

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**AMİNOASİT İÇEREN POLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERDEN ANTİKANSER İLAÇ  
SALIMININ İNCELENMESİ**

**Emir ÖZÇALIŞKAN**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Şenay ŞANLIER**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 405.05.01**

**Sunuş Tarihi : 20.08.2010**

**Bornova-İZMİR**

**2010**



Sayın Emir ÖZÇALIŞKAN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “AMİNOASİT İÇEREN POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERDEN ANTİKANSER İLAÇ SALIMININ İNCELENMESİ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20.08.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza**

<b>Jüri Başkanı</b>	: .....	.....
<b>Raportör Üye</b>	: .....	.....
<b>Üye</b>	: .....	.....



**ÖZET****AMİNOASİT İÇEREN POLİMERİK  
NANOPARTİKÜLLERDEN ANTİKANSER İLAÇ SALIMININ  
İNCELENMESİ**

ÖZÇALIŞKAN, Emir

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şenay ŞANLIER

Ağustos 2010, 60 sayfa

Doxorubicin, antineoplastik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Ancak istenmeyen yan etkilerinin ve dolaşımdaki yarı ömrünün 0,8 saat gibi kısa bir süre olması nedeniyle kontrollü salım sistemlerine ihtiyaç duymaktadır.

Çalışmada amaç, doxorubicinin, aminoasit türevi içeren, biyoyumlu polimere adsorbsiyonu sağlanarak fizyolojik koşullarda stabilitesini arttırmak ve doğrudan hedeflenen dokuda salımını sağlamaktır. Bu amaç doğrultusunda biyoyumlu polimere doxorubicin adsorbsiyonu için koşulların optimizasyonu yapıldı ve oluşturulan polimer-doxorubicin kompleksinin in vitro salım koşulları incelendi. Yapılan denemelerde doxorubicinin spesifik olmayan etkileşim ve hidrofobik etkileşimlere yatkın polimere bağlanma göstermediği, hidrofilik etkileşimlere yatkın polimere zayıf asidik ortamda en iyi adsorbsiyonu gösterdiği belirlendi. İlaç yüklemesi çalışmalarında 1,5 mg/ml etken madde konsantrasyonundan sonraki değerlerde gram polimer başına bağlanan miligram etken madde grafiğinde lineerlikten sapma belirlendi. İn vitro salım denemelerinde pH 1,2-7,4 arasındaki koşullar incelendi ve pH 7,4 fizyolojik koşullarda polimerden ilaç salımı gözlenmezken pH 1,2 ve 2 de sırasıyla 4 saatte % 3 ve %5 ; 6 saatte %5 ve %6 lık salımlar gözlemlendi.

**Anahtar sözcükler:** Doxorubicin, Kontrollü salım sistemleri, Hidroksietilmetakrilat, Metakriloilamidohistidin



**ABSTRACT**

**INVESTIGATION OF ANTICANCER DRUG RELEASE FROM  
AMINOACID CONTAINING NANOPARTICULES**

ÖZÇALIŞKAN, Emir

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

August 2010, 60 pages

Doxorubicin is an antineoplastic agent. Due to doxorubicin's side effects and short half life in human vasculature, doxorubicin needs controlled releasing system for more efficiency.

The aim of this study is decrease or eliminate the side effects and increasing the stability of doxorubicin by adsorption on a biocompatible polymer including amino acid derivated monomers. And investigating the adsorption and releasing mechanism.

Obtained data show that doxorubicin is not adsorbed on to hydrophobic polymer but adsorbed on to hydrophilic polymer. Optimum conditions for adsorption was observed as weak acidic medium due to electrostatic interactions and hydrogen bonds between polymer and doxorubicin. optimum concentration of 1.5 mg/ml due to deviation from linearity of the adsorption graphic. Release profile investigated between pH 1.2-7.4. There was no release observed in physiologic pH 7.4 but it was observed that 3% and 5 % of drug released in 4 hours ; 5 % and 6 % of drug in 6 hours, respectively in pH 1.2 and 2.

Consequently, it was thought that p(HEMA-MAH)-doxorubicin complex increases the stability in circulation.

**Keywords:** Doxorubicin, Controlled release system, hydroxy ethyl metacrylate, metacryloilamido histidine





## TEŞEKKÜR

Lisans hayatımdan başlayıp yüksek lisans çalıőmam ile devam eden çalıőmalarımda rehberliği ile her zaman yanımda yanımda olan değerli hocam Doç. Dr. şenay şANLIER'e, yüksek lisans çalıőmamda kullanılan polimerler ile ilgili desteğinden dolayı sayın Doç. Dr. Sinan AKGÖL ve Bioreg alıőma grubuna, her zaman her koőulda destek sağlayan aileme ve çalışma arkadaőlarıma sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Bu alıőma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2009 FEN 058 no'lu proje olarak desteklenmiőtir.

**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
ÖZET .....	VII
ABSTRACT .....	VII
TEŞEKKÜR .....	X
İÇİNDEKİLER .....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	XVI
TABLolar DİZİNİ .....	XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	XIX
1. GİRİŞ .....	1
1.1 Kontrollü Salım Sistemleri .....	1
1.1.1 Nanopartiküler Kontrollü Salım Sistemleri .....	2
1.2 Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerlerin Sınıflandırılması .....	3
1.2.1 Biyoparçalanın Polimerler .....	4
1.2.2 Biyoparçalanmayan Polimerler .....	8
1.2.2.1.Hidrojel Polimerler .....	8
1.2.2.2 Çevresel Faktörlere Duyarlı “Akıllı” Polimerler .....	10
1.2.2.3 Fonksiyonel Hidrojeller .....	12
1.2.2.4 Yıldız Hidrojeller .....	13

**İÇİNDEKİLER (devam)**

Sayfa

1.3 Kontrollü Salım Sistemlerinin Salım Mekanizmaları ve Kullanılış Yolları ....	14
1.3.1 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması.....	14
1.3.1.1 Salım Hızı Önceden Programlanan İlaç Taşıyıcı Sistemler .....	14
1.3.1.2 Aktivasyon Sonucu Kontrollü Salım Sağlayan Sistemler.....	23
1.3.2 Kontrollü Salım Sistemlerinin Veriliş Yolları .....	29
1.3.2.1 Parenteral .....	29
1.3.2.12 Oküler.....	30
1.3.2.3 Nazal .....	30
1.3.2.4 Oral.....	31
1.3.2.5 Bukal ve Sublingual .....	31
1.3.2.6 Rektal .....	32
1.3.2.7 Vajinal .....	32
1.3.2.8 Transdermal .....	32
1.4 Doxorubicin .....	33
1.5 Poli(hidroksietilmetakrilat) ve poli(hidroksietilmetakrilat-metakriloilamido histidin polimeri ve uygulama alanları.....	36
1.5.1 P(HEMA-MAH) Uygulama Alanları.....	38

**İÇİNDEKİLER (devam)**

2. MATERYAL VE METOT .....	40
2.1 Materyal .....	40
2.2 Cihaz ve Sistemler .....	40
2.3 Hidroksietilmetakrilat (HEMA) İçeren Polimerinin Sentezlenmesi.....	40
2.3.1 p(HEMA-MAPA) Sentezi .....	41
2.3.2 p(HEMA-MAH) Sentezi .....	41
2.4 HEMA-MAH Polimerinin Karakterizasyonu .....	42
2.4.1 HEMA-MAH Polimerinin FTIR Analizi.....	42
2.4.2 HEMA-MAH Polimerinin Partikül Boyutunun Belirlenmesi .....	42
2.4.3 HEMA-MAH Polimerinin SEM Görüntülenmesi .....	42
2.4.4 HEMA-MAH Polimerinin AFM ile Yüzey Karakterizasyonu.....	42
2.5 HEMA İçeren Polimerlere Doxorubicin Adsorbsiyonu .....	43
2.6 Doxorubicin Adsorbsiyonu için Koşulların Optimizasyonu.....	43
2.6.1 pH değişiminin doxorubicin adsorbsiyonuna etkisi .....	43
2.6.2 Doxorubicin konsantrasyonunun adsorbsiyon üzerine etkisi .....	43
2.7 Doxorubicin Adsorbe Edilen HEMA-MAH Polimerinin FTIR Yapı Analizi.	44
2.8 İn Vitro Koşullarda Doxorubicin İçeren HEMA-MAH Polimerden İlaç Salımı .....	44

**İÇİNDEKİLER (devam)**

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	44
3.1 Hidroksietil Metakrilat İçeren Polimerlerin Sentezi .....	44
3.2 Doxorubicin Adsorbsiyonu İçin Uygun Polimerin Belirlenmesi.....	44
3.3 HEMA-MAH Polimerinin Karakterizasyonu .....	44
3.3.1 HEMA-MAH polimerinin FTIR ile yapı analizi .....	46
3.3.2 HEMA-MAH polimerinin partikül boyutunun belirlenmesi .....	46
3.3.3 HEMA-MAH Polimerinin SEM ile Görüntülenmesi .....	47
3.3.4 HEMA-MAH polimerinin AFM ile görüntülenmesi .....	48
3.4 HEMA-MAH Polimeri Yüzeyine Doxorubicin Adsorbsiyonu .....	44
3.4.1 Doxorubicin adsorbsiyonu için uygun pH belirlenmesi .....	49
3.4.2 Doxorubicin Adsorbsiyonu için Uygun Etken Madde Konsantrasyonu Belirlenmesi .....	50
3.4.3 Doxorubicin adsorbe edilen HEMA-MAH polimerinin FTIR ile yapı analizi .....	52
3.5 Doxorubicin-HEMA-MAH Polimeri ile Doxorubicin Salımı .....	54
4. GENEL DEĞERLENDİRME .....	55
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	57
ÖZGEÇMİŞ .....	60



**ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa

Şekil 1.1 İlaç konsantrasyonunun zamana bağlı değişim grafiği.....	1
Şekil 1.2 PLA, PGLA ve PCL açık formülleri. ....	5
Şekil 1.3 POE, PCA, PAH açık formülleri .....	6
Şekil 1.4 Progestasert IUD' nin Şematik Görünüşü ve 400 Gün Süreyle Progestasert IUD' dan İn Vitro ve İn Vivo Progesteron Salım Profilleri. ....	18
Şekil 1.5 Homojen ve granüler matriks yapısındaki pelletlerden etkin madde salımı.....	19
Şekil 1.6 Membran Kontrollü Transderm-Nitro İle Nitro-Dur'ün Salım Profillerinin Karşılaştırması.....	20
Şekil 1.7 Çözünmeyle kontrollü salım sağlayan sistemlerin şematik olarak gösterilmesi .....	22
Şekil 1.8 Acutrim Tablet Dikey Kesiti Ve Bu Tablette Salım Hızı İle Ozmotik Basınç Arasındaki İlişki. ....	25
Şekil 1.9 Hidrodinamik Basınçla Aktive Edilen İlaç Taşıyıcı Sistemin Dikey Kesiti .....	25
Şekil 1.10 Hidrasyonla Aktive Edilen Valrelease Tablet ve Valrelase İle Valium Tabletlerin Midede Kalış Sürelerinin Karşılaştırması. ....	27
Şekil 1.11 Daunorubicin kimyasal yapısı. ....	33
Şekil 1.12 Doxorubicin kimyasal yapısı .....	33
Şekil 1.13 HEMA ve TEGDMA metabolizması . ....	37
Şekil 1.14 p(HEMA-MAH) polimerinin yapısı . ....	38

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**Sayfa

Şekil 1.15 p(HEMA-MAPA) Polimerinin Yapısı .....	38
Şekil 3.1 HEMA-MAH Polimeri FTIR Analizi Sonucu . .....	46
Şekil 3.2 HEMA-MAH Polimeri Zeta Boyut Sonuçları.....	47
Şekil 3.3 HEMA-MAH'a Ait SEM Görüntüleri.....	48
Şekil 3.4 HEMA-MAH Polimeri AFM Görüntüsü .....	49
Şekil 3.5 Optimum pH Grafiği .....	50
Şekil 3.6 Optimum Konsantrasyon Grafiği. ....	52
Şekil 3.7 Doxorubicin FTIR Analizi Sonucu. ....	53
Şekil 3.8 HEMA-MAH Polimerine Adsorbe Edilen Doxorubicinin FTIR Analizi Sonucu. ....	53

**TABLolar DİZİNİ**Sayfa

Tablo 1.1 ISO 10993 ve FDA 1995 Tüzüğüne Göre Test Materyalinde Yapılması Gereken Testler.....	3
Tablo 1.2 In vitro Salım Mekanizması Belirlemek İçin Kullanılan Eşitlikler .....	26
Tablo 1.3 İnce Polimerik Filmlerden Difüzyonla Olan Salım Mekanizmaları.....	28
Tablo 3.1 Farklı Polimerler Kullanılarak 2 Saatlik Karıştırma İle Elde Edilen Adsorbsiyon Verileri.....	45
Tablo 3.2 Optimum pH Denemesi Sonuçları.....	50
Tablo 3.3 Optimum Konsantrasyon Tablosu .....	51
Tablo 3.4 Doxorubicin-pH-Salım Tablosu .....	55

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
µm	Mikrometre
Nm	nanometre
KDa	Kilodalton
ζ-boyut	Zeta boyut
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PACA	Poli(siyanoakrilat)
PEG	Poli(etilen glikol)
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
PGA	Poli(glutamik asit)
POE	Poli(ortoester)
TEGDMA	Trietilenglikoldimetil akrilamit
i.v	İntravenöz
i.m	intramuskular
s.c	subkutan

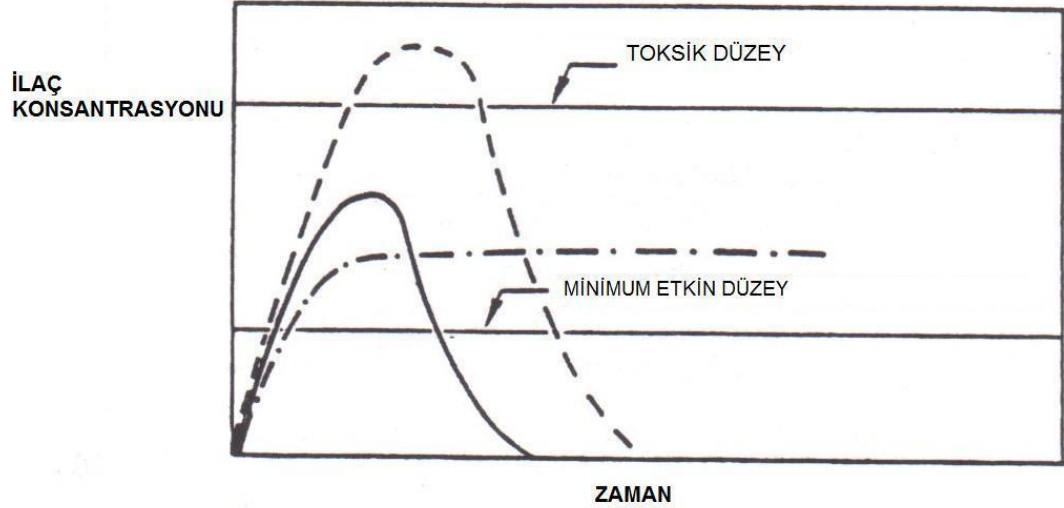
Açıklamalar

i.p	İntraperitonal
PACA	Poli(alkilsiyano akrilat)
PVA	Poli(vinil alkol)
P(HEMA)	Poli(hidroksietil metakrilat)
MAH	Metakriloilamidohistidin
PDEMA	Poli(dietilaminoetil metakrilat)
PDMAEMA	Poli(dimetil aminoetil metakrilat)
LCST	Düşük kritik çözücü sıcaklığı
AA	Akrilik asit
MAA	Metakrilik asit
PEVAc	Poli(etilen vinil asetat)
PDMS	Poli(dimetil siloksan)
P(HEMA-MAH)	Poli(hidroksietilmetakrilat- hidroksietilmetakrilat)
P(HEMA-MAPA)	Poli(hidroksietilmetakrilat- metakriloilamidofeninalanin)
DOX	Doxorubicin

## 1. GİRİŞ

### 1.1 Kontrollü Salım Sistemleri

Kontrollü salım sistemleri ilaçların etkinliği artırma amacıyla kullanılan sistemlerdir. Geleneksel ilaçların tek doz uygulanmasından sonra etken maddenin kandaki konsantrasyonu artar, bir süre sabit kalır ve sonrasında azalır (Şekil 1.1). Kontrollü salım sistemleri kullanılarak etken maddenin kandaki düzeyi bir süre sabit kalması sağlanır, bunun yanısıra etken maddelerin yan etkileri ve/veya toksik etkileri azaltılabilir/ortadan kalkabilir. Kontrollü salım sistemleri kullanılarak vücutta yarı ömrü kısa olan etken maddelerin ömrü uzatılabilir veya doğrudan istenilen dokuya hedeflendirme yapılarak etkinlik artırılabilir (Gürsoy; Gürsoy'dan 2002).



(-) : Güvenli doz, (---) : Toksik doz, (-.-) : Kontrollü salım

Şekil 1.1 İlaç konsantrasyonunun zamana bağlı değişim grafiği.

Kontrollü salım sistemleri sağladıkları bu avantajların yanında bazı dezavantajları da vardır. Bunlar:

- 1) Kullanılan polimerin kendisinin veya parçalanma ürününün toksik etki veya biyolojik uyumsuzluk göstermesi ihtimali
- 2) İstendiği anda ilacın salımının durdurulamaması
- 3) Formülasyon için gerekli harcamanın yüksek olması

- 4) Her ilaca kontrollü salım sistemi hazırlanamayacağı gibi her ilaç için tek bir yöntem olmaması, olarak sıralanabilir. (Gürsoy; Gürsoy'dan 2002).

### **1.1.1 Nanopartiküler kontrollü salım sistemleri**

Geleneksel kanser ilaçlarının katı tümörlerdeki düşük etkinliği birkaç madde ile açıklanabilir. Tümör çeşidine bağlı olarak tümör kütesinin % 90'ına kadarı stromal yapıdadır. Dokular arasında bulunan bu boşluk bazı ilaçlar için depolama alanı görevi yapabilir ancak tümör hücreleri ve damarlar arasındaki mesafeyi çoğaltarak ilacın hedefe varması için yolunu uzatmaktadır. İkinci olarak tümör dokusundaki damarlanmanın homojen olmaması nedeniyle tümör hücreleri her zaman kan damarları ile beslenmez. Ayrıca yeni damarlanmadaki şekil bozuklukları dolaşım hızını sınırlar. Üçüncü olarak iyi şekillenmiş bir lenfatik ağın yokluğu dokular arası boşlukta basıncı artırır ve sürekli bir dolaşım sağlanmasını engeller. Bu durumda difüzyon, ilaçların alımı için tek yol olarak kalır. Son olarak, bazı bölgelerdeki damarlar geçirgen iken bazı bölgelerdeki damarların geçirgenliği azalmıştır, bu durum tedavinin her bölgede eşit etki edemediğini göstermektedir. Bunun yanı sıra çoklu ilaç dirençliliği istenmeyen etkileşimler arasındadır (Dubernet et al. from Wise 2000).

Doxorubicin, farklı tür kanserlerin tedavisinde kullanılan antrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Tedavisi sırasında görülen yan etkileri dolayısıyla kullanım dozu sınırlı olarak kalmakta veya etkin dozlarda yan etkileri artmaktadır.

Bu tür etkilerinin giderilmesi veya azaltılması amacıyla doxorubicin için hedefli gönderim sistemleri veya kontrollü salım sistemleri çalışmaları yapılmaktadır. Kontrollü salım sistemi çalışmalarında amaç ilacın, sistemden belirli zaman aralıklarıyla salımını sağlayarak ilacın kandaki konsantrasyonunu etkin aralıkta tutmaktır. Hedefli gönderim çalışmalarında ise doğrudan tümöre spesifik yöntemlerle tümör hücreleri hedef alınmaktadır.

Yapılan bu çalışmaların etkinliği açısından nanoteknoloji ve nanoparçacıklar günümüzde büyük önem kazanmıştır. Nanoparçacıklar 10-1000 nm arası katı, kolloidal parçacıklardır ancak tıbbi kullanımda 200 nm den küçük parçacıklar nanotıp olarak adlandırılmaktadır. Nanoparçacıklar küçük ve biyobozunur olmalarından dolayı kullanım açısından avantajlıdır. En küçük kapiler damar çapının 5-6 µm dolayında olduğu düşünüldüğünde, nanoparçacıklar

emboliye neden olmaksızın kullanılabilir. Bunun yanısıra Caco2 hücrelerinde 100 nm boyutundaki nanoparçacıkların 1 µm boyutundaki parçacıklara göre 2,5 kat, 10 µm boyutundaki parçacıklara göre ise 6 kat fazla alımı olduğu gözlenmiştir (Singh and Lillard; 2009).

