-CH; C: 10Ag-CH ve D: 20Ag-CH).

4.6.2. Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

Yedi farklı mikroorganizmaya karşı kitosan ve AgNP kaplı kitosan mikrokürelerinin antimikrobiyal özellikleri incelenmiş ve buna bağlı olarak elde edilen MIC değerleri Tablo 4.10'da sunulmuştur. Tüm örneklerin, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı etkilidir. Mikroküre yüzeyinde sentezlenen AgNP miktarları arttıkça (AgNO_3 konsantrasyonu arttıkça), MIC değerlerinin düştüğü görülmektedir. 20 mmol/L AgNO_3 konsantrasyonunda hazırlanan mikrokürelerin MIC değerleri, *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *Bacillus cereus*,

L. pneumophila subsp. pneumophila (ATCC 33152) ve *E. hirae* (ATCC 10541) mikroorganizmaları için boş kitosan mikrokürelere kıyasla 16 kat daha düşüktür. Benzer şekilde, yine en yüksek AgNO₃ konsantrasyonunda hazırlanan mikrokürelere boş kitosan mikrokürelere göre *C. albicans*'a karşı MIC değeri 8 kat daha azdır.

Gümüş, antik çağlardan beri en düşük sitotoksositeye sahip gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip biyolojik ajanlardan biridir. AgNP'lerin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri, pozitif yüklü gümüşün negatif yüklü biyo-makromoleküler bileşenler (disülfid ve fosfat veya sülfhidril enzim grupları), nükleik asitler ve yapısal değişiklikler, protein denatürasyonu, mikrobiyal hücre duvarları ve zar deformasyonu ile etkileşimi sonucu hücre parçalanmasına ve ölümüne neden olması ile açıklanabilir [96,97]. Bu araştırmanın önemi, sentezlenmiş malzemelerin geniş bir biyomedikal uygulamaları yelpazesini, özellikle kontrollü ilaç salım uygulamalarında kapsayan doku mühendisliği uygulamalarında implantla ilişkili enfeksiyonu kontrol etme potansiyelini ortaya koymaktır.

Tablo 4. 12. Test edilen örneklerin MIC değerleri

Microorganism	Konsantrasyon (mg/L)			
	CH	5Ag-CH	10Ag-CH	20Ag-CH
<i>E. coli</i>	250	125	62.5	31.25
<i>B. cereus</i>	2000	500	250	125
<i>Legionella</i>	1000	250	125	62.5
<i>S. aureus</i>	500	125	62.5	31.25
<i>P. aeruginosa</i>	500	250	125	31.25
<i>E. hirae</i>	500	125	62.5	31.25
<i>C. albicans</i>	1000	500	250	125

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Son yıllarda doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen malzemelerin implantasyon sürecinde invaziv olmayan ya da minimum invaziv olan yöntemlerin tercih edilmesi hem hasta konforu hem de iyileşme süreci üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Üretilen biyomalzemelerin hücre taşıyıcılığının yanı sıra hedef organ ya da dokuya kontrollü ilaç salımını da gerçekleştirilebilmesi ve düzensiz şekil veya boyuttaki defektleri doldurabilmesi de aranan diğer özelliklerindendir. Bu kapsamda mikroküreler sahip oldukları büyüklük, geometri ve şekil özellikleri bakımından enjektör ucundan geçmeye uygun olması, kolay hazırlanabilmesi, raf ömrünün uzun olması, hedef dokuya ya da organa en kısa sürede ulaşabilmesi ve kontrollü salım sistemleri için yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olması ve salım hızının kontrol edilebilmesi gibi avantajlarından dolayı oldukça popüler ve artan ilgiyle geliştirilen malzemelerdir.

İlaç salım sistemleri olarak polimerlerik mikroküreler ile ilgili çalışmalar uzun yıllardan bu yana devam etmekte ve henüz diğer tüm biyomalzemelerde olduğu gibi eşsiz özelliklere sahip bir sistem üretilemediği için çalışmalar hızla devam etmektedir. Bu sistemlerde kullanılan polimerlerin biyobozunur olması yani *in vivo* koşullarda enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla bozularak biyoyumlu veya toksik olmayan yan ürünlerin oluşması tercih edilir. Bu polimerler normal fizyolojik yollarla metabolize edilebilirler veya atılırlar. Bu özelliği taşıyan polimerler kaynaklarına göre, doğal, yarı sentetik ve sentetik olabilirler. Doğal biyobozunur polimerler olarak bilinen en iyi temel polimerlerden biri olan kitosan bu tez çalışmasının konusu olmuştur.