Nanoparçacıklar çalışmada kullanılacak ilacın özelliklerine bağlı olarak seçildiğinde yüksek adsorbsiyon kapasitesi sağlamakla birlikte ilacın biyoyararlanımını ve salım zamanını arttırabilmektedir. Ayrıca boyutları 100 nm'den küçük ve yüzeyi hidrofilik olan nanoparçacıklarlar mononükleer fagositik sistem tarafından tanınmamakta ve bu nedenle dolaşımında kalma süreleri uzamaktadır (Kumari et al., 2010).

## 1.2 Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerlerin sınıflandırılması

Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan polimerlerin seçiminde, kullanılış yolu, etkin maddenin cinsi, dozu ve salım süresi dikkate alınır. Öncelikle kullanılış yolun değerlendirilir. Etkin maddeler değişik yollarla vücuda verilirler. Oral, nazal, bukal, oküler, rektal veya vajinal yollar dışında enjeksiyon ( i.v., i.m., s.c., i.p.) transdermal yollar kullanılır. Kullanım yolunun doğru seçimin yapılmasında etkin maddenin cinsi, dozu ve etki süresi önemli bir rol oynar.

**Tablo 1.1** ISO 10993 ve FDA 1995 tüzüğüne göre test materyalinde yapılması gereken testler.

Test Cinsi	Yöntem
Hücreye toksik etki	Fare fibroblast hücre kültürü
Alerjik cevap	İntradermal enjeksiyon, yama uygulamak
İntrakutan iritasyon	Test hayvanlarına intrakutan enjeksiyon
Sistemik toksisite	Sıçanlara i.v. enjeksiyon
Pirojenite	Tavşanlarda ateş yükselmesi
Genetik toksisite	Salmonella typhimurium ve Esscherichia coli suşları kromozom değişimi
Dokuya implantasyon	Makroskopik ve mikroskopik doku cevabı
Gözde iritasyon	Tavşan gözüne uygulama
Hemoliz	İnsan kanında hücre etkisi ve humorel etki

Örneğin protein ve peptit yapılar oral yoldan verilemezler zira gastrointestinal sistem enzimleri tarafından parçalanırlar. Bir çoğu sadece enjeksiyon yolu ile verildiklerinde etkili olabilirler. Protein yapılarla ilgili bu güçlük proteinlerin oral yoldan verilmesi için yeni polimer arayışları gündeme getirmiştir. Örneğin insülin ve diğer protein yapıların oral yoldan alınabilmesini sağlayan amaca uygun polimerler getirilmiştir. Son yıllarda, ilacın yapısına etki etmesi istenen bölgeye ve hatta etki süresine uygun yeni polimerler geliştirilmekte ve bu polimerler “terzi yapımı”, “akıllı polimerler” veya “fonksiyonel polimerler” olarak adlandırılmaktadır. Örneğin, hidrofilik polimer yapıya, bir antijen ve onun antikoru graft edilirse antijenin antikora bağlanması, polimer yapıda fazladan bir çapraz bağlanma sağlar. Etkin madde yüklenmiş yapısında antijen, antikor içeren polimer, aynı antijeni serbest olarak içeren bir çözelti ile temas ettiğinde, serbest antijen polimer yapıdaki antikora bağlı antijenle yer değiştirir, sonuç olarak polimer yapının bağlarında değişim olur ve polimer gevşer ve şişer. Böylece istenilen bölgede etkin madde salınabilir. Ayrıca çevreye duyarlı polimerler yani pH, iyonik güç ve sıcaklık gibi çevre faktörlerinden etkilenen polimerler geliştirmek mümkün olabilmiştir. Polimerler çok genel sınıflandırılmaya tabi tutulmuşlar ve başlıca iki grup olarak incelenmişlerdir.

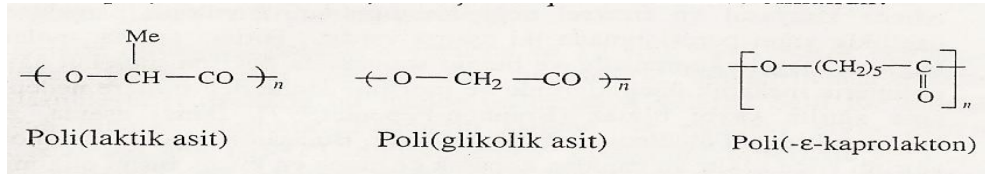
- Biyoparçalanabilen polimerler
- Biyoparçalanmayan polimerler

### 1.2.1 Biyoparçalananan polimerler

Biyoparçalananan polimerler suda çözünmezler fakat biyolojik sıvılarla temas edince kimyasal ve fiziksel değişime uğrarlar. Biyolojik parçalanmada özellikle yığın parçalanmada iki aşama vardır. Birinci aşama, moleküler bağların rastgele kopmasıdır ve bunun sonucunda değişen molekül ağırlığı polimerin mekanik özelliklerinde ve morfolojisinde değişimlere neden olur ama ağırlık kaybı olmaz. İkinci aşama zincir kopması yanı sıra ölçülebilir ağırlık kaybıdır. Bu aşamada polimerlerin molekül ağırlığı iyice azalır ve yapıdan koparak çözülen en küçük birim oligomerler oluşur. Bu oligomerler en yakın dokuya difüze olacaklarından biyolojik olarak uyumlu olmaları istenir. Vücutta parçalanabilen polimerlere örnek olarak poli(laktik asit), polianhidrit, poli(glikolik asit), poli(ortoester), poli(kaprolakton), poli(aminoasitler), poli(alkil-2-siyanoakrilat) verilebilir.

Parçalanabilen bağlar başlıca üç grupta toplanabilir ve bu gruplandırma parçalanabilen bağın bulunduğu yere göre yapılır. Parçalananan bağ, (i) polimer ana

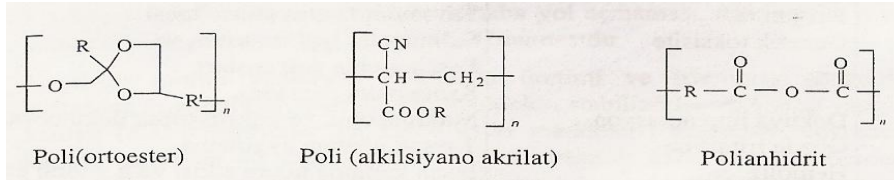
zincirinde (ii) çapraz bağlarda (iii) yan zincirlerde olabilir. Polimerlerin parçalanması, hidrolitik veya enzimatik mekanizmalarla veya her ikisi ile birden olur polimerin parçalanmasında hangi mekanizmanın daha fazla olduğu bir çok faktöre bağlıdır. Özellikle parçalanma ortamı önemlidir. Ayrıca parçalanma bu mekanizmalardan biri ile başlayıp diğerine dönüşebilir. Bu parçalanma sonucu oluşan ürünler vücut tarafından tekrar absorbe edilir veya normal biyolojik yoldan elimine edilir. Hidrolizle parçalanan polimerler; poli(laktik asit), polianhidrit, poli(glikolik asit), poli(ortoester), poli(kaprolakton), poli(aminoasitler), poli(alkil-2-siyanoakrilat) dır. Enzimatik olarak parçalanabilenler birçok poli(amino asit) örneğın, poli(L-lisin), poli(L-arjinin), poli(L-aspartik asit), poli(L-glutamik asit) ve poli(N-(2hidroksietil)-L-glutamin) 'dir .



Şekil 1.2 PLA, PGLA ve PCL açık formülleri

Poli(laktik asit) (PLA) ve poli(glikolik asit) (PGA): Poliester grubunun en önemli örnekleri PLA ve PGA ve bunların kopolimerleridir. PGA yaklaşık 20 yıldır absorbe olabilen cerrahi iplik olarak kullanılmaktadır. Uzun yıllar yapılmış araştırmaların sonuçları her iki polimerin toksik olmadığını göstermektedir. Laktik asit optik olarak aktif olduğu için, L-laktik asit, D-laktik asit ve her ikisinin rasemik karışımı D,L-laktik asit vardır. Genelde poli(D,L-laktik asit) tercih edilir zira film oluşturma özelliği iyidir. Bütün poli(laktatlar) bilinen çözücülerde çözülür ve kolay işlenirler. PGA'ler erime derecesi yüksektir ve bilinen çözücülerde çözünmezler. Bununla birlikte %30-%50 oranında PLA ile oluşan kopolimerlerin çözünürlüğü ve fiziksel özelliği makul boyutlarda olur. PGA ve kopolimerleri kontrollü salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılır.

Poli(-ε-kaprolakton) (PCL): PCL ilaç taşıyıcı polimer olarak ilk in vivo incelenen polimerlerden biridir. PCL biyolojik olarak geçimli ve yavaş parçalanan kısmen kristal yapılı, yüksek molekül ağırlıklı ve oldukça hidrofobik bir polimerdir. PCL'lerin bozulması sırasında zincirlerin kopması sonucu molekül ağırlığı azalır ancak kristallliği artar. Zincir kopması polimerin amorf bölgesinde olur ve büyük hareketlilik kazanan polimer zincirleri sonuçta tekrar tekrar yönlendirilerek yeniden kristallenirler ve böylece kristallik artar. PCL'nin aşınma süreci PLA ve PGA ya benzer.



Şekil 1.3 POE, PCA, PAH açık formülleri

**Poli(ortoester) (POE):** POE'ler biyolojik olarak aşınabilen hidrofob polimerlerdir ve belli şartlarda yüzeyden heterojen aşınmaya uğrarlar. POE, ana zincirlerinde pH ya hassas bağlar olduğu için alkali ortamda dayanıklı fakat asit ortam hidrolize açıktır. Polimere asit yada bazik yardımcıları ilave ederek aşınma hızı kontrol edilebilir. Bir POE matrikse ilave edilen etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri hem salım hızına hem de polimer matriksin aşınmasına etkilidir. Eğer matrikse hidrofilik bir etkin madde ilave edilirse, polimerin hidrofob özelliği azalır, etkin madde salım hızı ve polimerin bozulması çok hızlanır. Oysa matrikse hidrofobik bir etkin madde ilavesi, polimere suyun penetrasyonunu engeller ve sonuçta parçalanma hızını azaltır. Fakat ilave edilen maddenin bazik veya asit özellikte olmasına bağlı olarak bu özellik değiştirilebilir.

**Poli(alkil siyanoakrilat) (PACA):** PACA aşınma hızının alkil grubunun uzunluğu arttıkça, azaldığı gözlenmiştir. Etil, n-hekzil poli(alkil-2-siyanoakrilat)'larda aşınma hızı alkil grubunun uzunluğuna göre giderek azalır. Ayrıca aşınma hızının molekül ağırlığı ile ters, pH ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. PACA'ların toksisitesi alkil grubunun zincir uzunluğu ile ilgilidir; poli(metil-2-siyanoakrilat) yüksek derecede ve poli(izobütil-2-siyanoakrilat) orta derecede toksittir. Fakat bütilden daha uzun alkil grubu içeren PACA'lar ise daha yavaş parçalandıkları için minimum toksisite göstermektedir.

**Polianhidritler:** Hidrofobik özellikte diasit monomerden hazırlanan polianhidritlerin içerdiği anhidr bağlar kolay hidroliz olur ve poliasit iyonize duruma geçer sonuç olarak polimer yüzey aşınma gösterir. Ancak hidrofobik homopolimerin tamamen aşınması üç yıl sürer. Bundan dolayı sebasik asit ve diğer diasitlerle hazırlanan kopolimerleri 2-10 hafta gibi daha kısa sürede parçalanabilirler. İster kopolimer ister homopolimerler olsun parçalanmaları pH'ya bağlıdır. Polianhidritler, asit pH'da stabildir, parçalanmaz ve ortamın pH'sı arttıkça parçalanma hızlanır. Etkin madde salımı polimerin aşınması ile paralel yürür. Anhidritler, aşınma özellikleri, 0. derece salım kinetikleri, insan ve

hayvanlarda toksik belirtiler göstermemiş olmaları dolayısıyla kontrollü salım sistemlerinde büyük bir ümit vaat etmektedir.

**Poliamitler:** Vücutta enzimatik olarak parçalanabilirler. Doğal poliamitlerden jelatin, kollajen kontrollü salım sistemlerinde basan ile uygulanmıştır. Doğal poliamitlerde yapıların mekanik olarak zayıf olması, aşınmanın enzimatik yürümesi ve ayrıca yığın aşınma görülmesi gibi sakıncalar dolayısıyla yapıları daha güçlü ve kontrollü salım kinetiğine ulaşılabilen sentetik poliamitler tercih edilmektedir. Sentetik poliamitlerin bir diğer üstünlüğü, oluşturulan kopolimerde kullanılan hidrofil polimer oranına göre aşınma hızının kontrol edilebilmesidir. Örneğin, etil-L-glutamat ve L-glutamik asit kopolimerinde, glutamik asit oranı artırılarak parçalanma hızlandırılabilir. Ayrıca bu kopolimerden oluşturulan matrikste glutamik asit miktarına bağlı olarak şişme artışı için ilaç geçirgenliği hızlanmaktadır. B-benzil-L-aspartat ve  $\gamma$ -metil-L-glutamat(1 :1) kopolimerleri %33 su tutabilir ve parçalanma hızı oldukça fazladır. Poli(amino asitler) biyolojik uyumlu polimerlerdir.

**Poliüretanlar:** Poliester veya polieter yapılı poliüretanlar, kauçuğumsu, geçirgen, biyolojik olarak parçalanabilen ve yığın hidrolizi gösteren polimerlerdir. Hidrofilik/ hidrofobik oran ayarlanarak değişik salım hızı olan poliüretanlar hazırlanabilir.

**Pektin:** Pektin, galakturonik asit ve onun metil esterlerinden oluşmuş heterojen yapılı bir polisakkarittir. Enzimatik olarak parçalanır ve kolon bakterileri bu parçalanmada çok etkilidir. Bitkilerden çeşitli işlemler sonucu değişik metoksil yüzdesi olan pektinler elde edilir. Metoksil derecesi pektinin özelliklerini belirler. Metoksilasyonu yüksek olanlar çok az, düşük olanlar fazla çözünür. Metoksil derecesi düşük olanlar kalsiyum gibi divalen katyonlarla çapraz bağlanarak çözünürlüğü ve etkin madde salımı denetlenebilen pektinat jeller oluşturulabilir.

**Dekstran:** Dekstran bir polisakkarittir. Soğuk suda çözünerek düşük viskoziteli çözeltiler verir. Vücutta parçalanan dekstran yapıya PEG bağlanarak (PEG-Dex) hazırlanmış ve bu polimerik yapıdan insülin salımı yüzey aşınma ile gerçekleşmiştir.

**Kitosan:** Kitosan bir polisakkarittir. Kitosan ve suda çözünen türevi hidroksipropil kitozan toksik olmayan ve vücutta enzimatik olarak parçalanabilen

bir polimerdir. Kontrollü salım sistemlerinde çok kullanılır ve bu amaçla mikropartikül, implant ve insertleri hazırlanmıştır. (Güler E.M, 2010)

## **1.2.2 Biyoparçalanmayan polimerler**

Biyoparçalanmayan polimerler biyolojik ortamlarda parçalanmazlar. Bu polimerler hidrofil veya hidrofob yapıda olurlar. Hidrofil polimerler hidrojeller olarak adlandırılırlar, suda çözünmez ama suda şişerler. Hidrofob polimerler suda çözünmez ve şişmezler.

### **1.2.2.1 Hidrojel Polimerler**

Hidrojeller üç boyutlu, çok miktarda su veya biyolojik sıvı tutabilen hidrofil polimer yapılarıdır. Hidrojeller, hazırlanma yöntemlerine göre homopolimer veya kopolimer yapıda olabilirler. Bağlı yan gruplarının yapısına göre nötral veya iyonik olarak, fiziksel yapılarına göre, amorf, yarı kristal, hidrojen bağlı, süper molekül ve hidrokolloit agregatlar olarak sınıflandırılabilirler. Ayrıca mukozaya yapışabilen ve bulunduğu ortama göre şişme gösteren hidrojeller vardır. Bu hidrojeller buldukları fizyolojik ortamın pH'sına, sıcaklığına ve iyonik gücüne göre davranırlar. Hidrojellerin özellikleri, anyonik, katyonik veya nötral yapılarına bağlıdır. İyonik hidrojellerin şişmesinde, yüklü polimer zincirler ile serbest iyonlar arasındaki iyonik etkileşim ve birbirini itmesi önemli rol oynar. İyonik hidrojeller nötral hidrojellerden daha fazla şişerler. Bu durumda iyonik jellerde ilaç veya protein transferi, nötral jellerden belirgin olarak farklıdır. Hidrojellerden ilacın salımı tamamlanıncaya kadar biyolojik aktivite korunur. Hidrojellerden salım, hidrojinin şişme derecesine bağlıdır ve şişmede çapraz bağlanma derecesi de etkilidir. Çapraz bağlanmanın fazla olduğu hidrojellerde sıkı bir yapı görülür, zincirlerin hareketi kısıtlıdır ve bu durum şişmeyi engeller. Oysa çapraz bağlanmanın az olduğu hidrojellerde zincirler serbest hareket edebilir ve şişme kolaylaşır. Dolayısıyla çapraz bağlanma yüzdesini ayarlayarak istediğimiz şişme derecesinde yeterince elastik hidrojeller hazırlayabiliriz. Ayrıca kopolimerizasyonla hidrojel hazırlanması, istenilen mekanik özellikleri sağlamada iyi bir yöntemdir. Hidrojinin kimyasal yapısı da şişmede etkili faktördür. Hidrofil grup içeren hidrojeller, hidrofob grup içerenlere göre daha fazla şişerler. Camsı ve kuru polimere su penetre oldukça camsı geçiş sıcaklığı düşer ve makromoleküler zincirlerin yeni bir düzene girmesi sonucu polimer kauçuğumsu hal alır. Önce Fick difüzyonu gösteren hidrojelde, kauçuğumsu durumda Case II transport söz konusudur.

Hidrojeller salım mekanizmalarına göre altı sınıfta toplanmıştır.

- Difüzyon Kontrollü
- Şişme Kontrollü
- Kimyasal Kontrollü
- Çevresel Faktörlere Duyarlı (pH, sıcaklık, iyonik şiddet)
- Fonksiyonel Hidrojeller
- Yıldız Hidrojeller

En çok kullanılan hidrojeller, PHEMA, PVA, poli(N-vinil-2-pirolidon) (PNVP), PEG ve bunların kopolimerleridir.

Poli(vinil alkol) (PVA): PVA, toksik olmayan, hidrofilik, mukozaya yapışabilen önemli bir polimerdir. Polipeptit etkin maddelerin taşıyıcısı ve kontrollü salımı için PHEMA ve PVA kopolimerleri kullanılmaktadır.

Poli(etilen oksit)(PEO) ve poli(etilen glikol) (PEG): PEO ve PEG hidrojelleri son yıllarda kontrollü salım sistemlerinde çok önem kazanmıştır. Zira bu hidrojeller plazmadan protein adsorbe etmedikleri için plazmada uzun süre kalabilirler (Stealth özellik). PEG'ler suda çözünebilen, toksik olmayan, immünojenik olmayan ve biyoadhezif polimerlerle birlikte kullanıldığında adhezif özelliği artıran hidrojel polimerdir. PEG iyi bir protein ve peptit taşıyıcıdır, onları proteolitik enzimlerden korur. PEG bir başka moleküle kovalent bağlanınca kendi özelliklerini koruyarak yeni oluşturulan moleküle aktarır. PEG ile oluşturulan taşıyıcı sistemin yüzeyine protein yapışmasını engeller ve böylece taşıyıcının mononükleofagositik sistem (MPS) tarafından tanınmasını önler. Dolayısıyla PEG içeren taşıyıcı sistemler sistemik dolaşımında uzun zaman kalarak ilacı salabilirler.