İlaç salım sistemleri olarak kitosan mikroküreler geleneksel emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmaktadır. Ancak üretilen mikrojellerin çoğu gözeneksiz yapıdadır. Bu da mekanik özelliği düşük, kararsız, düşük ilaç yükleme kapasitesi ve hızlı bir salım davranışı ile sonuçlanmaktadır. Bu olumsuzlukların üstesinden gelebilmek adına gözenekli mikroküreler geliştirilmiştir. Böylelikle sadece ilaç değil hormon/büyüme faktörü gibi yeni doku oluşumunu indükleyecek etken maddelerin de taşınarak hasarlı implantasyon bölgelerinde hem ilaç salımı hem de yeni doku oluşumu veya doku rejenerasyonunu sağlamak mümkün olabilecektir.

Bu kapsamda, tez çalışmasının amacı, enjekte edilebilir, gözenekli, biyobozunur, biyoyumlu ve antimikrobiyal kriyojel mikrokürelerin geliştirilmesi ve etken madde salım uygulamaları için kullanılabilirliğini ortaya koymaktır. Tez çalışması 3 ana bölümden oluşmuştur.

İlk bölüm optimum koşullarda kitosan kriyojel mikrokürelerin üretimi ve temel Karakterizasyon analizlerinden oluşmuştur. Mikroküreler kriyojenik koşullar altında glüteraldehit varlığında çapraz bağlama ile başarıyla üretilmiştir. Üretilen parçacıkların mikron

boyutta ve küresel yapıda oldukları mikroskobik görüntülerle kanıtlanmıştır. Ayrıca, iç yapısal morfolojileri incelendiğinde ise, kriyojelasyonun bir sonucu olarak birbiri ile bağlantılı gözenekli bir yapı sergilemiştir. Bu yapı, gerek hücreler için besin alışverişi ve difüzyon açısından gerekse yüzey alanının artmasıyla ilaç adsorpsiyon miktarının artması ve uzun süreleri salımın gerçekleşmesi açısından oldukça önemlidir. Ek olarak mikrokürelerin sergilediği gözenekli yapı yüksek sıvı absorplama kapasitesine yani yüksek şişme oranlarına sahip olduğunu da göstermektedir. Üretilen mikroküreler enjekte edilebilir özelliktedir. 18 Gauge iğne çapından kolaylıkla geçerek minimal invaziv yolla canlı vücuduna implante edilebilirler. Mikrokürelerin üretiminde kullanılan kitosan doğal polimeri biyobozunur olmakla beraber çapraz bağlama sonucu suda çözünmez, ancak yaklaşık 3 aylık bir sürede büyük bir kısmı kademeli olarak erezyona uğrayarak bozunur.

Tez çalışmasının ikinci kısmına, karakterizasyon çalışmaları tamamlanan kitosan kriyojel mikrokürelerin ilaç yükleme, ilaç salım ve salım profiline uyan kinetik modellerin belirlenmesi çalışmaları ile devam edilmiştir. Bu kapsamda, hidrofilik ilaçları temsilen RB ve hidrofobik ilaçları temsilen NR boyar maddeleri model ilaç olarak kullanılmıştır. İlaçların maliyeti göz önünde bulundurulduğunda model ilaçlarla bu tür klinik öncesi optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi oldukça önemlidir. Her iki boyar madde için ilaç yükleme çalışmaları farklı sıcaklık, farklı boyar madde konsantrasyonu ve farklı çalkama hızı parametrelerinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde RB için en yüksek ilaç yükleme kapasitesi 89.32 ± 1.57 olarak 0.1 mg/mL boyar madde konsantrasyonu, 60°C sıcaklık ve 200 rpm karıştırma hızında elde edilmiştir. NR için en yüksek ilaç yükleme kapasitesi ise 61.51 ± 0.70 0.05 mg/mL boyar madde konsantrasyonu, 60°C sıcaklık ve 200 rpm çalkama hızında elde edilmiştir. Maksimum ilaç yükleme kapasitesi ile hazırlanan ilaç yüklü mikrokürelerin salım çalışmaları farklı fizyolojik koşullar için değerlendirilmiştir. Yapay mide, yapay bağırsak ve yapay gözyaşı sıvıları kullanılan fizyolojik salım ortamlarıdır. Her iki boyar madde de tüm fizyolojik koşullarda iki fazlı salım profili sergilemiştir. Salım profillerini oluşturan deneysel verilere kinetik verilerin uyumu için sıfırıncı derece, birinci derece, Hixson Crowell, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modelleri çalışılmıştır. Genel olarak mikrokürelerden model ilaç olarak boyar madde salımının Higuchi ve Korsmeyer-Peppas kinetik modelleri ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Çalışmanın son kısmında, ilaç salım profili belirlenen mikrokürelerin ilaç taşıyıcı sitem olarak canlı vücudunda kullanılmadan önce muhakkak araştırılması gereken biyoyoumluluk ve biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MEF hücreleri ile yapılan sitotoksikite analizleri sonucu, mikrokürelerin hücre canlılığı üzerinde herhangi bir toksisiteye neden olmadığı, aksine kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığını arttırdığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç,

mikrokürelerin güvenli biyomalzeme olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Biyolojik aktivite çalışmaları mikrokürelerin farklı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkilerinin araştırılması ile ortaya konmuştur. Kitosanın doğası gereği antibakteriyel özellikte olduğu bilinse de, üretilen mikrokürelerin çapraz bağlanma, üretim yöntemi, şekil ve boyutuna bağlı olarak mikrobiyal aktivitesinin değişebileceği göz önünde bulundurularak, mevcut özelliklerinin artırılmasına yönelik yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu amaçla, üretilen kuru mikroküreler üzerinde iyi bir antibakteriyel ajan olarak bilinen AgNP'ler sentezlenmiştir. AgNP sentezi farklı fizikokimyasal ve morfolojik analizlerle kanıtlanmıştır. Hali hazırda bakteriyel aktiviteye sahip kitosan mikroküreler AgNP sentezi ile yaklaşık 8 kat daha güçlü aktivite sergileyecek hale getirilmiştir. Böylece, implantasyon sırasında ya da hemen sonrasında implantasyona bağlı gerçekleşebilecek enfeksiyon riski ve biyolojik film oluşumu baskılanabilecektir.

Bu araştırmanın önemi, yeni bir malzeme olan kitosan kriyojel mikrokürelerin ilaç yükleme ve salım profillerinin ortaya konması ve uygulama öncesi biyouyumluluk ve biyolojik aktivite özelliklerinin belirlenmesini kapsamaktadır. Minimum invaziv yolla implante edilebilen bu sistem, hem doku rejenerasyonu için doku iskelesi hem de ilaç salımı için taşıyıcı sistem olarak geniş bir biyomedikal uygulama yelpazesinde değerlendirilebilecektir.

İleriki çalışmalara gözlenen öneriler:

Seçilecek gerçek bir ilaç ile hedefe yönelik ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilebilir. Bu kapsamda, kitosan mikroküreler fonksiyonelleştirilerek kimyasal bağlama ile yüzeyine etken madde bağlanması ya da farklı özelliklere sahip nanopartiküllerle bir araya getirilerek kullanılma potansiyeli mevcuttur.

Gözenekli mikrokürelerin sergiledikleri yüksek yüzey alanından yararlanılarak ilaç salım sistemi olarak kullanımının yanı sıra doku iskelesi olarak da kullanımı değerlendirilebilir. Bu kapsamda, mikroküre doku iskelelerine hücre ekimi yapılarak ulaşılması zor ve düzgün geometrik şekle sahip olmayan hasarlı dokuların onarımında minimum invaziv yolla kullanımı üzerine çalışmalar yapılabilir.

Hücrelerin yanında farklı biyolojik ajanların (ilaç/büyüme faktörü/hormon) doku iskelelerine eklenmesi ve bu etken maddelerin kontrollü salımının yapılarak doku rejenerasyonu ya da yeni doku oluşumu sürecine katkı sağlanabilir.