Çapraz bağlı PEG yapı üç şekilde hazırlanır:

1. PEG zincirlerini kimyasal işlemle çapraz bağlama
2. Radyasyonla çapraz bağlama
3. Mono ve difonksiyonel PEG'ler arası kimyasal reaksiyon

PEO hidrojelleri radyasyonla çapraz bağlanarak hazırlanabilir. Hidrojel olarak birçok yeni materyal tasarlanmıştır. Örnek olarak, skleroglukan ve skleroglukanla çapraz bağlanmış gellan ve ayrıca kitosan bazlı siklodekstrinlerin değişik tipleri verilebilir. Kitosan çok ümit vaat eden bir polimerdir, tek başına veya başka polimerlerle örneğin, PEG ile oluşturduğu kopolimeri kullanılır. Kitosan ve kitosanlı taşıyıcı sistemler, kolona ilaç hedeflendirmede ve mukoadezif olarak uygulanmaktadır. Homopolimer ve kopolimer hidrojellerin yapısında PEG önemli bir rol oynamayı sürdürmektedir. Ayrıca büyük molekülü poli(etilen oksit) (PEO) gibi polimerlerin salım özelliklerini iyileştirdikleri bildirilmiştir. Son zamanlarda hidrofilik polimerlerin teknolojisiyle ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Örneğin, düzenli ve uzun süreli salım için hidrofilik taşıyıcıların kısmen kaplanması yöntemleri tartışılmaktadır. Hidrojellerin yapısında bakiye olarak, reaksiyona girmemiş monomer, oligomer veya çapraz bağlayıcı maddenin bulunması toksik etkiye neden olur. Akrilat ve metakrilat monomerlerinin kimyasal yapıları ile toksisiteleri arasındaki ilişki incelenmiş ve hidrojellerde toksisite sorununa en iyi çözümün, çapraz bağlamanın gama radyasyonla yapılması olduğu bildirilmiştir.

### **1.2.2.2 Çevresel Faktörlere Duyarlı “Akıllı” Polimerler**

Son zamanlarda, çevre faktörlerinden etkilenen polimerlerin hazırlanması ve özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu polimerler "akıllı polimerler" olarak adlandırılırlar. Uyarılara hassas olan bu polimerler buldukları ortamın değişen şartlarına uygun cevap verirler. Örneğin, pH, iyonik güç, sıcaklık ve etkin madde konsantrasyonu, çözücü yapısı gibi bazı çevre faktörlerinden etkilenerek şişme özellikleri değişen hidrojeller bu gruptandır. Ortama cevap veren hidrojeller içinde en önemlileri pH veya sıcaklığa veya her ikisine birden cevap veren polimerlerdir. İyonize olabilen grup(karboksilik asit ve amin gibi) içeren hidrojeller pH ve iyonik güce duyarlıdır. Grupların iyonize olması sonucu ortaya çıkan elektrostatik itme yapının genişlemesine ve suyun içeri difüzyonuna neden olur. En fazla kullanılan pH hassas hidrojeller: PAA, PMAA, poli(dietilaminoetil metakrilat)(PDEAMA), poli(dimetilaminoetil metakrilat) (PDMAEMA) ve bunların kopolimerleridir.

Bu polimerler aşağıdaki faktörlerle aktive olurlar:

**İyonik Gücün Etkisi:** İyonik hidrojelilerin şişmesinde birçok faktör rol oynar. Jelin iyon miktarındaki artış hidrofilik özelliğini etkileyerek hızla şişmesini ve en yüksek denge şişine değerine ulaşmasını sağlar.

**pH Etkisi:** Son zamanlarda farmasötik uygulamalarda kullanılabilen birçok pH hassas hidrojel geliştirilmiştir. Asit veya bazik özellikteki gruplarından dolayı iyonik yapı gösterirler. Uygun pH ve iyonik ortamda bağlı grupların iyonizasyonu sonucu elektrostatik itme olur ve jel su alarak şişer. Bu tip hidrojel protein salımı için çok uygun bulunmuştur. Özellikle insulin ve kalsitoninle başarılı sonuçlar alınmıştır.

**Sıcaklığın Etkisi:** Buldukları ortamın sıcaklığının değişmesi hidrojel hacinin hacim-faz değiştirmelerine neden olur. Bu sıcaklıkta görülen hacim değişimi, polimer zincirinin bileşenlerine ve hidrojel iyonizasyon derecesine bağlı olarak geri dönüşümlüdür. Sıcaklık kritik bir değere ulaştığında polimerde faz değişimi olur ve polimeri çözen bu en düşük çözücü sıcaklığına "düşük kritik çözücü sıcaklığı" (lower critical solution temperature)(LCST) denilir. Bu polimerler LCST değerinin altında çözünürler ve üstünde çökerler. LCST değeri, sıcaklığa duyarlı ve yan zincirlerinde iyonize gruplar olan polimeri erde pH'ya da bağlıdır. Ayrıca polimerin hidrofilik/lipofilik dengesi de LCST değerini etkiler. N-izopropil akrilamid (NIPAAm), HEMA ve akrilik asit(AA) değişik oranlarda karışımları ile molekül ağırlığı 49000 ile 3 milyon arası olan pH/sıcaklığa hassas termpolimerler oluşturulmuş ve bunlardan boncuklar hazırlanmıştır. Molekül ağırlığını değiştirerek boncukların fiziksel özelliklerinin, örneğin çözünme ve şişme özelliklerinin değiştirilebileceği bildirilmiştir.

NIPAAm ve metakrilik asitten (MAA) sentez edilen hidrojel, çevre faktörlerine duyarlılıkları ve bu duyarlılığa bağlı olarak iki antitrombotik maddenin (heparin ve streptokinaz) salımını kontrol edebilme yetenekleri araştırılmış, PNIPAA polimerinin sıcaklığa hassas yapısı dolayısıyla kritik çözünme sıcaklığında (LCST) şişmesinde önemli bir değişim olduğu gözlenmiştir. Oysa PMAA karboksilik asit gruplarının iyonizasyonu dolayısıyla pH hassas bir şişme göstermektedir. NIPAA ve MAA hidrojel polimerlerinin bileşimini ayarlayarak, kan dolaşımındaki küçük pH ve sıcaklık değişimlerini hissedebilen ve pıhtının yanında bu iki maddeyi, heparin ve streptokinazı, salabilen hidrojel kopolimeri oluşturmak mümkün olmuştur. Yapılan çalışmalar bu tip, yani hem pH hem de sıcaklığa hassas hidrojel kopolimerler oluşturulabileceğini göstermektedir. NIPAAm ve butil metakrilat ve AA hidrojelinden oluşturulan kopolimerlerin

farklı bir LCST olabileceği ayrıca hidrokispropil selüloz jellerinde değişimler yaparak LCST değeri oda sıcaklığında olabilen hidrojel hazırlanabileceği gösterilmiştir. Kalsitonin salımı için bu tip hidrojel mikrobuncuk şeklinde hazırlanmıştır. Bu teknolojiye önemli gelişmelerden biri, PAA, PNIPAAm ve diğer birçok polimerden oluşturulan süper porlu hidrojel yapılarıdır. Oldukça çok porlu ve por yapısı sağlam olan bu hidrojel birçok ilaç ve proteinin hızlı salımı için kullanılabilirler.

Poli(akrilik asit) (PAA): PAA veya Carbopol, akrilik asitten oluşmuş bir polimerdir. Değişik molekül ağırlıklarında, lineer, dallanmış veya çapraz bağlı şekillerde bulunur. Bu gruba en iyi örnek Carbopol 934P, ilaç endüstrisinde en fazla kullanılan, az miktarda çapraz bağlı, molekül ağırlığı 3 milyon dalton olan ve suda çözünen bir polimerdir. Mukozaya yapışma özelliği vardır dolayısıyla çapraz bağlı mukozaya yapışan polimerlerin üretilmesinde kullanılır. PAA ve kitozan zincirine uyarılabilen polimerler graft ederek mukozaya yapışabilen biyoadeziv polimerler hazırlanmıştır.

### **1.2.2.3 Fonksiyonel Hidrojeller**

Son yıllarda tıpta uygulanan en gelişmiş ve önemli hidrojel grubudur. Fonksiyonel terimi ile, ana zincirine spesifik bir molekül bağlanmış hidrojinin, bu spesifik molekülü içeren bir ortama konulduğunda spesifik molekülü tanıması ve buna göre değişime uğraması anlaşılmaktadır. Bu spesifik moleküller, enzimler, antijenler ve lektinler olabilir. pH ve sıcaklığa hassas polimerler bu gruba ait değildir zira pH ve sıcaklığa bağlı değişim özel bir molekül varlığını gerektirmez. Fonksiyonel hidrojellere örnek, hidrofilik polimer bir yapıya, bir antijen ve onun antikoru graft edilirse, antijenin antikora bağlanması, polimer yapıda fazladan bir çapraz bağlanma sağlar. Etkin madde yüklenmiş ve yapısında antijen, antikor içeren polimer aynı antijeni serbest olarak içeren bir çözelti ile temas ettiğinde, serbest antijen polimer yapıdaki antikora bağlı antijenle yer değiştirir, sonuçta polimer yapının bağlarında değişim olur ve polimer gevşer ve şişer. Böylece istenilen bölgede ilaç salınabilir. Fonksiyonel hidrojellere diğer bir örnek, glukoza hassas hidrojellerdir. Hidrojele glukoz oksidaz enzimi bağlanır. Oksidaz enzimi glukozla temas edince iyonize olur ve hidrojel nötral halden iyonize hale geçtiği için hacmi değişerek şişer. Bu örneklerin dışında başka fonksiyonel hidrojeller de geliştirilmiştir.

#### **1.2.2.4 Yıldız Hidrojeller**

Biyoloji, tıp ve eczacılık alanlarında çalışan araştırmacıların ilgisini çeken bir başka hidrojel tipi yıldız hidrojeldir. Bu hidrojeller üç boyutludur. Orta kısmında gevşek bağlı bir çekirdek ve etrafında aynı veya farklı moleküler yapılı sayısız zincirler vardır. Bu polimerik yapılar mikro veya nanopartikül olarak hazırlanırlar. Çok sayıda serbest kolları olduğu için, ilaç, hücre, enzim veya antikorları taşıyabilirler. Yıldız polimerlerle heparinaz taşıyan nanopartiküller hazırlanmış ve cerrahi operasyon sonrası kan temizlemek ve heparini uzaklaştırmak için kullanılmıştır. Streptokinaz ve ürokinaz gibi fibrinolitik enzimleri taşıyan yıldız polimerler, kanda oluşan pıhtının eritilmesi için kullanılmışlardır.

Hidrofob polimerler, vücutta aşınmayan bu polimerler suda çözünmez ve suda şişmezler. Bu gruba başlıca örnek, silikonlar ve poli (etilen vinil asetat) kopolimeridir (PEVAc).

Silikonlar, poli(dimetil siloksan) (PDMS) ve benzeri silikon içeren polimerler vücutta aşınmazlar ve hidrofob özelliktedirler. Silikonlar kullanılan en eski polimerdir. Biyolojik uyumlu olan bu polimerler, kolay işlenebilirler ve birçok etkin maddeye geçirgenlikleri fazladır. Silikonlarla matriks ve membran kontrollü sistemler hazırlanabilir. Kontraseptif steroidler ve transdermal nitroglicerol sistemleri silikonlarla hazırlanmıştır.

Etilen-vinil asetat kopolimeri (PEVAc), etilen ve vinil asetatın çapraz bağlayıcılar varlığında kopolimerizasyonu ile hazırlanan hidrofobik, nötral ve vücutta parçalanmayan bir polimerdir. Bu polimerin önemli bir özelliği vinil asetat miktarına bağlı olarak permeabilitesinin değişmesidir. Şöyle ki vinil asetat miktarını değiştirerek istenilen özellikte bir sistem hazırlanabilir. Polietilenin %70 i kristal yapıdır. Vinil asetat %50 civarında ilave edilince kristallik çok azalır, polimer kauçuğumsu hal alır ve permeabilite artar. PEVAc'nin en fazla bilinen iki kullanımı, Alza firmasının pilokarpin kontrollü salımı yapan haftada bir uygulanan oküler ürünü Ocusert® ve bir yıl boyunca progesteron salımı yapan uterus içi sistem Progestasert®'dir. Ayrıca etilen vinil asetat birçok protein ve makromoleküllerin salımı için kullanılmıştır. (Güler E.M, 2010)

### **1.3 Kontrollü Salım Sistemlerinin Salım Mekanizmaları Ve Kullanılış Yolları**

Bütün ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlarken iki temel amaç söz konusudur. İlaç taşıyıcı sistem etkin maddeyi vücutta istenen organ veya dokuya taşıyarak, en kısa zamanda istenen kan konsantrasyonunu sağlamalı ve bu konsantrasyonu öngörülen süre zarfında devam ettirmelidir. İdeal olarak ilaç taşıyıcı sistem, etkin maddeyi istenen organ veya dokuya istenen hızda taşınmalıdır. Etkin maddeyi istenen doku veya organa taşıyan sistemlere, hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler denir. Etkin maddenin salım hızını kontrol eden sistemlere ise kontrollü salım sağlayan dozaj şekilleri veya ilaç taşıyıcı sistemler denir.

#### **1.3.1 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması**

Ticari olarak piyasada bulunan veya geliştirilmekte olan kontrollü salım sağlayan dozaj şekilleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

- Salım hızı önceden programlanan ilaç taşıyıcı sistemler
- Aktivasyon sonucu kontrollü salım sağlayan ilaç taşıyıcı sistemler
- Kendi kendini kontrol eden ilaç taşıyıcı sistemler
- Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler

##### **1.3.1.1 Salım Hızı Önceden Programlanan İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Etkin maddenin spesifik salım hız profili önceden programlanmıştır. Genelde bu salım hız profilinin önceden programlanmasında söz konusu olan, etkin madde moleküllerinin bir membran veya matriksten Fick Yasasına göre difüzyonudur. Diğer bir mekanizma ise, çözünmeyle salım hızının önceden programlanmasıdır.

### *Difüzyon Kontrollü Sistemler*

Bu sistemlerde etkin maddenin salım hızı, etkin maddenin suda çözünmeyen bir polimerden difüzyonuyla kontrol edilir. Etkin maddeyi içeren çekirdek suda çözünmeyen bir membranla kaplanmıştır. Bu sistemlere polimerik membrandan difüzyonla salım hızının kontrol edildiği sistemler denir. Etkin madde inert polimerik bir matrikste çözündürülmüş veya dağıtılmışsa, bu sistemlerde salım hızı matriksten difüzyonla kontrol edilir.

#### *Membrandan difüzyonla kontrol*

İlaç taşıyıcı sistemin etrafı suda çözünmeyen polimer bir membranla kaplanmıştır. Etkin madde, membranın içinde dağılır. Sonra membrandan sistemi çevreleyen ortama difüze olur. Bu sistemlere rezervuardan difüzyonla salım hızını kontrol eden sistemler de denir. Etkin maddenin salımı Fick'in birinci yasasına göre gerçekleşir.

$$J = -D \frac{dc_m}{dx} \quad (1)$$

Bu eşitlikte J, etkin maddenin azalan konsantrasyon yönünde membrandan akımını  $g \cdot cm^{-2} \cdot saniye^{-1}$  (miktar/yüzey.zaman), D, membrandan etkin maddenin difüzyon katsayısını  $cm^2 \cdot saniye^{-1}$  (alan/zaman) ve  $dc_m/dx$  ise membran içindeki ilaç konsantrasyonunun x uzaklığındaki değişimini göstermektedir. Membranın her iki yanında etkin maddenin dengede olduğu varsayıldığında; dağılım katsayısı (K) ile membranın iç yüzeyindeki ve x mesafesindeki etkin madde konsantrasyonları arasındaki ilişkiler (2) ve (3) nolu eşitliklerle ifade edilebilir.

$$x=0 \text{ için } K = C_{m(0)}/C_{(0)} \quad (2)$$

$$x=1 \text{ için } K = C_{m(1)}/C_{(1)} \quad (3)$$

D ve K'nın sabit olduğu varsayıldığında (1) nolu eşitliğin integrali alınabilir.

$$J = DK \Delta C/l \quad (4)$$

$C_{m(0)}$  ve  $C_{m(1)}$  etkin maddenin membranın iç yüzeyindeki,  $C_{(0)}$  ve  $C_{(1)}$  ise komşu bölgelerdeki konsantrasyonlarını göstermektedir.

Membran veya rezervuar içindeki etkin maddenin termodinamik aktivitesi sabit ve  $K < 1$  olursa etkin madde salımı, sıfırına dereceden gerçekleşebilir.

Sıfırına dereceden salımda, etkin madde katı haldedir. Farmasötik dozaj şeklinin, geometrik şekline bağlı olarak salım kinetiği değişebilir.

Farmasötik dozaj şeklinin dilim veya tabaka şeklinde olması halinde, etkin madde salımını ifade eden eşitlik;

$$\frac{dMt}{dt} = SDK\Delta C/l \quad (5)$$

şeklinde yazılabilir. Mt: t zaman sonunda salınan etkin madde miktarı, dMt/dt: t zamanındaki salım hızı, S: farmasötik dozaj şeklinin yüzey alanı, l: membranın kalınlığıdır. Benzer eşitlikler silindirik ve küre şeklindeki farmasötik dozaj şekilleri ve aygıtlar için de yazılabilir. Silindirin iç ve dış yarıçapları  $r_0$  ve  $r_1$ , yüksekliği h ile gösterildiğinde, Fick Yasası;

$$\frac{dMt}{dt} = \frac{2\pi hDK\Delta C}{\ln(r_0 - r_1)}$$

şeklinde yazılabilir.

Aynı eşitlik küre için

$$\frac{dMt}{dt} = 4DK\Delta C \left( \frac{r_0 \cdot r_1}{r_0 - r_1} \right)$$

şeklinde yazılabilir.

Bazı durumlardaki yüksek dansiteli membran, mikroporöz hidrofobik yapıda bir membranla değiştirilebilir. Bu membranın her iki yanı porlarla birbiriyle temas halindedir. Etkin maddenin salımı, sıvı dolu porlardan difüzyonla gerçekleşir

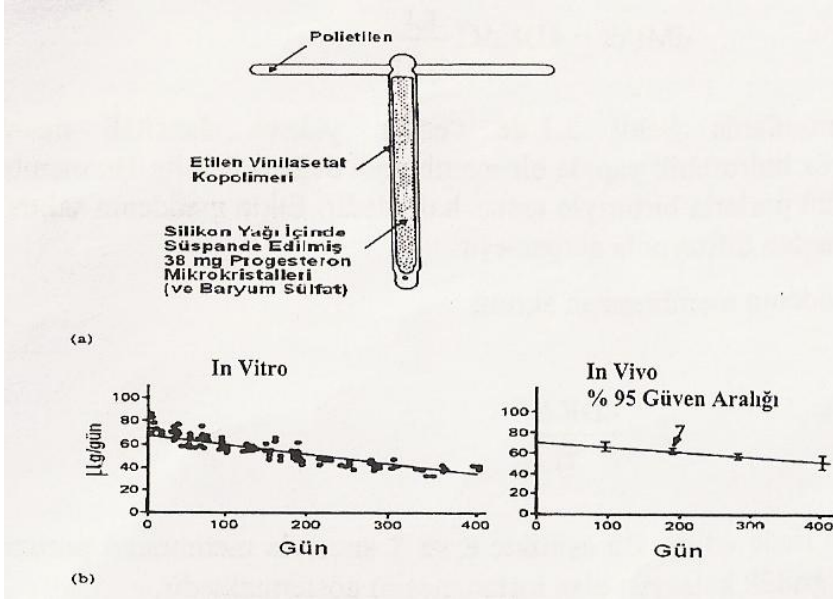
Etkin maddenin membrandan akımı;

$$J = \frac{\varepsilon DK \Delta C}{\tau l}$$

eşitliğiyle ifade edilir. Bu eşitlikte  $\varepsilon$  ve  $K$  sırasıyla membranın porozite ve eğrilik katsayısı olan tortuozitesini göstermektedir.

Kontrollü salım sağlayan membrandan difüzyonla etkin madde taşınımının kontrol edildiği bu sistemlerde; etkin maddenin dağılma ve difüzyon katsayıları, membranın kalınlığı saptanarak salım hızı önceden belirlenebilir.

Membrandan difüzyonla salım kontrol eden sistemler sıfırına dereceden salım sağlarlar. Sıfırinci derece salımdan sapmanın iki nedeni vardır. Birinci neden, etkin maddenin membran yüzeyinde birikmesidir. Etkin maddenin membran yüzeyinden uzaklaştırılması yavaş olup, etkin madde konsantrasyonu zamanla membran yüzeyinde artar. Eşitlik 4'de belirtilen  $\Delta C$ 'nin değeri azalmaya, buna bağlı olarak da etkin madde akımı ( $J$ ) azalmaya başlar. Suda çözünürlüğü sınırlı olan etkin maddeler membran yüzeyinde doymuşluk konsantrasyonuna ulaşarak bu noktada difüzyonu durdururlar. Difüzyonun durduğu andan itibaren etkin madde salımı, çözünme ortamının membran yüzeyinden etkin maddeyi uzaklaştırma hızı tarafından kontrol edilir. İkinci neden ise, ani salımdır. Etkin madde, membranı doymuşluk konsantrasyonuna yaklaştırdığında, farmasötik dozaj şekli veya aygıt aniden çözünme ortamına konulduğunda, etkin madde membrandan hızla çözünme ortamına geçer. Bu olaya ani ilaç salımı denir. Ani salımın büyüklüğü etkin maddenin membran içindeki konsantrasyon artışı, membranın kalınlığı ve membrandaki birikme süresine bağlıdır. Sıfırinci dereceden etkin madde salımı, membrandan difüzyonla salımın kontrol edildiği sistemlerde, matriksten difüzyonla salımın kontrol edildiği sistemlere nazaran daha başarılı sonuçlar verir. Bu nedenle membranlı sistemler ticari yönden daha önemlidir.