Mikrokürelerin *in vivo* çalışmalarının yapılması malzemenin gelecek potansiyel uygulamalarda kullanımı için büyük önem taşımaktadır. *In vitro* yapılan bu çalışmanın *in vivo* koşullarında yapılması halinde daha yararlı sonuçlar alınması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Abuchowski, A.; Van Es, T.; Palczuk, N. C.; Davis, F. F., Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252, (11), 3578–3581.
- [2]. Zhang, L.; Gu, F. X.; Chan, J. M.; Wang, A. Z.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C., Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2008**, 83, 761–769.
- [3]. Bhowmik, D.; Gopinath, H.; Pragati Kumar, B.; Duraivel, S.; Sampath Kumar, K. P., Controlled Release Drug Delivery Systems. *The Pharma Innovation*, **2012**, 1, (10).
- [4]. Yun, Y. H.; Lee, B. K.; Park, K., Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation. *Journal of Controlled Release* **2015**, 219, 2–7.
- [5]. Ye, M.; Kim, S.; Park, K., Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *Journal of Controlled Release* **2010**, 146, 241–260.
- [6]. Park, K., Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 3–8.
- [7]. Fager, C.; Olsson, E., Understanding and utilizing the biomolecule/nanosystems interface: Soft materials and coatings for controlled drug release. In: *Nanotechnologies in Preventive and Regenerative Medicine: An Emerging Big Picture*; Elsevier Inc., **2017**; pp. 244–260.
- [8]. Huynh, C. T.; Lee, D. S., Controlled Release. In: *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*; Springer Berlin Heidelberg, **2015**; pp. 439–449.
- [9]. Kim, K.K.; Pack, D.W., Microspheres for Drug Delivery. In: *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology*; Ferrari, M.; Lee, A.; Lee, L. J., Eds.; Springer, Boston, MA, **2006**; pp. 19–50.
- [10]. Fan, L.; Singh, S.K.; Fan, L.; Singh, S. K., Diffusion-Controlled Release. In: *Controlled Release*; Springer Berlin Heidelberg, **1989**; pp. 9–88.
- [11]. Baker, R. W., Controlled release of biologically active agents. *Controlled release of biologically active agents*, **1987**.
- [12]. Kohrs, N. J.; Liyanage, T.; Venkatesan, N.; Najarzadeh, A.; Puleo, D. A., Drug Delivery Systems and Controlled Release. *Encyclopedia of Biomedical Engineering* **2019**, 1–3, 316–329.
- [13]. Mitragotri, S.; Lahann, J., Materials for drug delivery: Innovative solutions to address complex biological hurdles. *Advanced Materials* **2012**, 24, (28), 3717–3723.
- [14]. Akbuğa, J.; Durmaz, G., Preparation and evaluation of cross-linked chitosan microspheres containing furosemide. *International Journal of Pharmaceutics* **1994**, 111, (3), 217–222.
- [15]. Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; van Es, T.; Davis, F. F., Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry* **1977**, 252, (11), 3582–3586.
- [16]. Herrlich, S.; Spieth, S.; Messner, S.; Zengerle, R., Osmotic micropumps for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **2012**, 64, (14), 1617–1627.
- [17]. Peppas, N.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, (1), 27–46.
- [18]. Siepmann, J.; Peppas, N. A., Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 48, (2–3), 139–157.
- [19]. Korsmeyer, R. W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N. A., Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics* **1983**, 15, (1), 25–35.
- [20]. Talelli, M.; Iman, M.; Varkouhi, A.; Rijcken, C.; Schiffelers, R.; Etrych, T.; Ulbrich, K.; van Nostrum, C.; Lammers, T.; Storm, G.; Hennink W., Core-crosslinked polymeric micelles with controlled release of covalently entrapped doxorubicin. *Biomaterials* **2010**, 31, (30), 7797–7804.
- [21]. Min, K. H.; Kim, J. -H.; Bae, S. M.; Shin, H.; Kim, M. S.; Park, S.; Lee, H.; Park, R. -W.; Kim, I. -S.; Kim, K.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y.; Lee, D. S., Tumoral acidic pH-responsive MPEG-poly(beta-amino ester) polymeric micelles for cancer targeting therapy. *Journal of Controlled Release* **2010**, 144, (2), 259–266.
- [22]. Demir, D.; Güreş, D.; Tecim, T.; Genç, R.; Bölgen, N., Magnetic nanoparticle-loaded electrospun poly(ε-caprolactone) nanofibers for drug delivery applications. *Applied Nanoscience*

(Switzerland) **2018**, 8, (6), 1461–1469.

[23]. Tüylek, Z., Drug delivery systems and nanotechnological interactionfile. *Bozok Tıp Dergisi* **2017**, 7, (3), 89–98.

[24]. Dash, S.; Murthy, P. N.; Nath, L.; Chowdhury, P., Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research* **2010**, 67, (3), 217–223.

[25]. Laracuenta, M. L.; Yu, M. H.; McHugh, K. J., Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects. *Journal of Controlled Release* **2020**, 327, 834–856.

[26]. Hixson, A. W.; Crowell, J. H., Dependence of reaction velocity upon surface and agitation. *Industrial and Engineering Chemistry* **1931**, 23, (8), 923–931.

[27]. Higuchi, T., Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1963**, 52, (12), 1145–1149.

[28]. Costa, P.; Sousa Lobo, J. M., Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, 13, (2), 123–133.

[29]. Shen, S. I.; Jasti, B. R.; Li, X., Design of controlled-release drug delivery systems. In: *Standard Handbook of Biomedical Engineering And Design*; **2004**.

[30]. Kamaly, N.; Yameen, B.; Wu, J.; Farokhzad, O. C., Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical reviews* **2016**, 116, (4), 2602.

[31]. Vohlřdal, J., Polymer degradation: a short review. *Chemistry Teacher International* **2021**, 3, (2), 213–220.

[32]. Visan, A. I.; Popescu-Pelin, G.; Socol, G., Degradation behavior of polymers used as coating materials for drug delivery-a basic review. *Polymers* **2021**, 13, (8).

[33]. Chou, S. -F.; Woodrow, K. A., Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* **2017**, 65, 724.

[34]. Abuhanoglu, G.; Özer, A. Y., Radiation sterilization of new drug delivery systems. *Interventional Medicine & Applied Science* **2014**, 6, (2), 51.

[35]. Sakar, F.; Özer, A. Y.; Erdoğan, S.; Ekizoglu, M.; Kart, D.; Özalp, M. A.; Çolak, Ş.; Zengin, Y., Nano drug delivery systems and gamma radiation sterilization. *Pharmaceutical Development and Technology* **2017**, 22, (6), 775–784.

[36]. Sung, Y. K.; Kim, S. W., Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research* **2020**, 24, (1), 1–12.

[37]. Liechty, W. B.; Kryscio, D. R.; Slaughter, B. V.; Peppas, N. A., Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* **2010**, 1, 149.

[38]. Sowjanya, M.; Debnath, S.; Lavanya, P.; Thejovathi, R.; Babu, M. N., Polymers used in the designing of controlled drug delivery system. *Research Journal of Pharmacy and Technology* **2017**, 10, (3), 903.

[39]. Bhattarai, D. P.; Aguilar, L. E.; Park, C. H.; Kim, C. S., A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering. *Membranes* **2018**, 8, (3).

[40]. Reddy, M. S. B.; Ponnammam, D.; Choudhary, R.; Sadasivuni, K. K., A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers* **2021**, 13, (7), 1105.

[41]. Beulah, P.; Jinu, U.; Ghorbanpour, M.; Venkatachalam, P., Green engineered chitosan nanoparticles and its biomedical applications—an overview. In: *Advances in Phytonanotechnology*; Academic Press, **2019**; pp. 329–341.

[42]. El-Hefian, E. A.; Elgannoudi, E. S.; Mainal, A.; Yahaya, A. H., Characterization of chitosan in acetic acid: Rheological and thermal studies. *Turkish Journal of Chemistry* **2010**, 34, 47–56.

[43]. Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology* **2010**, 144, (1), 51–63.

[44]. Barbosa, M. A.; Pêgo, A. P.; Amaral, I. F., Chitosan. *Comprehensive Biomaterials*, 2011, 221–237.