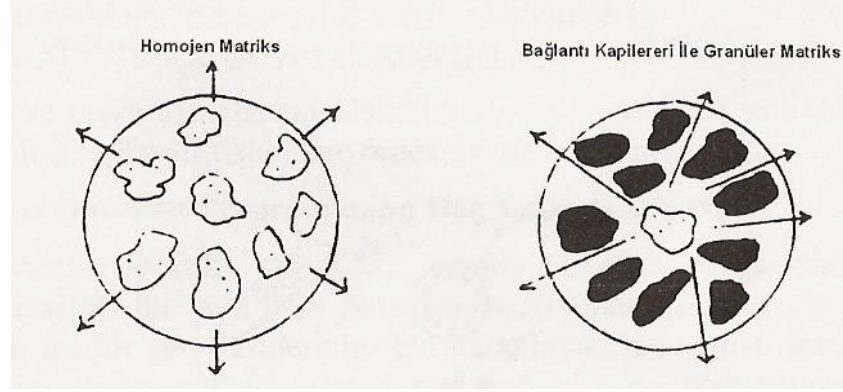
Şekil 1.4 (a) Progesteron IUD' nin şematik görünüşü, (b) 400 gün süreyle Progesteron IUD' dan in vitro ve in vivo progesteron salım profilleri.

Membrandan difüzyonla etkin maddenin kontrol edildiği sistemlere örnek olarak, bir intrauterin aygıt olan Progesteron IUD ' de, ilaç rezervuarı, silikon yağı içinde progesteron kristallerinin süspande edilmesi ile hazırlanmıştır. T şeklindeki bu aygıt poröz olmayan yapıda etilen vinil asetat kopolimerinden yapılmıştır. Progesteron IUD, uterus kavitesine  $65 \mu\text{g/gün}$  dozda progesteron salarak, 1 yıl süreyle kontrasepsiyon sağlar.

Ayrıca levonorgestrel içeren Norplant subdermal implant, Pilocarpin içeren Ocusert, Nitrogliserin içeren Transderm Nitro ve sırasıyla estradiol, skopolamin, klonidin içeren Estraderm, Transderm-Scop, Catapres-TTS; etkin maddenin membrandan difüzyonla salımının kontrol edildiği diğer örnekleri oluşturur. (Çapan, Gürsoy'dan 2002)

Matriksten etkin madde salımı aşağıdaki gibi gerçekleşir:

a) Etkin madde kristal yüzeyinden tekdüze matriksin içine geçer, buradan basit difüzyon işlemiyle ekstre edilir. Etkin madde tamamen; herhangi bir anındaki doygunluk konsantrasyonunun ( $C_s$ ) %15 inden daha düşük olduğu andaki koşul olan, sink koşullardaki matriksi çevreleyen sıvıya geçer.



Şekil 1.5 Homojen ve granüler matriks yapısındaki pelletlerden etkin madde salımı

b) Matriksi çevreleyen sıvı, porlardan ve granüller arası boşluklardan matriksin içine geçerek ilacı çözer. Çözünen ilaç difüzyonla matriksin dışına çıkar. Granül içi difüzyonun, ihmal edilebilir düzeyde olduğu varsayılmaktadır.

Salımı kontrol eden matriks homojen veya granüler yapıda olabilir.

Granüler matriks yapılı düz sistemden etkin madde, matriksten küçük kanallar aracılığıyla önce yavaş çözünme, bunu takiben ince kapiler boyutundaki kanallardan difüzyonla serbest hale geçer.

$$Q = kt^{1/2}$$

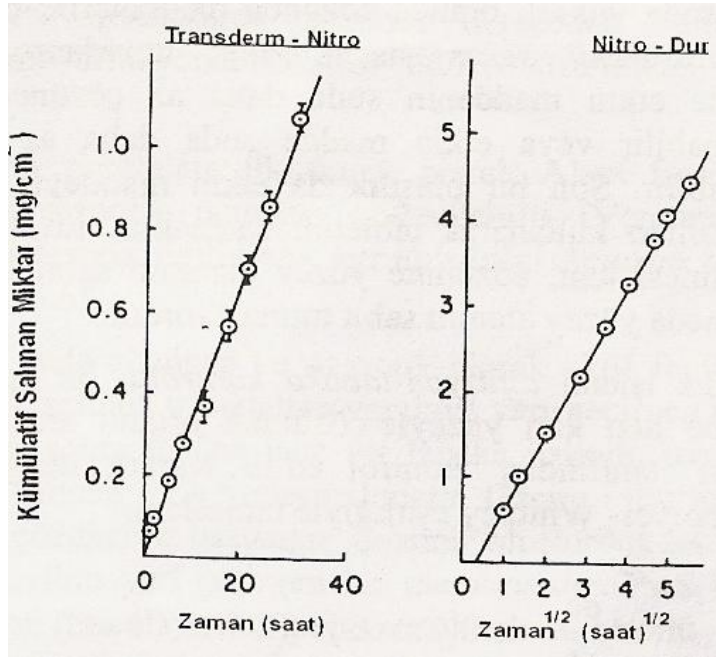
Bu eşitliğe Higuchi Salım Kinetiği denir. Eşitlikte, k, sabit olup salım hızı sabitidir, t: zaman, Q: birim yüzeyden salınan etkin madde miktarıdır. Eğer t ile Q arasında lineer bir ilişki varsa, matriksten etkin madde salımı difüzyon kontrollü gerçekleşmektedir. Etkin maddenin salım hızı sıfırına dereceden olmayıp, salım hızı zamanla azalır. Fakat Higuchi kinetiğine göre salım profili gösteren farmasötik dozaj şekilleri klinik olarak, kontrollü salım gösteren pek çok ilaçla klinik olarak eşdeğer olduğu gösterilmiştir.

Higuchi tarafından ifade edilen etkin madde salımıyla ilgili eşitlik aşağıdaki varsayımlar yapıldığında geçerlidir:

- Salım boyunca görünür kararlı denge durumu söz konusudur

- Matriksin birim hacmi içindeki etkin madde miktarı (A), aynı hacim içindeki doygunluk konsantrasyonundan (Cs) büyük olmalıdır,
- Salım ortamı sink koşullarda kalmalıdır,
- Etkin madde partiküllerinin ortalama çapı, ortalama difüzyon mesafesinden daha küçük olmalıdır,
- Difüzyon katsayısı sabit kalmalıdır,
- Etkin madde ile matriks arasında herhangi bir etkileşim olmamalıdır.

Membran ve matriks kontrollü sistemler arasındaki fark Şekil 1.6 'da gösterilmektedir. Membran kontrollü Transderm-Nitro'dan salım sıfırına, matriks kontrollü Nitro-Dur sistemde ise salım Higuchi Kinetiğine göre gerçekleşmektedir.



Şekil 1.6 Membran kontrollü Transderm-Nitro İle Nitro-Dur'ün salım profillerinin karşılaştırması.

Salım hızı, salımın % 60'ı tamamlandıktan sonra azalmaya başlar. Bunun nedeni, matriks içindeki etkin madde konsantrasyonunun doygunluk konsantrasyonunun altına düşmesidir.

Higuchi salım kinetiğinde salım üzerine etki eden parametreler: matriks içindeki etkin maddenin başlangıç konsantrasyonu, etkin maddenin çözünürlüğü, porozite, tortuoosite, çözücünün bileşimi, matriksi oluşturan polimer sistemin yapısıdır.

Bu sistemlerden in vivo çalışmalarda, sıfırına derece salım genelde elde edilemez. Bu sapma, difüzyon mesafesinin değişimi ile açıklanabilir.

Matriks tipi kontrollü salım tabletlerinde formülasyon parametrelerinden; kullanılan matriksin tipi ve oranı, tablet yardımcı maddelerinin etkisi ve etkin maddenin özellikleri pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Özellikle matriks maddesinin hidrofilik, mumsu veya inert yapıda olması gibi kimyasal özelliklerle, etkin maddenin suda çözünürlüğünün in vitro salım ve in vivo sonuçlar üzerine etkin olduğu gösterilmiştir.

### *Çözünme kontrollü sistemler*

Yavaş çözünme hızına sahip etkin maddeler, kendiliğinden kontrollü/sürekli salım sistemleri gibi davranış gösterirler. Prensip olarak suda yüksek oranda çözünen maddelerin, çözünme hızını azaltarak kontrollü/sürekli salım sistemlerinin hazırlanması olası değildir. Bu durumda etkin maddenin suda daha az çözünen bir tuzu veya türevi hazırlanabilir veya etkin madde suda daha az çözünen bir maddeyle kaplanabilir. Son bir olasılık da etkin maddeyi, suda az çözünen tablet ekspiyanları kullanarak tabletini basmaktır. İdealde sabit salım hızı elde edilebilmesi için, çözünme yüzey alanının sabit kalması gerekir. Pratikte çözünmede yüzey alanını sabit tutmak zordur.

Çözünme işlemi difüzyon-tabaka kontrollü bir işlemdir. Etkin maddenin çözünme hızı katı yüzeyle-çözünme ortamı arasında oluşan sıvı film tabakası tarafından kontrol edilir. Kararlı denge durumunda çözünme işlemi Noyes-Whitney eşitliğiyle tanımlanır.

$$\frac{dc}{dt} = kDS (C_s - C) = \left(\frac{D}{h}\right)S(C_s - C)$$

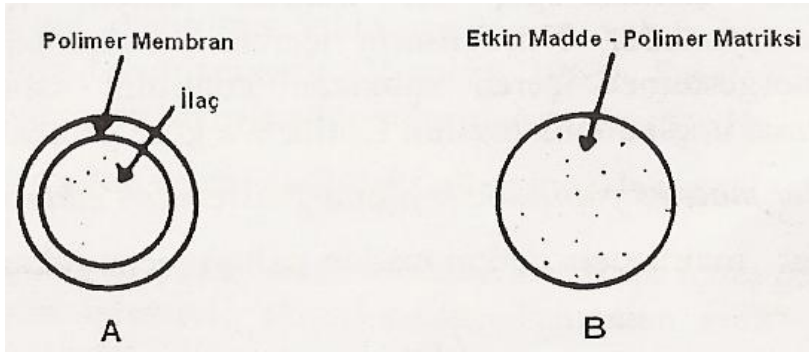
Burada  $dc/dt$ : çözünme hızı,  $kD$ : çözünme hız sabiti,  $S$ : toplam yüzey alanı,  $C_s$ : katının doyumluk çözünürlüğü,  $C$ : etkin maddenin çözeltideki

konsantrasyonudur. Çözünme hız sabiti  $k_D$ , difüzyon katsayısı  $D$ 'nin, oluşan film tabakasının kalınlığını gösteren  $h$ 'ye bölünmesiyle elde edilir. Eşitlikle sabit çözünme hızı elde edilebilmesi için; toplam yüzey alanı, difüzyon katsayısı, difüzyon tabakasının kalınlığı ve konsantrasyon farkı sabit tutulmalıdır.

Diğer bir ifadeyle sıfırına dereceden salım için, eşitliğin sağ tarafı sabit tutulmalıdır. Pratikte çözünme süresince tüm bu parametreler değişebilir, özellikle de yüzey alanı değişir. Küre şeklindeki partiküller için, yüzey alanı değişimi, partikülün ağırlığı ile ilişkilendirilebilir. Sink koşullar altında bu değişim küp-kök çözünme eşitliği ile ifade edilir.

$$W_0^{1/3} - W^{1/3} = kDt$$

Buradaki küp-kök çözünme hız sabitini,  $W_0$  ve  $W$ , başlangıç ve  $t$  zamanında çözünmeden geri kalan madde miktarlarını göstermektedir. Şekil 1.7'de çözünmeyle kontrollü salım sağlayan sistemlerin hazırlanmasındaki en yaygın iki yöntem verilmektedir.



Şekil 1.7 Çözünmeyle kontrollü salım sağlayan sistemlerin şematik olarak gösterilmesi.

Kapsüllenmiş çözünme sistemleri; etkin maddenin partikül veya granülesi yavaş çözünen polimerlerle farklı kalınlıklarda kaplanarak veya mikrokapsülasyonla hazırlanır. Mikrokapsülasyonda en fazla kullanılan yöntem koaservasyon yöntemi olup, koloidal dağılıma hidrofilik özellikte madde eklenir. Hidrofilik madde kaplama materyali olarak görev yapar. Kaplama materyalinin çözünmesiyle etkin maddenin tümü açığa çıkarak absorbe olur. Kaplamanın kalınlığı ve çözünme hızı kontrol edilerek, etkin madde salımı kontrol edilebilir. Kaplama kalınlığı 1-200 um arasında değişebilir. Etkin madde genelde 3-4 farklı kalınlıkta kaplanarak farklı salım özelliği sağlanır. Bu yöntemle geciktirilmiş salım elde edilebilir. Ticari olarak bulunan SKF Spansule® ve daha pek çok

preparat yukarıda belirtilen yöntemle hazırlanmıştır. Farklı kalınlıkta kaplanmış partiküllerle hazırlanmış kapsüllerde daha tekdüze yani sabit kan düzeyi sağlanır. Kaplanmış partiküller tablet haline getirilebilir veya bir kapsül içine yerleştirilir. Matriksten çözünmeyle kontrol yöntemiyle hazırlamada, etkin madde yavaş çözünen bir polimerle tablet haline getirilir. İlaç-polimer kompleksi hazırlarken, dondurma ve sulu ortamda dispersiyon yöntemleri kullanılır. Dondurma yönteminde etkin madde ile polimer veya mumsu maddeler karıştırılır, soğutulur, elenir. Sulu ortamda dispersiyonda ise, ilaç-polimer su içine püskürtülür, daha sonra partiküller toplanır.

### **1.3.1.2 Aktivasyon Sonucu Kontrollü Salım Sağlayan Sistemler**

Bu grupta bulunan ilaç taşıyıcı sistemlerden etkin madde salımı; fiziksel, kimyasal, biyokimyasal işlemlerle veya ilaç taşıyıcı sisteme dışardan enerji verilerek gerçekleştirilen aktivasyonla sağlanır. Salım hızı, uygulanan işlemin veya verilen enerjinin ayarlanmasıyla kontrol edilir. Bu sistemler aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

1- Fiziksel aktivasyonla salım hızı kontrol edilen kontrollü salım sistemleri; buradaki dozaj şekilleri ozmotik basınç, hidrodinamik basınç, buhar basıncı, mekanik, manyetik, sonofrez, iyontofrez veya hidrasyonla aktivasyonu sağlanan sistemlerdir.

2- Kimyasal aktivasyonla salım hızı kontrol edilen sistemler arasında ise pH ile aktive edilen, iyonizasyonla aktive edilen sistemler yer alır.

3- Biyokimyasal aktivasyonla salım hızı kontrol edilen sistemler arasında ise, enzimler ve biyokimyasal yöntemlerle aktive olan sistemler yer almaktadır.

#### *Ozmotik Kontrollü Sistemler*

Ozmotik kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde, ilaç salımı ozmotik basınçla aktive edilmektedir. Burada etkin madde sıvı veya katı olabilir. Etkin madde rezervuarı, suyun permeabilitesini kontrol eden yarı-geçirgen bir membranla çevrilmiştir. Salım için aktive edilen etkin madde sabit hızda özel bir delikten dışarı çıkar. Ozmotik basınç farkı kontrol altında tutularak salım hızı kontrol edilir. Tablet, partikül veya ilaç çözeltisi etrafına geçirilen yarı-geçirgen membran, ozmotik tabletin içi ve dışı arasında ozmotik basınç farkı oluşumunu

sağlar. Bu basınç farkı, ilaç çözeltisini delikten dışarı pompalayarak kontrollü salım sağlar. Ozmotik kontrollü sistemlerde rezervuarda yer alan ilaç çözeltisinin yarı-geçirgen membrandan ozmozla dış ortamdaki suyu çekmesi salım hızının kontrolüyle ilgili en temel özelliştir. Suyun ozmozla rezervuara geçişi kontrol altında tutularak salım hızının kontrol edildiği bu sistemlerde rezervuar içinde salınacak miktarın çok üstünde etkin madde vardır.

Etkin maddenin sıvı veya çözelti olması durumunda:

$$\frac{dV}{dt} = \frac{PwS}{h} (\Delta\Pi)$$

$dV/dt$  sıvının akım hızı,  $Pw$ ,  $S$  ve  $h$  sırasıyla membran geçirgenliği etkili yüzey alanı ve yarı- geçirgen membran kalınlığını göstermektedir.  $\Delta\Pi$  ozmotik basınç farkı,  $\Delta P$  ise hidrostatik basınç farkıdır.  $\Delta P$ 'nin çok küçük tutulması halinde  $\Delta\Pi$  yanında ihmal edilebilir. Bu durumda eşitlik;

$$\frac{dV}{dt} = \frac{PwS}{h} (\Delta\Pi)$$

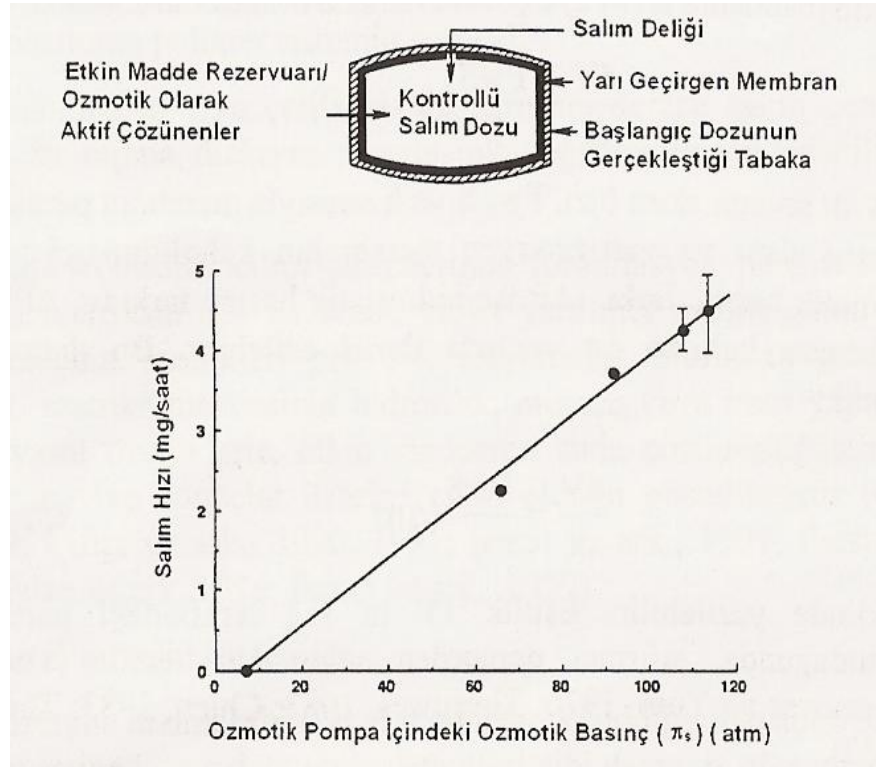
şeklinde yazılabilir.

Ozmotik kontrollü sistemlerde sıfırıncı dereceden salım hızı elde edilebilmesi oranı, difüzyonla kontrol edilen sistemlere nazaran daha yüksektir. Ozmotik kontrollü sistemlere ilk örnek olarak Alzet firması tarafından geliştirilen Alzet ozmotik pompası gösterilebilir. Bu sistemlerde salım hızıyla ilgili daha ayrıntılı bilgi Acutrim tablet üzerinde verilecektir (Şekil 1.8). Acutrim tablette; suda çözünen ve ozmotik olarak aktif fenilpropanolamin hidroklorür (PPA), selüloz triasetattan yapılmış yarı-geçirgen bir membranla çevrilmiştir. Daha sonra üstüne ince bir tabaka halinde başlangıç dozunu oluşturan hemen salınan PPA yerleştirilmiştir. Gastro-intestinal kanalda dış tabakadaki PPA çözünerek başlangıç dozunu oluşturduktan sonra, gastro-intestinal kanal sıvıları yarı-geçirgen bir membrandan  $PwS/h$ 'la belirlenen hızla yarı-geçirgen membrandan penetre olarak kontrollü salım dozunu çözer. Oluşan ozmotik basınç farkı, PPA çözeltisinin lazerle delinmiş delikten sabit hızla 16 saat süresince salımını sağlar.

#### *Hidrodinamik Basınçla Aktive Edilen Sistemler:*

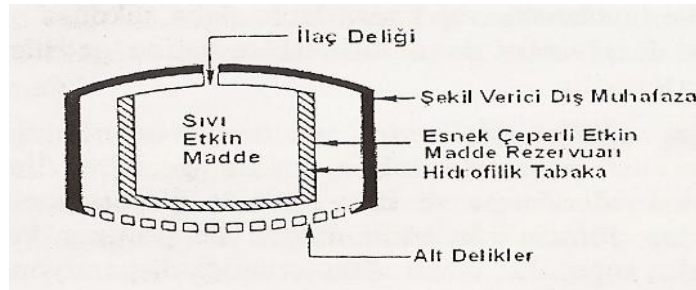
Hidrodinamik basınçta, ozmotik basınç gibi etkin maddelerin salımını aktive eden bir enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Sistemin en içinde sıvı haldeki etkin

madde geçirgen olmayan bir rezervuar içinde bulunur. Rezervuarla dıştaki koruyucu tabaka arasında suda şişebilen hidrofilik bir tabaka



Şekil 1.8 Acutrim tabletin dikey kesiti ve bu tablette salım hızı ile ozmotik basınç arasındaki ilişki.

mevcuttur. Gastrointestinal kanal içinde alttaki boşluklardan gastro-intestinal sıvıları geçerek hidrofilik tabaka tarafından absorplanır. Absorpsiyonla hidrofilik tabaka şişerek hidrodinamik basınç oluşturur. Oluşan hidrodinamik basınç etkin madde rezervuarı üzerinde basınç oluşturarak rezervuarın hacmini azaltır. Böylece etkin madde salımı gerçekleşir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9 Hidrodinamik basınçla aktive edilen ilaç taşıyıcı sistemin dikey kesiti

### *Hidrasyonla Aktive Edilen Sistemler*

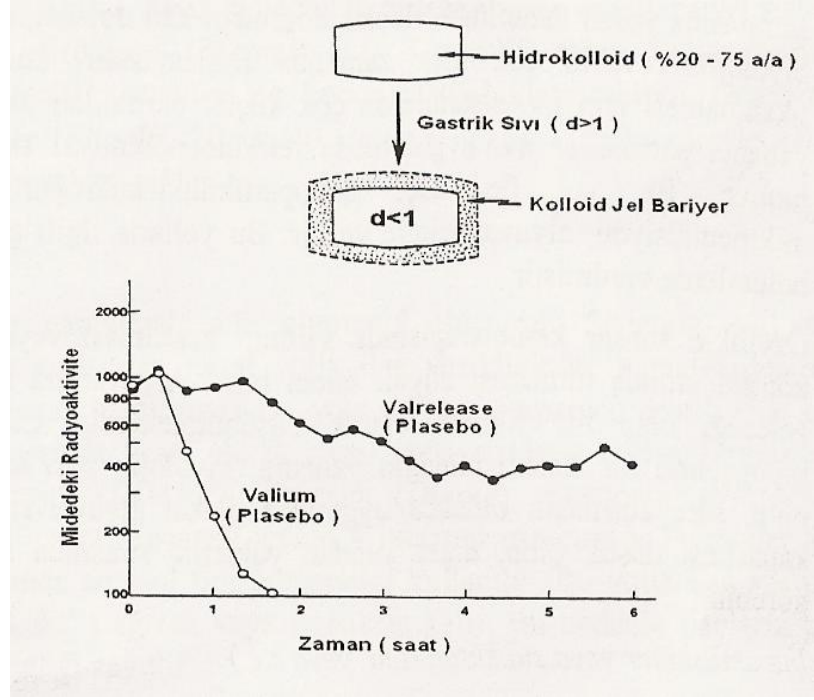
Bu sistemlerde ilaç taşıyıcı sistem hidrasyonla şişerek, etkin madde salimini aktive eder. Etkin madde şişebilen hidrofilik polimer matriks maddesi içinde homojen olarak dağıtılmıştır. Etkin madde salımı, polimer matriksin şişme hızıyla kontrol edilir. Bu tip preparatlara Valrelease tablet örnek olarak gösterilebilir (Şekil 1.10). Valium, tablet eksipiyenları ve hidrofilik polimerle granüle edilip tablet haline getirilmiştir. Oral yolla alındıktan sonra tablet içindeki hidrofilik matriks maddesi gastrik sıvıyı çekerek kenardan merkeze doğru bir jel tabakası oluşturur. Bu jel tabakası tarafından etkin madde salımı kontrol edilir. Tablet, midedeki dansitesi gastrik sıvı dansitesinden daha düşük olduğu için uzun süre yüzer durumda kalır.

### *In Vitro Salım Mekanizmasının Belirlenmesi*

Salım mekanizmasını belirlemek için etken madde salımının sıfır ve birinci derece, Higuchi ve Hixon Crowell eşitliklerine uyumluluk analizi yapılmıştır. Bu yöntem ilk olarak tarafından bu amaç için uygulanmıştır. Uygulanan eşitlikler tablo 1.2 de % çözünmeden kalan etkin madde cinsinden verilmiştir.

**Tablo 1.2** In vitro Salım Mekanizması Belirlemek için kullanılan eşitlikler (t: zaman, m: % çözünmeden kalan ilaç, K: küpkök salım hız sabiti (zaman<sup>-1</sup>), k: Higuchi salım hız sabiti (t<sup>1/2</sup>), b:birinci derece hız sabiti (zaman<sup>-1</sup>), k<sub>0</sub>: sıfırinci derece hız sabiti (zaman<sup>-1</sup>), a: sabit)

$3\sqrt{100} - 3\sqrt{m} = Kt$	Hixon-Crowell	17
$100 - m = k\sqrt{t}$	Higuchi	18
$\ln m = -bt + a$	Birinci derece	19
$m=100 - k_0t$	Sıfır derece	20



Şekil 1.10 Hidrasyonla aktive edilen valrelease tablet (üstte) ve valrelease ile valium tabletlerin midede kalış sürelerinin karşılaştırması.

Deney bulguları dört eşitliğe de uygulanarak, korelasyon katsayıları ve artık kareler toplamının serbestlik derecesine oranı hesaplanır. En az sapma gösteren, diğer bir deyişle (artık kareler toplamı / serbestlik derecesi) değeri en düşük bulunan eşitliğe uygun olarak etken madde salımı gerçekleştirilmektedir.

#### *Fick Yasasından Sapma Gösteren Sistemler*

Başlangıçta etkin madde camsı polimer içinde dağıtılmış ve çözünmüş olarak bulunmaktadır. İlaç polimer fazdan difüze olamaz. Ancak çözücü matrikse girince polimer şişer, camsı geçiş sıcaklığı deney sıcaklığının altına düşer ve şişen polimer ilacın difüzyonuna izin verir.

Camsı bir polimer tabakasından çözücü difüzyonuyla aynı anda fakat ters yönde oluşan ilaç salımı:  $Mt/M_{\infty} = kt^n$  şeklinde ifade edilir.

$Mt/M_{\infty}$ , t anında ilacın salım kesri; k, salım hız sabiti ve n, salım mekanizmasını belirleyen sabittir.

Bu eşitliğin türevi alındığında aşağıdaki şekilde salım hızı elde edilir.

$$\frac{dMt}{Sdt} = nC(0)kt^n$$

camısı polimerlerden Fick yasasına uymayan transport (Case II Transport) ve Fick yasalarına göre difüzyonla salım mekanizmalarının birleştirilmiş halidir.

İki eşitlikte de açıkça görüldüğü gibi,  $n=1$  ise ilacın salım hızı zamandan bağımsızdır. Bu durum sıfır derece kinetiğe uygundur. Tablo 5'de  $n$  sabitinin alabileceği değerler ve bunlarla ilişkili transport mekanizmaları görülmektedir.

$Mt/M_0 = kt^n$  eşitliği difüzyon katsayısının konsantrasyondan bağımsız olduğu sistemlerde kullanılabilir. Filmlerden salımda,  $n$  sabiti transport mekanizması hakkında bilgi verir. Aynı eşitlik küre ve silindirlere ilaç şağını incelemek için de kullanılabilir. Ancak bu şekillere sahip sistemlerde sadece sıfır derece olup olmadığına ( $n=1$ ) yada yaklaşım yaklaşmadığı belirlenebilir.

Tablo 1.3 te verilen "Case II Transportu", geometrik faktörler nedeniyle küre ve silindirlere görülmez. Bu nedenle küre ve silindirlere  $n = 1$  olması basit olarak Fick yasasına uymayan transportu ifade eder. (Çapan, Gürsoy'dan 2002)

**Tablo 1.3** İnce polimerik filmlerden difüzyonla olan salım mekanizmaları.

"n" Değeri	İlaç Transport Mekanizması	Zaman Fonksiyonu Olarak Hız ( $\frac{dMt}{dt}$ )
0.5	Fick Difüzyonu	$t^{-0,5}$
$0.5 < n < 1.0$	Non-Fickian Difüzyon	$t^{n-1}$
$n > 1.0$	Super Case II	$t^{n-1}$
1.0	Case II transport	Zamandan bağımsız (sıfırıncı derece)

### **1.3.2 Kontrollü Salım Sistemlerinin Veriliş Yolları**

İlacın veriliş yolu terapötik sonucu doğrudan etkiler. Kontrollü salım sistemleri için en fazla kullanılan ilaç veriliş yolları oral ve parenteral yollar olup, son zamanlarda transdermal yol da her geçen gün önem kazanmaktadır. Son zamanlarda biyoteknoloji ürünü pekçok terapötik peptit ve proteinin biyofiziksel ve biyokimyasal özellikleri, veriliş yolu ve ilaç tasarımında gözönünde tutulmalıdır.

#### **1.3.2.1 Parenteral**

Parenteral preparatlar intravenöz, subkütan, intramüsküler, intraperitoneal, intratekal ve intraventriküler yolla kullanılmaktadır. Parenteral yolla kullanılan kontrollü salım sistemlerinde, ilaçların salım mekanizmaları çözünmeyle kontrol edilen depo formülasyon, adsorpsiyon tipi depo formülasyon, mikrokapsüllenmiş depo preparat, veya esterleştirmeyle hazırlanan depo preparat şeklinde olabilir. Depo tip parenteral kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında değişik teknikler kullanılır. Bunlar arasında viskoz taşıyıcılar kullanılması, süspansiyon hazırlama, etkin maddelerin az çözünür türevlerinin hazırlanması, biyoparçalamı mikrokürelerin hazırlanması sayılabilir. Biyoparçalanı mikroküreler özellikle peptit, protein gibi kolay bozunur yapıdaki ilaçları da koruduğu için her geçen gün önem kazanmaktadır.

Parenteral veriliş yolları şunlardır:

Intravenöz (i.v.): İntravenöz yolun üstünlüğü, ilaçlar doğrudan kan dolaşımına verildiği için biyolojik cevabın çok kısa zamanda başlamasıdır. Fakat kapillerlerin tıkanmaması için i.v. sistemlerde çok küçük partiküller kullanılır. Ayrıca yabancı partiküller i.v. uygulamada retikuloendotelial sistem tarafından tutulur. Bu yol ile ilaç, nanopartikül, mikropartikül, lipozom, mikroemülsiyon, alyuvar içinde verilir. Bu yollarla ilgili geniş bilgi diğer bölümlerde verilmiştir.

Özellikle kanser kemoterapisinde salımın uzatılması veya salım yerinin kontrol altında tutulması büyük önem taşır. Alyuvarlara ilaç yüklenmesi geleceği olan bir yöntem olarak düşünülmektedir. Çünkü alyuvarlar biyogeçimli bir sistem olmanın yanısıra, biyolojik yarı ömrü de 30 gün olup, süre açısından oldukça uygundur. Fakat alyuvarlara ilaç yükleme kapasitesi düşük olup, diğer yandan yükleme sırasında alyuvarlar zarar görebilir.

İntramüsküler veya subkütan (i.m. veya s.c.): İntramüsküler veya subkütan yol, oral yoldan sonra en fazla kullanılan yoldur. Biyoparçalanabilir sistem veya implantları hazırlarken en önemli faktör, kullanılan polimerlerin biyogeçimli olmasıdır. Genelde intramüsküler veya subkütan yolla verilen ilaçlar aynı hızda absorbe olurlar ve biyoeşdeğerdirler. Son yıllarda sulu çözelti, yağlı çözelti ve sulu süspansiyonların i.m. ve s.c. absorpsiyonları incelenmiştir.

Aşağıda parenteral yolla kullanılan kontrollü salım sistemleri üzerinde kısaca durulacaktır. Uzun etkili penisilin preparatlarında, penisilin suda az çözünen tuzu kullanılmıştır. Penisilin G prokainin yağdaki çözeltisi intramüsküler uygulamada sürekli etki sağlamaktadır. Veya aynı tuzun sudaki süspansiyonu terapötik ilaç konsantrasyonunu 12-24 saat arasında sürdürebilmektedir. Daha sonra penisilin uzun etkili tiksotropik süspansiyonları hazırlanmıştır (Duracillin, Crysticillin). Subkütan yolla kullanılan protamin-Zn-insülin kompleksleri bir diğer örnektir. Protamin kompleks oluşturarak sudaki çözünürlüğü azaltmak, Zn ise stabiliteyi sağlamak için kullanılmaktadır. Diğer preparatlar arasında uzun etkili vitamin B12 preparatları, uzun etkili steroid preparatları (depo testosteron sipionat; estradiol benzoat-Progynon Benzoat), uzun etkili antipsikotik preparatlar (Proliksin enantat), uzun etkili kontraseptif preparatlar (Depo-Provera C-150, Deladroxate) sayılabilir.

### **1.3.2.2 Oküler**

Oküler yolla konvansiyonel göz damlaları kullanıldığında etki süresi çok kısa olup, oküler biyoyararlanımı da çok düşüktür. Konvansiyonel pilokarpin göz damlalarında, hasta uyuncunun düşük olması ve potansiyel sistemik yan etkilerin görülmesi sözkonusudur. Kontrollü salım sağlayan pilokarpin içeren Ocusert sistemleri ise, önemli üstünlüklere sahiptir. Ocusert P110-20 ve Ocusert P110-40; 20 ve 40 µg/saat dozda 1 hafta süreyle sabit hızda pilokarpin salımı sağlar.

### **1.3.2.3 Nazal**

Özellikle parenteral yola alternatif oluşturur. Sistemik etki sağlamak amacıyla kullanılan nazal yolla ilaç verildiğinde; karaciğerden ilk geçiş etkisi ortadan kaldırılarak i.v. yola yakın absorpsiyon profili elde edilebilir. Halen piyasada ticari olarak nazal yolla sistemik etki sağlamak amacıyla dezmopresin (DDAVP), lipresin (Diapid), oksitosin (Syntocinon) ve nafarelin asetat (Synarel) içeren 4 preparat mevcuttur. Pulmoner yolla ilaç verilmesinde aerosol tipi

preparatlar kullanılır. Bu yolla ilaç verilmesinde, dozun %90 ı ağızda veya farenkste kalır. Bu nedenle ilaçların pulmoner yolla etkinliği zayıftır.

#### **1.3.2.4 Oral**

En fazla kullanılan ilaç verilmiş yolu olmasına rağmen; ilaçların absorpsiyon mekanizmaları, gastro-intestinal transit ve gastrointestinal kanalın mikroçevresiyle ilgili bilgiler henüz tam değildir. Ayrıca oral ilaç kullanımında; midede ilaçların kimyasal parçalanması, gastrik boşalma, barsak motilitesi, spesifik absorpsiyon bölgeleri ve önce barsak mukozasından daha sonra karaciğerden geçişte ilaçların parçalanması oral ilaç kullanımını sınırlayan faktörlerdir. Bu sınırlayıcı faktörler ilaçların biyoyararlanımında birey içi (aynı kişide değişik zamanlarda) ve bireylerarası değişikliklere neden olur. Genelde bu faktörler kontrol edilemediği için oral ilaç kullanımını sınırlarlar. Oral yolla ilaç verildikten sonra ilacın etkisi; dozaj şekillerinin özelliklerine, ilacın absorpsiyon ve eliminasyon hızına, gastro-intestinal kanalda kalış süresine bağlıdır. Kontrollü salım sistemlerinin gastro-intestinal kanalda kalış süresi, gastrik boşalma ve intestinal motiliteyle belirlenir. Kontrollü salım sağlayan oral dozaj şekillerinin gastro-intestinal geçiş süresini kontrol etmek, etkin maddenin dozaj şeklinden hedef bölgede şahmını sağlamak yönündeki çalışmalar son zamanlarda yoğun olarak gerçekleştirilmektedir. Absorpsiyon bölgesinde ilaç konsantrasyonunu artırarak, etki yerindeki ilaç konsantrasyonunu artırmak şeklindeki varsayımdan hareketle kolona hedeflendirilmiş dozaj şekilleri geliştirilmiştir.

#### **1.3.2.5 Bukal ve Sublingual**

İlaçlar bukal (ağız içi) veya sublingual (dilaltı) yolla, oral mukozadan absorbe olabilir. Genel olarak bu yollarla hızlı bir absorpsiyon sağlanır. İleri derecede hidrofilik özellikteki maddeler ( $\log P < 2$ ), aynı zamanda önemli ilk geçiş etkisine uğrarlar. Bu özellikteki hidrofilik etkin maddeler için bukal veya sublingual yol önemli üstünlükler sağlar. Absorpsiyon sonrası ilaçlar sistemik dolaşıma geçer. Böylece bukal ve sublingual yolla ilaç uygulamada ilk geçiş etkisi ortadan kaldırılmış olur. İlaçlar lipoidal membran içine, oral mukozadan pasif difüzyonla absorbe olur. Tükürüğün pH'sı 6 olup, iyi bir absorpsiyon için asit yapıdaki ilaçlarda  $pK_a > 2$ , bazik ilaçlar için  $pK_a < 10$  olmalıdır. Sublingual kullanımda optimum yağ/su dağılıma katsayısı değeri 40-2000 arasındadır. Bukal veya sublingual yolla verilen ilaçlar arasında steroidler, barbitüratlar, papain, tripsin sayılabilir. Ticari olarak piyasada bulunan bukal ve sublingual preparatlar

daha ziyade, ilk geçiş etkisini ortadan kaldırmak, çabuk etki sağlamak içindir. Sublingual yolla kullanılan dozaj Şekilleri içinde nitrogliserin, izosorbid dinitrat, nifedipin, bubrenorfin, apomorfin bulunmaktadır. Bukal yolla kullanılanlar arasında prokloroperazin, floroglusinol, oksazepam, lorazepam, metiltestosteron, nikotin, bubrenorfin ve melatonin bulunmaktadır. Bu ilaçlar için ticari dozaj Şekilleri tablet, biyoadhesif tablet, çiğneme tableti, çözelti, sakız ve yama Őekillerindedir.

### **1.3.2.6 Rektal**

Rektal yol genelde, gastrointestinal yan etkiler nedeniyle oral yolun kullanılmadığı durumlarda alternatif bir yol olarak kullanılır. Rektal yolla ilaç verilmesinde karaciğerin ilk geçiş etkisi ortadan kaldırılır veya çok azaltılır. Örneğin lidokainin insanda oral biyoyararlanımı % 30 olup, rektal yolla lidokain verilmesiyle biyoyararlanım oranı % 65'e çıkmıŐtır. Kontrollü salım sistemleri için rektal yolun kullanımı sınırlıdır. Çünkü defekasyon nedeniyle ilacın absorpsiyonu kesintiye uğrar. Ayrıca dününün bazı yerlerinde rektal yolla ilaç kullanımı çok yaygın değildir.

### **1.3.2.7 Vajinal ve İntrauterin**

Vajina içinde kullanılan kontrollü salım sistemleri, steroidal yapıda spermisit maddeler içerir ve kontrasepsiyon amacıyla kullanılır. Pekçok steroidin intravajinal yolla absorpsiyonu oral yoldan daha yüksektir. Bu amaçla halka Şeklinde, kontrasepsiyon sağlamak amacıyla ve medroksiprogesteron asetat içeren bir halka kullanılır. Veteriner hekimlikte de; florogeston asetat ve progesteron içeren vajinal spiraller kullanılır. İlaç içermeyen uterus içi aygıtların (IUDs) etkinliği, aygıtın büyüklüğü, Şekli ve alanıyla, uterusun geometrik Şekli arasındaki iliŐkiye bağlıdır. İlaç içeren uterus içi aygıtlar da ise bu amaçla bakır, progesteron ve levonorgestrel kullanılır. Progeslasert isimli uterus içi yolla kullanılan aygıt, örnek olarak gösterilebilir.