[45]. Sharma, N.; Purwar, N.; Gupta, P. C., Microspheres as drug carriers for controlled drug

- delivery : a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **2015**, 6, (11), 4579–4587.
- [46]. Varde, N. K.; Pack, D. W., Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion* **2004**, 35–51.
- [47]. Ritu, V.; Shubham, V.; Kumar, S., Microsphere-a novel drug delivery systems. *Research Chronicle in Health Sciences* **2019**, 5, (1), 5–14.
- [48]. Kim, K. K.; Pack, D. W., Microspheres for drug delivery. *BioMEMS and Biomedical Nanotechnology* **2006**, 19.
- [49]. Lengyel, M.; Kállai-Szabó, N.; Antal, V.; Laki, A. J.; Antal, I., Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica* **2019**, 87, (3), 20.
- [50]. Kaurav, H.; Hari Kumar, S. L.; Kaur, A., Mucoadhesive microspheres as carriers in drug delivery: A review. *International Journal of Drug Development and Research* **2012**, 4, (2), 21–34.
- [51]. Lengyel, M.; Kállai-Szabó, N.; Antal, V.; Laki, A. J.; Antal, I., Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica* **2019**, 87, (3).
- [52]. Marzuki, N. H. C.; Wahab, R. A.; Hamid, M. A., An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2019**, 33, (1), 779–797.
- [53]. Leister, N.; Karbstein, H. P., Evaluating the stability of double emulsions—a review of the measurement techniques for the systematic investigation of instability mechanisms. *Colloids and Interfaces* **2020**, 4, (1), 8.
- [54]. Ghosh Dastidar, D.; Saha, S.; Chowdhury, M., Porous microspheres: Synthesis, characterisation and applications in pharmaceutical & medical fields. *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, 548, (1), 34–48.
- [55]. Yu, M.; Zhou, K.; Zhang, F.; Zhang, D., Porous HA microspheres as drug delivery: Effects of porosity and pore structure on drug loading and in vitro release. *Ceramics International* **2014**, 40, (8), 12617–12621.
- [56]. Gao, S.; Wang, Y.; Diao, X.; Luo, G.; Dai, Y., Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15. *Bioresource Technology* **2010**, 101, (11), 3830–3837.
- [57]. Dreifke, M. B.; Ebraheim, N. A.; Jayasuriya, A. C., Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **2013**, 101 A, (8), 2436–2447.
- [58]. Hu, L.; Zhang, H.; Song, W., An overview of preparation and evaluation sustained-release injectable microspheres. *Journal of Microencapsulation* **2012**, 1–14.
- [59]. Yuan, S.; Shen, Y.; Li, Z., Injectable cell- and growth factor-free poly(4-hydroxybutyrate) (P4HB) microspheres with open porous structures and great efficiency of promoting bone regeneration. *ACS Applied Bio Materials* **2021**, 4, (5), 4432–4440.
- [60]. Rosellini, E.; Barbani, N.; Frati, C.; Madeddu, D.; Massai, D.; Morbiducci, U.; Lazzeri, L.; Falco, A.; Graiani, G.; Lagrasta, C.; Audenino, A.; Cascone, M.G.; Quaini, F., IGF-1 loaded injectable microspheres for potential repair of the infarcted myocardium. *Journal of Biomaterials Applications* **2020**, 35, (7), 762–775.
- [61]. Deshmukh, T. V.; Doijad, R. C.; Yadav, A. V., Injectable microspheres of erlotinib hydrochloride for sustained drug release. *International Journal of Pharmaceutical Research* **2020**, 12, (3), 713–726.
- [62]. Peters, T.; Kim, S. W.; Castro, V.; Stingl, K.; Strasser, T.; Bolz, S.; Schraermeyer, U.; Mihov, G.; Zong, M. M.; Andres-Guerrero, V.; Herrero Vanrell, R.; Dias, A. A.; Cameron, N. R.; Zrenner, E., Evaluation of polyesteramide (PEA) and polyester (PLGA) microspheres as intravitreal drug delivery systems in albino rats. *Biomaterials* **2017**, 124, 157–168.
- [63]. Xu, J.; Bai, Y.; Li, X.; Wei, Z.; Sun, L.; Yu, H.; Xu, H., Porous core/dense shell pla microspheres embedded with high drug loading of bupivacaine crystals for injectable prolonged release. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists* **2021**, 22, (1), 1–11.
- [64]. Demir, D.; Bölgen, N., Synthesis and characterization of injectable chitosan cryogel microsphere scaffolds. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2017**, 66, (13), 686–696.