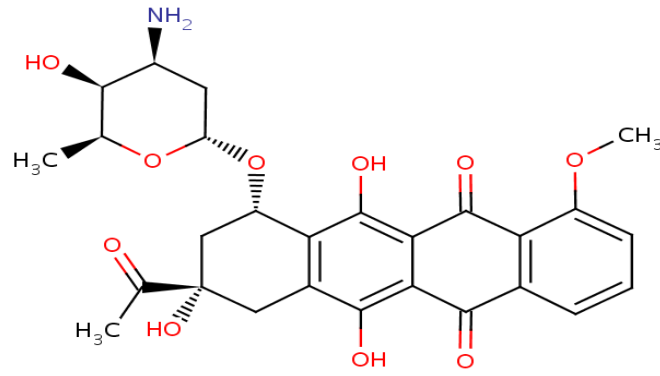
### **1.3.2.8 Transdermal Sistemler**

İntravenöz infüzyonla ilaç verildiğinde, karaciğerin ilk geçiş etkisi ortadan kaldırılır ve uzun süreli, sabit ilaç düzeyi sağlanır. Transdermal yol yukarıdaki özelliklere sahip olup, intravenöz infüzyona alternatif oluşturur. Transdermal yolla verilen ticari preparatlar arasında skopolamin içeren Transderm-Scop, 72

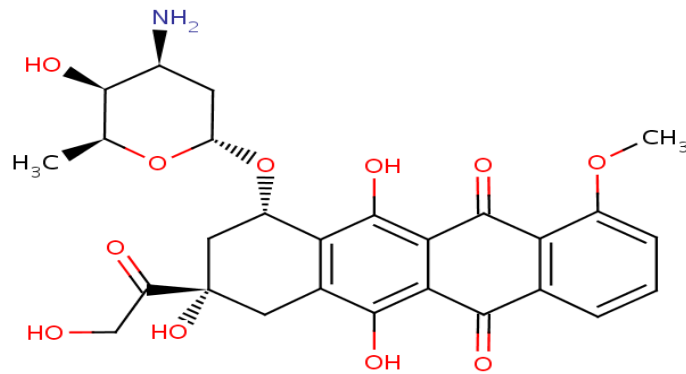
saat süreyle profilaksi veya hareket hastalığında sözkonusu olan bulantı ve kusmaya karşı kullanılır. (Çapan, Gürsoy'dan, 2002)

#### 1.4 Doxorubicin

Doxorubicin, *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen, danuorubicinin hidroksi türevi, antineoplastik ve hidrofilik bir antibiyotiktir. Şekil 1.11'de danuorubicin, Şekil 1.12'de doxorubicin yapısı gösterilmektedir.



Şekil 1.11 Daunorubicin kimyasal yapısı (DrugBank, 2010).



Şekil 1.12 Doxorubicin kimyasal yapısı (DrugBank, 2010).

Doxorubicin hücre döngüsüne özgü bir ilaçtır. Hücre döngüsünü S fazında durdurarak DNA sentezini engeller. Bunun yanısıra etki mekanizması tam olarak belirlenemese bile DNA zincirinin kırılmasına yol açtığı bilinmektedir. Doxorubicin, DNA çift zincirinin arasına girerek 5'-GC-3' veya 5'-CG-3' kompleksini oluşturup ve topoizomerez II aktivitesini inhibe ederek DNA zincir kırılmasına neden olmaktadır. Bu etkisinin yanısıra polimeraz aktivitesini inhibe ederek ve serbest radikal oluşumu ile hücrelere zarar vermektedir. Bu nedenlerden dolayı kanserli olmayan hücrelere de belirgin bir toksik etkisi vardır. (DrugBank, 2010; Dong et al., 2010; Zhang et al., 2007). Tedavi gören hastalarda bulantı, kusma, alopesi, stomatit, miyelosupresyona neden olmaktadır. Uzun süreli kullanımlarda miyosit hasarı, miyofibrillerin hasarına yol açmaktadır (Boccellino et al., 2010). Toksik etkilerinden dolayı hastalarda kullanım dozu 450 – 600 mg/m<sup>2</sup> arasındadır ve uzun süreli kullanım imkanı sınırlıdır (Dong et al., 2010; Boccellino et al., 2010). Ayrıca doxorubicinin elektrostatik etkileşimlerden dolayı hidrofobik yapıdaki hücre membranından içeri geçişinin zorlaştığı bilinmektedir (Dubernet; from Wise 2000).

Yapılan çalışmalarda diğer antrasiklinlere benzer olarak doxorubicinin ışığa karşı duyarlı olduğu belirlenmiştir. 10 µg/ml'lik sulu çözeltinin stabilitesini bir hafta koruduğu gözlenmişken, stabiliteye çözgen etkisi de incelenmiş ve etanol içerisindeki doxorubicin çözeltisinin su, tuzlu su ve Krebs bikarbonat ortamına göre daha stabil olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık stabilitesi incelendiğinde, mutlak stabilitesinin 4 °C'nin altında olduğu saptanmıştır. 37 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda belirgin bir yıkım söz konusudur. Tüm bu parametreler bir arada değerlendirildiğinde doxorubicin stabilitesi açısından susuz ortam, düşük sıcaklık, düşük pH, düşük iyonik şiddet ve karanlık saklama koşullarının en iyi olduğu belirlenmiştir (Gupta et al., 1988).

Doxorubicin ile yapılan kontrollü salım sistemi çalışmalarında amaçlar; ilacın toksisitesinin azaltılması ve in vivo dağılımını değiştirerek tümör bölgelerine hedeflendirilmesidir (Dong et al., 2010). Bu çalışmalarda oluşturulan doxorubicin parçacıklarında retiküloendotelial sistem tarafından tanınmasını önleyerek dolaşımdan uzaklaştırılmasını engellemek ve tümör bölgesinde ilaç birikimini sağlama amaçlı olarak "stealth" yöntemi uygulanmaktadır, bu yöntem ile nanoparçacık yüzeyi polietilenglikol (PEG) ile kaplanarak hidrofilik özellik kazandırılabilirdiği gibi dekstran, kitosan gibi polisakkaritler kullanılarak ilacın plazma proteinleri tarafından tutulması engellenebilmektedir (Qi et al., 2010).

Ticari olarak satılan lipozomal doxorubicin (Caelyx®, Myocet®) ve peglenmiş lipozomal doxorubicin (Doxil®) preparatları klinikte kullanılmaktadır. Peglenmiş lipozomal doxorubicin kullanımında oluşan dermatolojik toksik reaksiyonlar, nötropeni, lökopeni gibi yan etkiler nedeniyle farklı ilaç salım sistemleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir (Tan et al., 2010).

Bajpai ve Chouhan (2009) tarafından doxorubicinin süspanسیون polimerizasyonu tekniğiyle hazırlanmış poli-2-hidroksietilmetakrilat (PHEMA) nanopartiküllerden salımının in vitro koşullarda incelendiği çalışmada nanoküreler için optimum koşullar belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre fizyolojik ve alkali pH değerleri, düşük sıcaklık ve yüksek dış osmotik basıncın salım hızını yavaşlattığı saptanmıştır. Sonuç olarak, asidik pH değerine sahip tümörlü dokularda etkin salım gözleneceği düşünülmektedir.

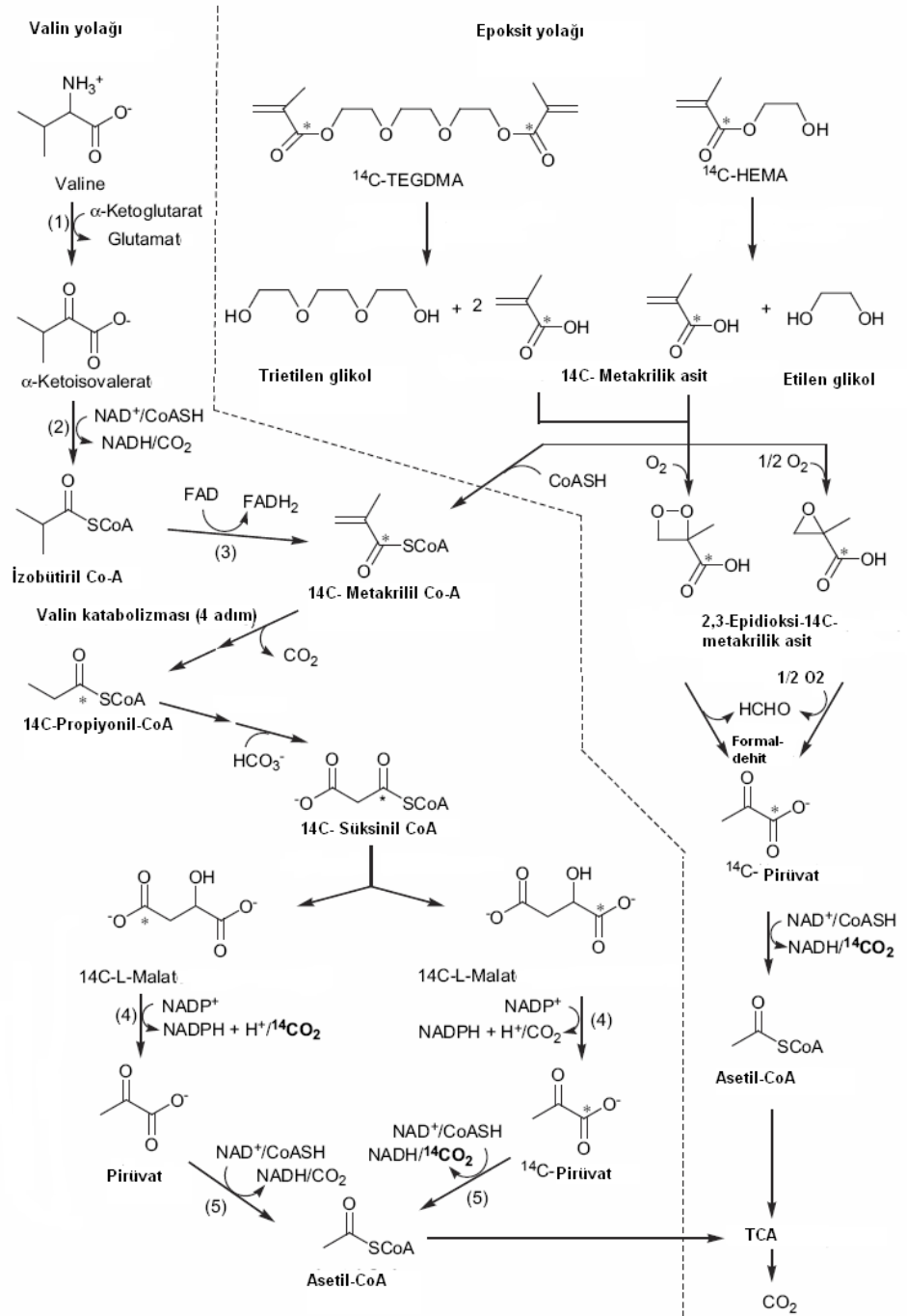
Zhang ve arkadaşları (2010) katyonik jelatin kullanarak DNAaz enzimine duyarlı taşıma sistemi geliştirmiş ve doxorubicini DNAaz'ın yıkım etkisinden korumuştur. Bu durumda karaciğerdeki yüksek jelatinaz ekspresyonu doxorubicinin karaciğerde yüksek miktarda birikmesine neden olmuştur. Bu sonucun önüne geçebilmek için sisteme peglenmiş pH duyarlı aljinat eklenmiştir. Oluşan bu kompleksin serbest doxorubicine göre tümör dokularında birikimi artmış, kalpteki birikiminin azalması sonucunda ise kardiyotoksitesinde azalma gözlenmiştir.

Doxorubicin ile yapılan sıcaklığa duyarlı hidrojel kullanılan çalışmada, fizyolojik sıcaklıkta biyoyıkıma uğrayıp toksik olmayan ürünlere dönüşebilen poli(organofosfazen) kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda %10 'luk p(organofosfazen), %0,6 doxorubicin içeren çözeltinin ilk gün içeriğinin %5 ini saldığı belirlenirken, sonraki 5 hafta içerisinde toplan ilaç içeriğinin in vitro koşullarda %40 ını, in vivo koşullarda %90 ını saldığı belirlenmiştir. In vivo, in vitro salım hızı farkının nedeni olarak poli(organofosfazen)in in vivo koşullarda enzimatik yıkıma uğraması olduğu belirtilmiştir. (Al-Abd et.al., 2010)

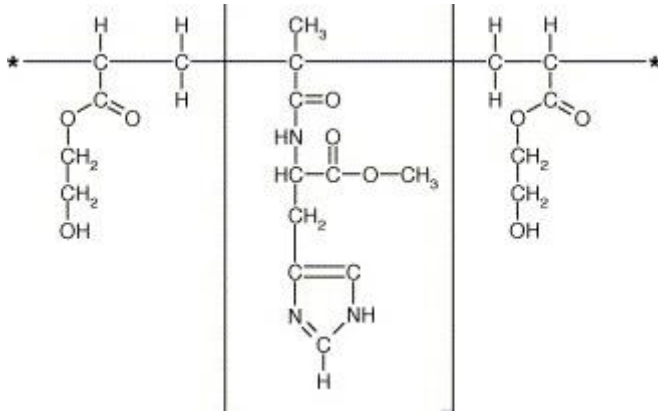
### **1.5 Poli(Hidroksietilmetakrilat) ve Poli(Hidroksietilmetakrilat-Metakriloilamido histidin) polimerleri ve uygulama alanları**

Biyoyumlu ve biyoparçalanmayan polimerlerden olan HEMA bu alanda ilk biyomedikal uygulaması yapılan polimerdir. 1950 yılında poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA)'ın kontakt lens olarak kullanılmaya başlamıştır. PHEMA jellerinin denge durumunda tuttukları su miktarı fazladır ve kağıuçuşumsu yapıda biyolojik uyumu iyi hidrojellerdir. (Peppas and Peppas; Gürsoy'dan 2002) HEMA'nın metabolize olmasında ilk basamak metakrilik asit ve etilen glikol oluşumdur. Metakrilik asit valin yolağıyla L-malata dönüşür ve ileriki adımlarda CO<sub>2</sub>'e kadar yıkılır. Bir diğer yolak ise epoksit yoludur, bu yolakta pirüvata ve ileriki adımlarda CO<sub>2</sub> ye dönüşüm görülür (Şekil 1.13) . Epoksi yolunda oluşan ara ürünler mutajeniktir. (Durner et al., 2010)

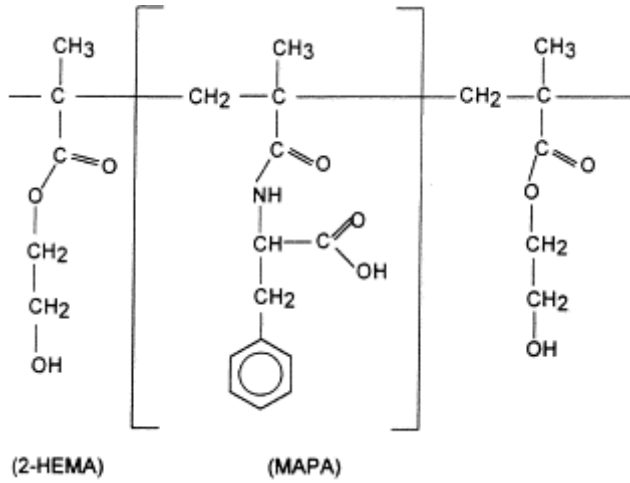
Biyoyumluluğı onaylanmış HEMA monomeri ile birlikte, vücutta bulunan bir amino asit olan, L-Histidin türevi metakriloilamida histidin (MAH) monomerinin polimerizasyon ortamına eklenmesiyle polimere bağlanmak istenilen maddelerin seçimliliğı sağlanmıştır. p(HEMA-MAH) (Şekil 1.14) ve p(HEMA-MAPA) (Şekil 1.15) polimeri ilk kez bu çalışmada ilaç salım sistemi amaçlı kullanılacaktır.



**Şekil 1.13** HEMA ve TEGDMA metabolizması. (1) Aminotransferaz (EC 2.6.1.42); (2)  $\alpha$ -Ketoizovalerat dehidrogenaz (EC 1.2.4.4); (3) Açıl CoA dehidrogenaz (EC 1.3.99.3); (4) Malik enzim (EC 1.1.1.40); (5) Pirüvat dehidrogenaz (EC 1.2.4.1) (Durner et al., 2010)



Şekil 1.14 p(HEMA-MAH) polimerinin yapısı



Şekil 1.15 p(HEMA-MAPA) polimerinin yapısı

### 1.5.1 p(HEMA-MAH) uygulama alanları

Uzun ve ark. (2005) insan plazmasından IgG saflaştırmak için p(HEMA-MAH) monoliti yığın polimerizasyon yöntemi ile hazırlamışlardır. Monomer olarak HEMA ve MAH (N-metakroil-(L)-histidin metilester), çapraz bağlayıcı olarak EGDMA kullanılan bu çalışmada başlatıcı olarak benzoil peroksit ve gözenekli yapıyı sağlamak için ise toluen kullanılmıştır. Polimerizasyonda ilk 4 saat 55 °C sıcaklık uygulanmış ve son 2 saatte sıcaklık 75 °C ye çıkarılarak polimerizasyon tamamlanmıştır. Monoilte sulu çözeltiden IgG adsorbsiyon miktarı pH 7,4 te 9,8 mg/g olarak belirlenmiştir.

Bereli ve ark. (2006) benzer bir çalışma ile IgG saflaştırmak için P(HEMA-MAH) monolitik kolon geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada p(HEMA-MAH) ve p(HEMA-MAH) Cu<sup>2+</sup> şelatlanmış kolonlar kullanılmıştır. Bu kolonlardan Cu<sup>2+</sup> şelatlanmış monolite adsorbsiyon 10,8 mg/g iken p(HEMA-MAH) monolite adsorblanan miktar 4,2 mg/g olarak bulunmuştur.

Akgöl ve Denizli (2004) süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiş manyetik özellikteki p(EGDMA-MAH) mikroküreleri üzerine (p(EGDMA-MAH)-Fe<sup>3+</sup>) üzerine katalaz immobilizasyonu gerçekleştirmiştir. Mikrokürelerin hazırlanmasında PVA stabilizör olarak, dispersiyon fazında EGDMA, MAH ve toluen kullanılmıştır. Reaksiyonun başlaması için benzoil peroksit (BPO) kullanılmıştır. Su banyosunda 600 rpm karıştırmada, 65°C de 4 saat, 90°C de 2saat bekletilerek sentez tamamlanmış, yıkama sonrasında partiküller etanol içerisinde süspansiyon edilmiş sonrasında filtrasyon ile ayrılmıştır. Etanol ve su ile yapılan yıkamalardan sonra sodyum azid içerisinde saklanmıştır. Katalaz adsorbsiyon çalışmaları pH 6-8 arasında 2 saat 25°C de karıştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda maksimum adsorbsiyon kapasitesi 83,2 mg/g olarak belirlenirken enzimin Km değerinde (20,5 mM) serbest enzime göre (16,5 mM) artış gözlenirken enzimin polimer üzerine aktivite kaybı olmaksızın adsorbsiyonu ve desorbsiyonu gözlenmiştir.

p(HEMA-MAH) yapısına benzer ancak hidrofobik etkileşimlere yatkın olan Metakrililamidofenilalanin (MAPA) ile yapılan çalışmada ise moleküler baskılanmış polimerler sentezlenerek insan plazmasından kolesterol giderimi çalışmaları yapılmıştır. Kan uyumluluğu belirlenmesinde pıhtılaşma zamanının kontrol grubuna göre önemsiz düzeyde arttığı belirlenmiştir. Ayrıca platelet miktarında %2,4, lökosit miktarında da %1,9 luk azalma gözlenmiştir. Ayrıca yapısına MAPA eklenmiş polimerler, pHEMA ile karşılaştırıldığında hücre adhezyonu azalmış olup bu durum da kan uyumluluğu için avantajlı bir yapı sağlamıştır. (Denizli, 2002)

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

Potasyum persülfat, polivinil alkol (PVA), etilenglikol dimetil akrilol (EGDMA), hidroksietil metakrilat (HEMA) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi ve doksorubisin-HCl (Doxo-teva, Adriblastina) ticari olarak sağlandı. Metakrilolamidohistidin monomeri (MAH) Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünde sentezlendi.

### 2.2 Cihaz ve Sistemler

Çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları aşağıda verilmiştir: Hassas terazi (Denver Instrument, SI-234A), Manyetik karıştırıcı (IKA, RCT basic), Açılı karıştırıcı (Stuart Rotator SB3), Su banyosu (Memmert), Santrifüj (Beckman Microfuge E), Spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 35), Liyofilizatör (EDWARDS Modulyo, E. Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer 100 FTIR, E. Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü), Zeta boyut ölçüm cihazı (Malvern Instruments Nanoseries Zeta Sizer, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Philips XL-30S FEG, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi), Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Digital Instruments MMSPM Nanoscope IV, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi).

### 2.3 Hidroksietilmetakrilat içeren polimerlerin sentezlenmesi

Nanokürelerin sentezinde sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır. Emülsiyon polimerizasyonu yönteminde emülsifiyan maddelerin oluşturduğu miseller içinde yürür. Dağıtma ortamındaki monomer damlacıklarından miseller içine difüze olan monomerler dağıtma ortamında çözülür ve sıcaklığın artmasıyla aktif duruma geçen ve misel içine göç ederek başlatıcı maddenin etkisi ile polimerleşirler. (Pişkin, Gürsoy'dan 1989). Sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yönteminde suda az çözünen monomer ve suda çözünebilir bir başlatıcı suda çözülür. Polimerizasyon suda az miktarda çözülmüş olarak bulunan monomere sülfat radikalinin saldırması ile başlar. Sonuç olarak, bir sülfat grubu içeren ve yüklü hale gelen oligomerler suya karışmayan hale gelir ve zincir uzar. Bu durumda oligomerler sürfaktant görevi

görür ve miseller halinde agregatlaşırlar. Bu aşamadan sonra klasik emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentez devam eder. (Egen and Zentel, 2004) Her bir polimerden yıkama aşamasından sonra 1 ml örnek alınarak santrifüjlendi çökelek 75°C de 24 saat kurutuldu ve 1 ml süspansiyondaki polimer miktarı mg olarak belirlendi.

### **2.3.1 Hidroksietil metakrilat-metakriloil amidofenilalanin p(HEMA-MAPA) nanokürelerin sentezi**

p(HEMA-MAPA) sentezi Öztürk ve ark. (2007) tarafından uygulanan sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi. Küre şeklinin oluşması için stabilizör olarak kullanılan yüksek molekül kütleli (Mw: 80000-100000) polivinil alkol (PVA), 50 ml distile su içerisinde ısıtılarak çözüldü. PVA çözülmesi ile sürekli faz oluşumu sağlandı. Monomerler olan HEMA ve MAPA karışımı reaktördeki sürekli faza eklendi ve çapraz bağlayıcı olan (EGDMA) oluşan karışıma eklendi. Polimerleşmeyi başlatmak için ortama potasyum per sülfat (KPS) eklenerek karıştırmalı su banyosunda 70 °C de 5 saat inkübe edildi. Elde edilen polimer 10000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi, ardından sırasıyla d-su ve etanol ile yıkandı. p(HEMA) nanoküreleri de aynı yöntem ile MAPA içermeksizin sentezlendi.

### **2.3.2 Hidroksietil metakrilat-metakriloil amidohistidin p(HEMA-MAH) nanokürelerin sentezi**

p(HEMA-MAH) sentezi Çorman ve ark. (2009) tarafından uygulanan sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi. Küre şeklinin oluşması için stabilizör olarak kullanılan yüksek molekül kütleli (Mw: 80000-100000) polivinil alkol (PVA), 50 ml distile su içerisinde ısıtılarak çözüldü. PVA çözülmesi ile sürekli faz oluşumu sağlandı. HEMA ve MAH monomer karışımı reaktördeki sürekli faza eklendi ve çapraz bağlayıcı olarak (EGDMA) oluşan karışıma eklendi. Polimerleşmeyi başlatmak için ortama potasyum per sülfat (KPS) eklenerek karıştırmalı su banyosunda 70 °C de 5 saat inkübe edildi. Elde edilen polimer 10000 rpm'de 45 dakika santrifüjlendi, ardından sırasıyla d-su ve etanol ile yıkandı. Şekil 2.1'de oluşan p(HEMA-MAH) polimerinin yapısı görülmektedir. Her yıkama sonrası aynı santrifüj işlemi tekrarlandı. p(HEMA-MAH) polimeri +4 °C'de depolandı ve denemelerden önce ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildi.

## **2.4 HEMA-MAH Polimerinin Karakterizasyonu**

p(HEMA-MAH) polimerinin bağ yapıları ve boyut analizi gerçekleştirildi ayrıca polimerin yapısı görüntülendi.

### **2.4.1 HEMA-MAH polimerinin fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi (FTIR) ile yapı analizi**

Nanopartiküller KBr ile karıştırılıp kuru yüzeye basılarak FTIR cihazında analizlendi ve bağ yapıları belirlendi. Karşılaştırma amacıyla p(HEMA) ve p(HEMA-MAH) polimerlerine ait FTIR analizi yapıldı. Analizler Perkin Elmer 100 FTIR cihazında gerçekleştirildi.

### **2.4.2 HEMA-MAH polimerinin partikül boyutunun belirlenmesi**

Sentezlenen HEMA-MAH polimerinin ortalama partikül boyutu ve boyut dağılımı Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünde Malvern Instruments Zeta Sizer ile yapıldı. Sonuçlar in vivo kullanılabilirlik açısından değerlendirildi.

### **2.4.3 HEMA-MAH polimerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi**

Liyofilize HEMA-MAH polimeri, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezine ait Philips XL-30S FEG cihazında, iletkenliği arttırmak amacıyla yüzeye altın kaplama yapılarak görüntülendi. Morfolojik özellikleri ve partikül boyutu belirlenerek in vivo kullanılabilirlik açısından değerlendirildi.

### **2.4.4 HEMA-MAH polimerinin atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile yüzey karakterizasyonu**

HEMA-MAH polimerinin contact mode AFM analizi yapılarak yüzeyi karakterize edildi. AFM görüntüsü, Digital Instruments MMSPM Nanoscope IV ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi Laboratuvarlarında alınmıştır.

## 2.5 HEMA İçeren Polimerlere Doxorubicin Adsorbsiyonu

Doxorubicin adsorbsiyonuna uygun polimerin belirlenmesi için spesifik olmayan etkileşimlere uygun hidroksietilmetakrilat (HEMA), hidrofobik etkileşimlere uygun hidroksietilmetakrilat-metakriloilamidofenilalanin (HEMA-MAPA) ve hidrofilik etkileşimler ile adsorbsiyona uygun (HEMA-MAH) nanoküreleri ile pH 4-7 aralığında optimizasyon denemeleri yapıldı. Yapılan denemelerden elde edilen verilere göre doxorubicin adsorbsiyonunda kullanılacak polimer belirlendi.

## 2.6 Doxorubicin Adsorbsiyonu İçin Koşulların Optimizasyonu

Doxorubicin adsorbsiyonu için HEMA-MAH polimerinin uygun olduğu belirlendikten sonra adsorbsiyon için uygun pH ve konsantrasyonlar belirlendi.

### 2.6.1 pH Değişiminin Doxorubicin Adsorbsiyonuna Etkisi

1 ml HEMA-MAH polimeri ve doxorubicin pH 4-8 arasında HCl ve NaOH kullanılarak ayarlanmış çözeltiler ile oda sıcaklığında açılı karıştırıcıda 40 rpm hızda 2 saat karıştırılarak adsorbsiyon sağlandı. Karıştırıcıdan alınan polimer-doxorubicin karışımı 15 dakika 13000 rpm'de santrifüjlemenin ardından süpernatantta 480 nm'de absorbans değeri ölçülerek bağlanmadan kalan doxorubicin miktarı belirlendi. Başlangıç madde miktarından yola çıkılarak adsorbe ilaç konsantrasyonu saptandı. Q değeri, gram polimer başına adsorblanan doxorubicin miktarı olarak aşağıda belirtilen formül yardımıyla hesaplandı.

$$Q = \frac{(C_{ilk} - C_{son}) \times V_{toplam} \text{ (ml)}}{\text{Polimer kütlesi (g)}}$$

$C_{ilk}$ : Başlangıç ilaç konsantrasyonu (mg/ml)

$C_{son}$ : Süre sonundaki ilaç konsantrasyonu (mg/ml)

$V_{toplam}$ : Reaksiyon ortamı hacmi (ml)

### 2.6.2 Doxorubicin Konsantrasyonunun Adsorbsiyon Üzerine Etkisi

Optimum doxorubicin konsantrasyonu belirlenmesi amacıyla 0,01- 2,5 arasında değişen doxorubicin miktarlarında Bölüm 2.5 te belirtilen yöntem kullanılarak adsorbsiyon gerçekleştirildi. Karıştırıcıdan alınan polimer-

doxorubicin karışımı 15 dakika 13000 rpm de santrifüjlendikten sonra süpernatantta kalan doxorubicin miktarı belirlenerek adsorblanan ilaç miktarı ve Q değeri her bir örnek için hesaplandı.

## **2.7 Doxorubicin Adsorbe Edilen HEMA-MAH Polimerinin FTIR Yapı Analizi**

Optimum koşullar kullanılarak hazırlanan doxorubicin içeren HEMA-MAH polimerinin FTIR ile bağ yapıları incelenerek doxorubicin içermeyen polimerin FTIR sonuçları karşılaştırıldı. FTIR analizi Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünde Perkin-Elmer 100 FTIR cihazı ile yapıldı.

## **2.8 İn Vitro Koşullarda Doxorubicin İçeren HEMA-MAH Polimerinden İlaç Salımı**

Doxorubicin adsorbe edilen HEMA-MAH polimerinden doxorubicin için in vitro salım izlendi. Bu amaçla doxorubicin içeren 0,84 mg polimer karışımı değişen pH'larda 2 ml tampon çözelti eklenerek 37°C 160 rpm de inkübe edildi. pH 1,2 ve 2 için HCl ile ayarlanmış çözeltiler, pH 3 Glisin/HCl, pH 4 ve pH 5 asetat, pH 6 sitrat tamponları (120 mM) kullanıldı. Fizyolojik pH 7,4 için PBS (1,2 mM  $KH_2PO_4$ , 1,15 mM  $Na_2HPO_4$ , 2,7 mM KCl, 1,38 mM NaCl) kullanılarak ortam pH'ına göre salım incelendi.

## **3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA**

### **3.1 Hidroksietil metakrilat İçeren Polimerlerin Sentezi**

Nanoküre oluşumunda stabilizör olarak PVA kullanılmıştır, p(HEMA) ve p(HEMA-MAPA) için literatür (Öztürk ve ark., 2007) ile uyumlu küre şekli gözlemlenirken diğer polimer olan p(HEMA-MAH) kullanıldığında düzgün küre şekli gözlenmemiştir. Bu veri literatür bilgileriyle de uyum göstermektedir (Çorman ve ark., 2010). Bunun nedeni olarak p(HEMA-MAH) sentezinde kullanılan PVA miktarının veya molekül kütesinin stabilizasyonu sağlamak için yetersiz geldiği düşünülmektedir. Kurutma sonrasında p(HEMA), p(HEMA-MAH), p(HEMA-MAPA) için 1 ml süspansiyonda sırasıyla 0,8 ; 0,84 ve 1,06 mg polimer olduğu belirlenmiştir.

### 3.2 Doxorubicin Adsorbsiyonu İçin Uygun Polimerin Belirlenmesi

Spesifik olmayan bağlanmalar için p(HEMA), hidrofobik etkileşimler ile bağlanma için p(HEMA-MAPA) ve hidrofilik etkileşimlerle bağlanma için p(HEMA-MAH) polimerleri kullanılmıştır. Denemeler sonucunda, Tablo 3.1’de görüldüğü gibi, içerdiği imidazol grubundan dolayı hidrofilik yapıda olan, p(HEMA-MAH) polimerinde bağlanma belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda spesifik olmayan adsorbsiyon için p(HEMA) yapısındaki hidroksil gruplarının kendi aralarında hidrojen bağı yaptığı düşünülmekte iken hidrofobik etkileşimlere dayalı adsorbsiyonun ise sterik engellerden dolayı gerçekleşmediği düşünülmektedir. p(HEMA-MAH) polimerinde, MAH’ın polimer içindeki çift bağ oluşumunu engellediği veya sterik engellemeleri kaldırmasıyla birlikte imidazol grubu aracılığıyla hidrojen bağı oluşturacak yapı sağlaması HEMA-MAH polimerinde doxorubicin tutulmasını sağladığı düşünülmektedir. Adsorbsiyon veriminin artırılması amacı ile bağlanma koşullarının optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır.

**Tablo 3.1** Farklı polimerler kullanılarak 2 saatlik karıştırma ile elde edilen adsorbsiyon verileri

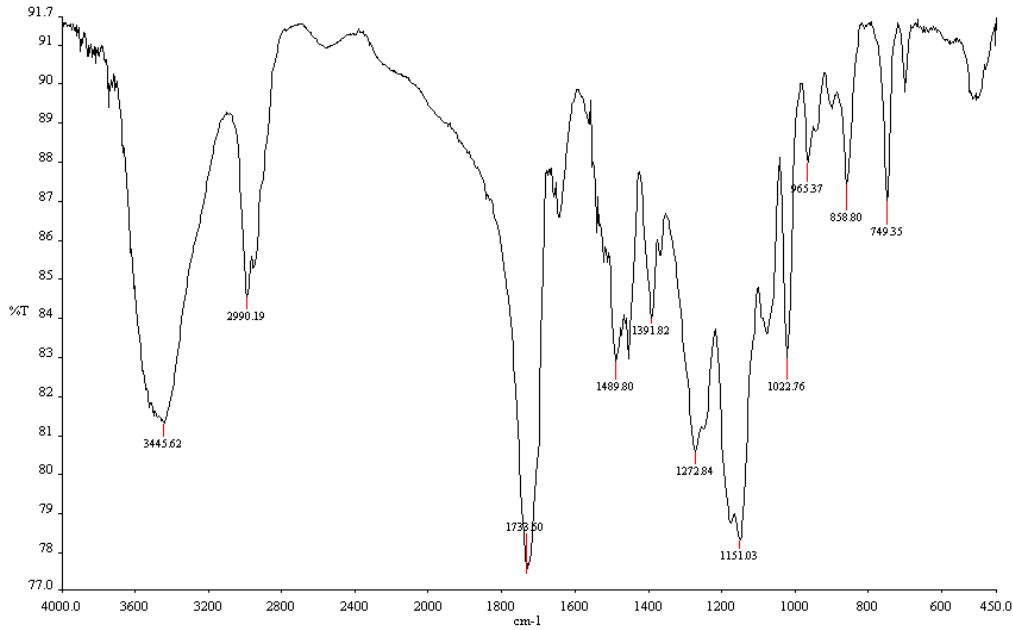
Polimer	pH	C (mg/ml)	Q (mg/g)
HEMA	5	0,09	0
HEMA	6	0,09	0
HEMA	7	0,09	0
HEMA	8	0,09	0
HEMA-MAPA	5	0,09	0
HEMA-MAPA	6	0,09	0
HEMA-MAPA	7	0,09	0
HEMA-MAPA	8	0,09	0
HEMA-MAH	5	0,09	58,78
HEMA-MAH	6	0,09	95,98
HEMA-MAH	7	0,09	22,31
HEMA-MAH	8	0,09	0

### 3.3 HEMA-MAH Polimerinin Karakterizasyonu

Bölüm 3.2 deki sonuçlara dayanarak doxorubicin adsorbsiyonu için en uygun polimerin HEMA-MAH olduğu belirlenmiştir. Polimerin karakterizasyonu için FTIR, SEM görüntüleme, AFM görüntüleme ve  $\zeta$ - boyut analizi yapılmıştır.

#### 3.3.1 HEMA-MAH polimerinin FTIR ile yapı analizi

p(HEMA-MAH) için yapılan FTIR analizi sonucunda O-H bağındaki gerilmeye bağlı olarak  $3440\text{ cm}^{-1}$  de titreşim bandı gözlenmiştir. Ayrıca p(HEMA) polimerinden farklı olarak yapıdaki amit I ve amit II bağlarından kaynaklı olarak  $1650$  ve  $1489\text{ cm}^{-1}$  de soğurma bantları gözlenmiştir. Bu bulgu literatür verileriyle (Çorman ve ark. 2010) ile uyumludur. (Şekil 3.1)

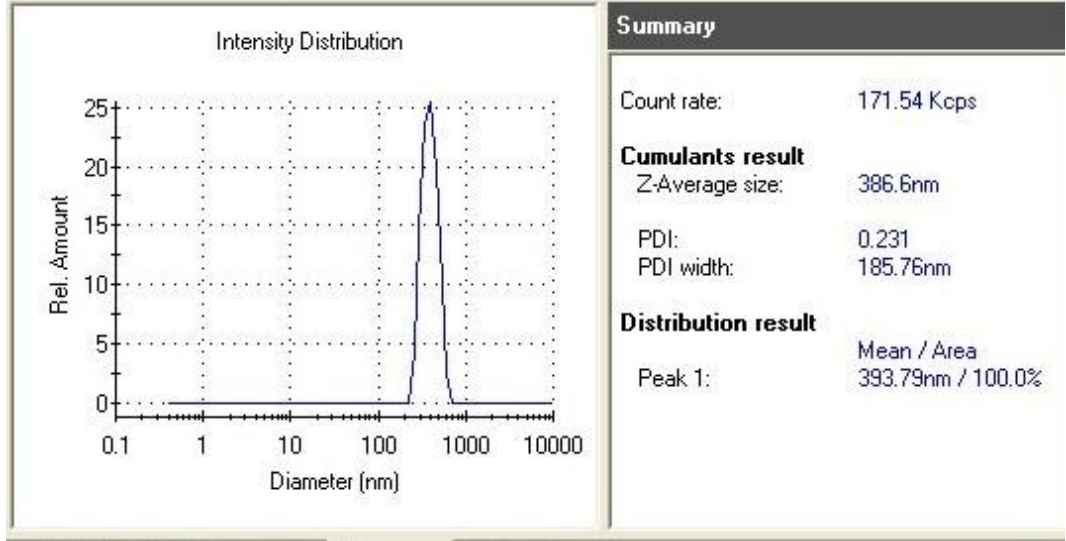


Şekil 3.1. HEMA-MAH polimeri FTIR analizi sonucu

#### 3.3.2 HEMA-MAH polimerinin partikül boyutunun belirlenmesi

Sentezlenen HEMA-MAH polimerinin  $\zeta$ -boyut analizi sonucu Şekil 3.2 de görülmektedir. Vücut içerisinde en dar kapilerin çapı  $5\text{-}6\ \mu\text{m}$  olduğu düşünüldüğünde, ortalama  $185\text{ nm}$  çapa sahip bu partiküllerin boyutlarının damarlarda agregatlaşma veya emboliye yol açmayacağı, dolayısıyla in vivo

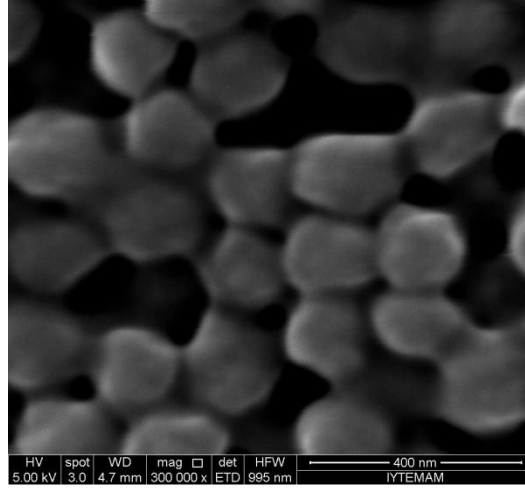
kullanıma uygun olduğu düşünöldü. Sentezlenen partiköllerin polidispersitesi 1,231 olarak belirlendi. Bu sonuca göre sentezlenen partiköllerin birbirlerine yakın boyutlarda olduğu sonucuna varıldı.