- [65]. Martinez, V., Modifications to the benzophenoxazine architecture: synthesis modifications to the benzophenoxazine architecture: synthesis and characterization and characterization, Georgia State University, **2016**.
- [66]. Bartasun, P.; Cieśliński, H.; Bujacz, A.; Wierzbicka-Woś, A.; Kur, J., A Study on the interaction of rhodamine b with methylthioadenosine phosphorylase protein sourced from an antarctic soil metagenomic library. *PLoS ONE* **2013**, 8, (1).
- [67]. Güngör, A.; Demir, D.; Bölgen, N.; Özdemir, T.; Genç, R., Dual stimuli-responsive chitosan grafted poly(NIPAM-co-AAc)/poly(vinyl alcohol) hydrogels for drug delivery applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2020**, 70, (11), 810–819.
- [68]. Zou, X.; Deng, P.; Zhou, C.; Hou, Y.; Chen, R.; Liang, F.; Liao, L., Preparation of a novel antibacterial chitosan-poly(ethylene glycol) cryogel/silver nanoparticles composites. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2017**, 28, (13), 1324–1337.
- [69]. Oh, J. W.; Chun, S. C.; Chandrasekaran, M., Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles and their broad-spectrum antifungal action compared to antibacterial activities against phytopathogens of tomato. *Agronomy* **2019**, 9, (1).
- [70]. Varma, R.; Vasudevan, S., Extraction, characterization, and antimicrobial activity of chitosan from horse mussel modiolus modiolus. *ACS Omega* **2020**, 5, (32), 20224–20230.
- [71]. Sutirman, Z. A.; Sanagi, M. M.; Abd Karim, K. J.; Wan Ibrahim, W. A., Preparation of methacrylamide-functionalized crosslinked chitosan by free radical polymerization for the removal of lead ions. *Carbohydrate Polymers* **2016**, 151, 1091–1099.
- [72]. Monteiro, O. A. C.; Airoidi, C., Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules* **1999**, 26, (2–3), 119–128.
- [73]. Mitragotri, S.; Burke, P. A.; Langer, R., Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. *Nature Reviews Drug Discovery* **2014**, 13, (9), 655–672.
- [74]. Sarmadi, M.; Behrens, A. M.; McHugh, K. J.; Contreras, H. T. M.; Tochka, Z. L.; Lu, X.; Langer, R.; Jaklenec, A., Modeling, design, and machine learning-based framework for optimal injectability of microparticle-based drug formulations. *Science Advances* **2020**, 6, (28), 6594.
- [75]. Pourjavadi, A.; Mahdavinia, G. R., Superabsorbency, pH-sensitivity and swelling kinetics of partially hydrolyzed chitosan-g-poly(acrylamide) hydrogels. *Turkish Journal of Chemistry* **2006**, 30, 595–608.
- [76]. Özkan, B. Ç., Çapraz bağlı kitosan / selüloz / grafen kompozitinin şişme davranışlarının incelenmesi. *Fırat Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi* **2021**, 33, (1), 329–337.
- [77]. Jin, S.; Bian, F.; Liu, M.; Chen, S.; Liu, H., Swelling mechanism of porous P(VP-co-MAA)/PNIPAM semi-IPN hydrogels with various pore sizes prepared by a freeze treatment. *Polymer International* **2009**, 58, (2), 142–148.
- [78]. Szymańska, E.; Winnicka, K., Stability of chitosan-A challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs* **2015**, 13, (4), 1819.
- [79]. Islam, N.; Dmour, I.; Taha, M. O., Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. *Heliyon* **2019**, 5, (5), 1684.
- [80]. Wong, Y. C.; Szeto, Y. S.; Cheung, W. H.; McKay, G., Effect of temperature, particle size and percentage deacetylation on the adsorption of acid dyes on chitosan. *Adsorption* **2008**, 14, 11–20.
- [81]. Vo, D. T.; Lee, C. K., Hydrophobically modified chitosan sponge preparation and its application for anionic dye removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2017**, 5, (6), 5688–5694.
- [82]. Hossain, M. A.; Alam, M. S., Adsorption kinetics of rhodamine-B on used black tea leaves. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* **2012**, 9, (1), 2.
- [83]. Akti, F.; Ünal, İ., Investigation of Adsorption organic surfactants on the different structure adsorbent coals. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University* **2014**, 29, (1), 191–199.
- [84]. Palanikumar, L.; Al-Hosani, S.; Kalmouni, M.; Nguyen, V. P.; Ali, L.; Pasricha, R.; Barrera, F. N.; Magzoub, M., Ph-responsive high stability polymeric nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics. *Communications Biology* **2020** 3, (1), 1–17.

- [85]. Pramanik, S. K.; Seneca, S.; Peters, M.; D'Olieslaeger, L.; Reekmans, G.; Vanderzande, D.; Adriaenssens, P.; Ethirajan, A., Morphology-dependent pH-responsive release of hydrophilic payloads using biodegradable nanocarriers. *RSC Advances* **2018**, 8, (64), 36869–36878.
- [86]. Lin, Y.; Li, Y.; CP, Ooi, P. C., 5-Fluorouracil encapsulated HA/PLGA composite microspheres for cancer therapy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2012**, 23, (10), 2453–2460.
- [87]. Shiraishi, S.; Imai, T.; Otagiri, M., Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation. *Journal of Controlled Release* **1993**, 25, (3), 217–225.
- [88]. Tafin, U. F.; Betrisey, B.; Bohner, M.; Lchmann, T.; Trampuz, A.; Clauss, M., Staphylococcal biofilm formation on the surface of three different calcium phosphate bone grafts: a qualitative and quantitative in vivo analysis. *Journal of materials science: Materials in medicine* **2015**, 26, (3).
- [89]. Gao, Y.; Hassanbhai, A. M.; Lim, J.; Wang, L.; Xu, C., Fabrication of a silver octahedral nanoparticle-containing polycaprolactone nanocomposite for antibacterial bone scaffolds. *RSC Advances* **2017**, 7, (17), 10051–10056.
- [90]. Demir, D.; Özdemir, S.; Yalçın, M. S.; Bölgen, N., Chitosan cryogel microspheres decorated with silver nanoparticles as injectable and antimicrobial scaffolds. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **2019**, 69, (14), 919–927.
- [91]. Yallappa, S.; Manjanna, J.; Peethambar, S. K.; Rajeshwara, A. N.; Satyanarayan, N. D., Green synthesis of silver nanoparticles using acacia farnesiana (sweet acacia) seed extract under microwave irradiation and their biological assessment. *Journal of Cluster Science* **2013**, 24, (4), 1081–1092.
- [92]. Amendola, V.; Bakr, O. M.; Stellacci, F., A Study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: Effect of shape, size, structure, and assembly. *Plasmonics* **2010**, 5, (1), 85–97.
- [93]. Shen, J.; Cui, C.; Li, J.; Wang, L., In situ synthesis of a silver-containing superabsorbent polymer via a greener method based on carboxymethyl celluloses. *Molecules* **2018**, 23, (10), 2483.
- [94]. Tork, M. B.; Nejad, N. H.; Ghalehbagh, S.; Bashari, A.; Shakeri-Zadeh, A.; Kamrava, S., In situ green synthesis of silver nanoparticles/chitosan/poly vinyl alcohol/poly ethylene glycol hydrogel nanocomposite for novel finishing of nasal tampons: *Journal of Industrial Textiles* **2014**, 45, (6), 1399–1416.
- [95]. Liu, L.; Cai, R.; Wang, Y.; Tao, G.; Ai, L.; Wang, P.; Yang, M.; Zuo, H.; Zhao, P.; Shen, H.; Umar, A.; He, H., Preparation and characterization of AgNPs in situ synthesis on polyelectrolyte membrane coated sericin/agar film for antimicrobial applications. *Materials* **2018**, 11, (7), 1205.
- [96]. Khawaja, H.; Zahir, E.; Asghar, M.A.; Asghar, M.A., Graphene oxide, chitosan and silver nanocomposite as a highly effective antibacterial agent against pathogenic strains. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2018**, 555, 246–255.
- [97]. Shi, S.; Liu, J.; Li, J.; Zheng, K. C.; Huang, X. M.; Tan, C. P.; Chen, L. M.; Ji, L.N., Synthesis, characterization and DNA-binding of novel chiral complexes Δ - and Λ -[Ru(bpy)₂L]²⁺ (L = o-mopip and p-mopip). *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006**, 100, (3), 385–395.