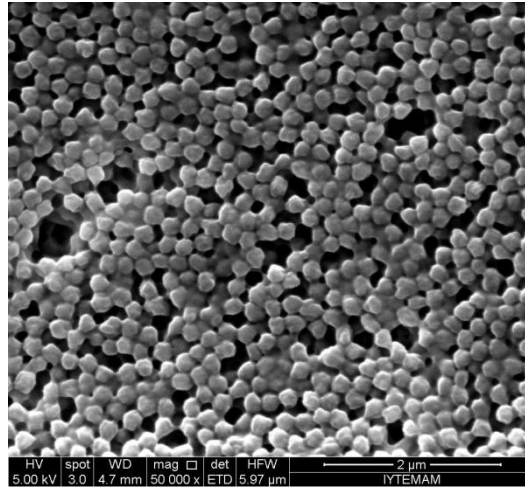
Şekil 3.2 HEMA-MAH polimeri zeta boyut sonuçları

### 3.3.3 HEMA-MAH polimerinin SEM ile görüntülenmesi

HEMA-MAH polimerinin SEM görüntüleri şekil 3.3'te verilmiştir. Görüntüleme sonucunda, düzgün küreler oluşmadığı görölmüş ancak ζ-boyut sonucuna uygun olarak 150-190 nm boyutlara sahip, homojen partiköller belirlenmiştir.



(a)

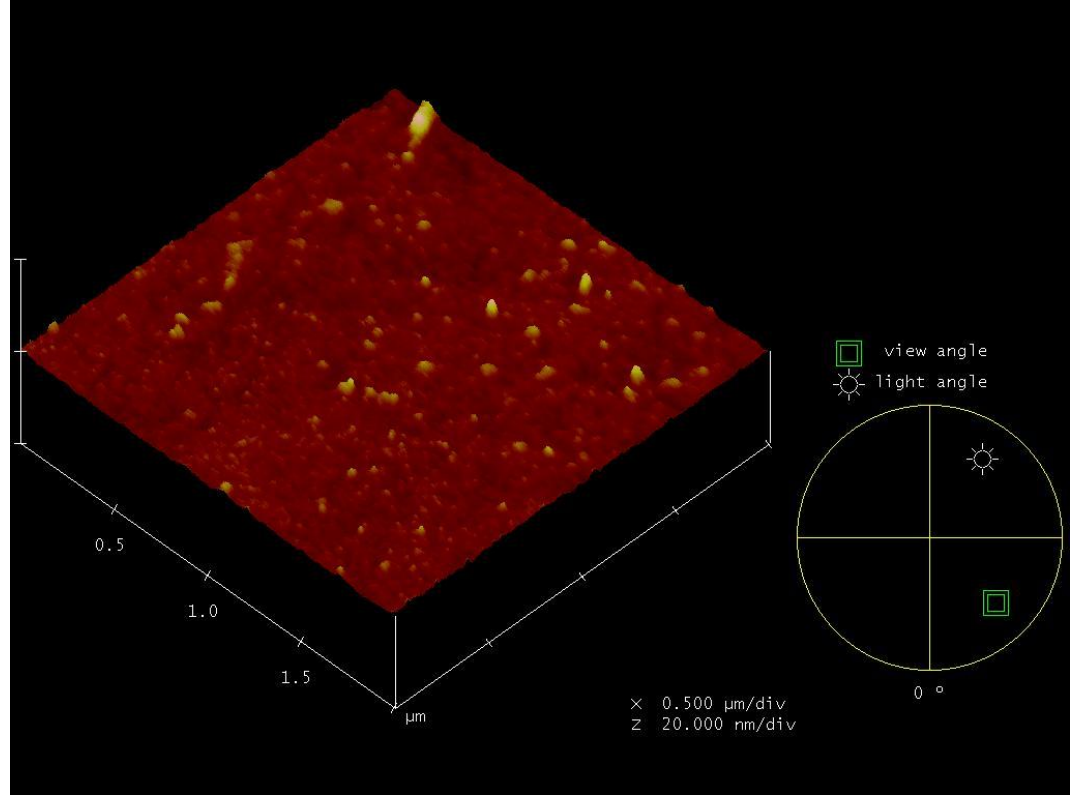


(b)

Şekil 3.3. HEMA-MAH'a ait SEM görüntüleri (a) 300000x büyütme (b) 50000x büyütme

### 3.3.4 HEMA-MAH polimerinin AFM ile görüntülenmesi

HEMA-MAH polimerine ait AFM görüntüsü Şekil 3.4 te verilmiştir. Contact mode ile alınan AFM görüntülerinde 200 nm yüksekliğinde küreler belirlenmiştir. **Yorum bumu? Ne anlam içeriyor bu**



Şekil 3.4 HEMA-MAH polimeri AFM görüntüsü.

### 3.4 HEMA-MAH Polimeri Yüzeyine Doxorubicin Adsorbsiyonu

Sentezlenen HEMA-MAH polimerine doxorubicin bağlanma koşullarının optimizasyonu amacıyla değişen pH ve doxorubicin konsantrasyonlarında adsorbsiyon gerçekleştirilmiş ve gram polimer başına ilaç bağlanma kapasitesini belirleyen Q değeri saptanmıştır.

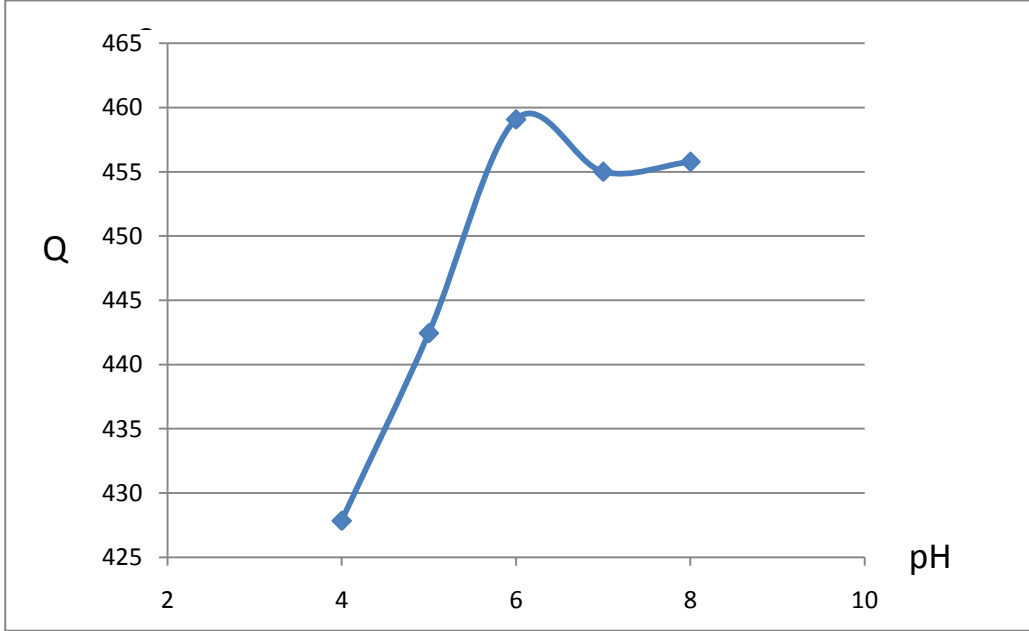
#### 3.4.1 Doxorubicin adsorbsiyonu için uygun pH belirlenmesi

4-8 aralığında değişen pH değerlerinde hazırlanan örnekler için hesaplanan Q değerleri Tablo 3.2 de verilmiştir. Tablo 3.2 deki veriler incelendiğinde maksimum doxorubicin adsorbsiyonunun pH 6 da gerçekleştiği gözlenmiştir. pH 4 için saptanan Q değeri 427, 85 mg/g iken pH 6 da 459,08 mg/g taşıyıcıdır. pH 6 nın üzerine çıktığında bağlanma veriminde artış gözlenmemektedir. Doxorubicin, protonlanabilen amino grupları ile deprotonlanabilen fenolik gruplara sahip amfoterik bir ilaçtır. pH 6 için doxorubicinin amino grubu protonlanmış olarak  $\text{NH}_3^+$  formundadır, ilaç asidik pH değerleri için pozitif

yüklüdür. (Manocha and Margaritis, 2010) Bu nedenle HEMA-MAH yapısında bulunan negatif yüklü gruplar ile etkileşimde olduğu düşünülmektedir. FTIR analizi sonuçları ile karşılaştırıldığında ise kovalent bağlanma görülmemektedir.

**Tablo 3.2** Optimum pH denemesi sonuçları

pH	C(mg/ml)	Q (mg/g)
4	0,2	427,85
5	0,2	442,45
6	0,2	459,08
7	0,2	455,00
8	0,2	455,78



**Şekil 3.5** Optimum pH grafiği (C= 0,02 mg/ml, T=25°C, Q (mg/g))

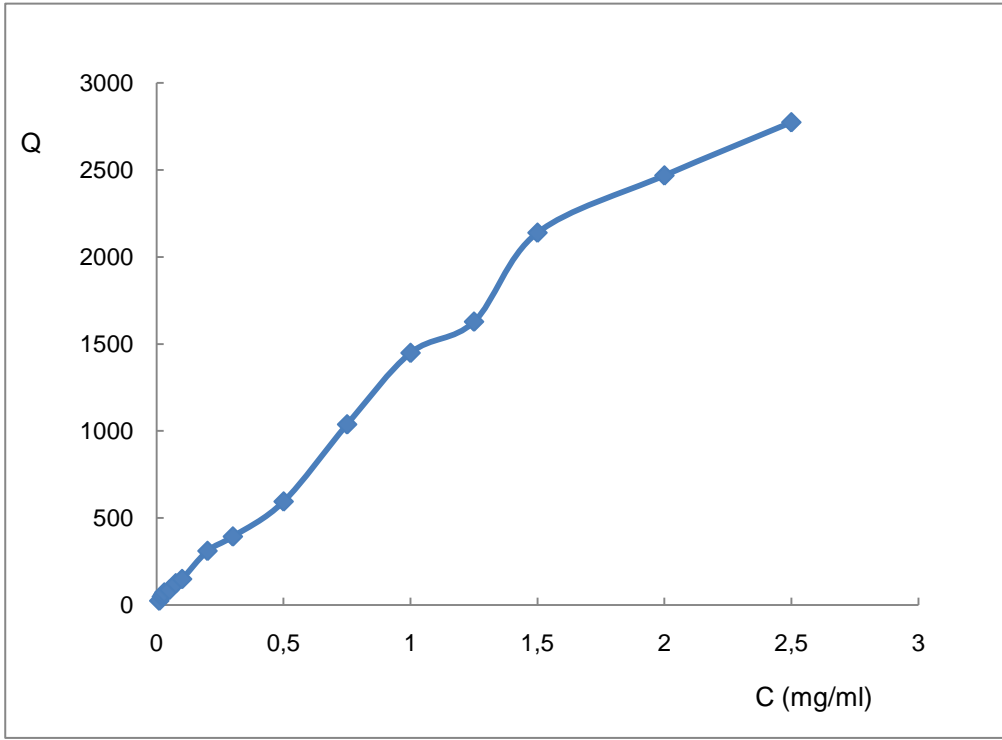
### 3.4.2 Doxorubicin adsorbsiyonu için uygun etken madde konsantrasyonu belirlenmesi

Sentezlenen HEMA-MAH polimeri üzerine doxorubicin bağlanma koşullarının optimizasyonu amacıyla 0,01- 2,5 mg/ml aralığında değişen doxorubicin kullanılarak hazırlanan preparatların bağlanma kapasitelerini gösteren Q değerleri Tablo 3.3 te verilmiştir. Belirlenen veriler kullanılarak grafik çizildiğinde (Şekil 3.5) 1,5 mg/ml konsantrasyonun üzerine çıktığında

bağlanma veriminin sabitlendiği görülmektedir. Bu nedenle salım denemelerinde kullanılmak üzere doxorubicin konsantrasyonu 1,5 mg/ml olarak seçilmiştir.

**Tablo 3.3** Optimum konsantrasyon verileri

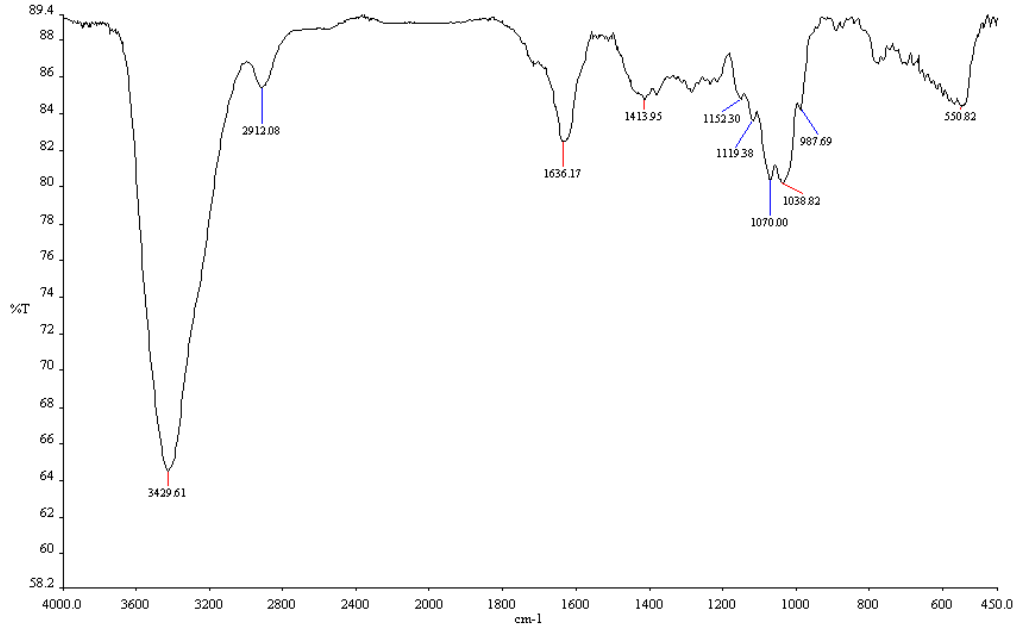
C (mg/ml)	Q (mg/g)
0,01	23,81
0,02	47,62
0,025	59,52
0,03	71,43
0,05	86,78
0,075	124,30
0,1	148,76
0,2	310,32
0,3	393,13
0,5	594,27
0,75	1037,47
1	1448,45
1,25	1627,79
1,5	2139,10
2	2467,94
2,5	2773,65



Şekil 3.6 Optimum konsantrasyon grafiği (pH= 6; T= 25 °C)

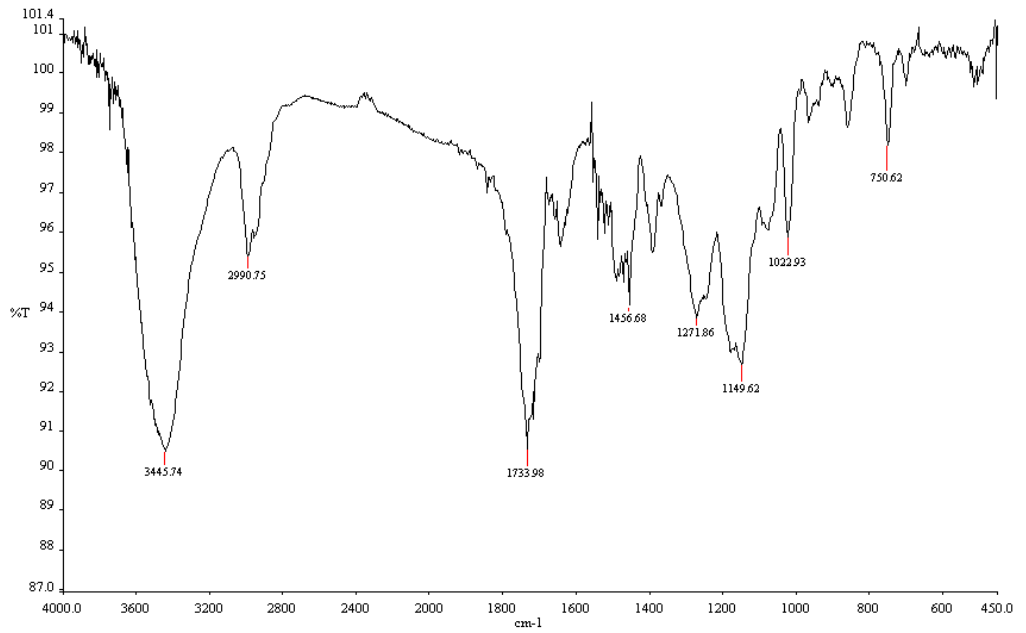
### 3.4.3 Doxorubicin adsorbe edilen HEMA-MAH polimerinin FTIR ile yapı analizi

Doxorubicin için FTIR analizi sonucu (Şekil 3.7)  $1000-1260\text{ cm}^{-1}$  de görülen alkolün C-O gerilmesi ve  $675-900\text{ cm}^{-1}$  de görülen düzlem dışındaki O-H bükülmesine bağlı pik gözlenmelidir. (Chouhan and Bajpai; 2009)



Şekil 3.7 Doxorubicin FTIR analizi sonucu

Şekil 3.8’de p(HEMA-MAH) polimerine adsorbe olmuş doxorubicin FTIR sonucu gösterilmektedir. Şekil 3.1 deki HEMA-MAH polimerinin FTIR yapısı ile karşılaştırıldığı zaman herhangi bir kovalent bağlanma gözlenmemektedir. Bu durumda doxorubicin yapısındaki hidroksil grupları ile polimer üzerindeki hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları ile bağlanmanın gerçekleştiği düşünülmektedir.



Şekil 3.8 HEMA-MAH polimerinde adsorbe edilen doxorubicinin FTIR analizi sonucu

### 3.5 Doxorubicin-HEMA-MAH Polimeri Kullanılarak İlaç Salımı

Kanser tedavisi amacıyla kullanılan kemoterapik ilaçların, hedeflenen tümör dokusuna ulaşabilmesi için elimine olmadan dolaşımında uzun süre kalmaları gerekmektedir. Fizyolojik pH'ta doxorubicin salımı gerçekleşmeden kanserli dokuya ilaç içeren polimerin ulaşarak pH değişimi ile birlikte ilaç salımını gerçekleştirmesi amaçlanmaktadır. Kanserli dokuda mikroçevrenin asidik pH değerinde olduğu literatür verilerinde bilinmektedir. (Dong et. al, 2010) Asidik pH değerlerinde doxorubicinin salınması, fizyolojik pH değeri olan 7,4 te ilacın salınmaması, ilacın hedef bölgeye ulaştığında salımını sağlayacaktır. Bu amaçla asidik pH değerleri için salım denemeleri yapılmıştır. pH 1,2- 7,4 aralığında hazırlanan çözeltiler ve tampon çözeltiler ( pH 1,2 ; 2 ayarlı HCl çözeltisi, pH 3 120 mM Glisin/HCl, pH 4 ve pH 5 120 mM asetat, pH 6 120 mM sitrat, pH 7,4 PBS) kullanılarak belirli zamanlarda örnek alınarak doxorubicin miktarları saptanmıştır. Değişen pH ortamlarında in vitro salım sonuçları Tablo 3.4 te özetlenmiştir. 4 saat sonunda pH 1,2 için % 3,96 ilaç salımı gözlenirken pH 2 için bu değer % 3,05 olarak belirlendi. 6 saat sonunda pH 1,2 için % 6,89 salım gözlenirken pH 2 için % 5,45 salım gözlenmiştir. pH 3 ve üzerindeki değerlerde salım gözlemlenmemiştir. Hidrojen bağları ile olan etkileşimlerde asidik ve bazik pH değerlerinde hidrojen bağlarının kısmi dissosiyasyonu nedeniyle salım gözlemlendiği düşünülmektedir. Doxorubicinin hidrojen bağları ile konjuge edildiği çalışmalarda pH 2 ve pH 10 için 30 saat sonunda sırasıyla %71 ve % 25 lik salım gözlemlendiği literatür bilgilerinde yer almaktadır (Yang et. al., 2008).

**Tablo 3.4** Doxorubicin-pH-salım tablosu ( Csalım: Salınan ilaç miktarı (mg/ml), Salım %: Salınan ilaç/ Adsorbe ilaç x 100)

pH	Süre (saat)	C salım (mg/ml)	Salım %
5	2	0	0
6	2	0	0
7	2	0	0
1,2	4	0,02	3,96
2	4	0,02	3,05
3	4	0	0
4	4	0	0
5	4	0	0
6	4	0	0
1,2	6	0,04	6,89
2	6	0,03	5,45
3	6	0	0
4	6	0	0
5	6	0	0
6	6	0	0
5	6	0	0
7	6	0	0
5	24	0	0
6	24	0	0
7	24	0	0
6	30	0	0
7	30	0	0

#### 4. GENEL DEĞERLENDİRME

Doxorubicin ile yapılan kontrollü salım sistemi çalışmalarında son yıllarda artış gözlenmektedir. Son bir yılda yayınlanan çalışmalara bakıldığında uzun zamandır çalışılan Poli(laktik asit) gibi salım materyallerinin modifiye edilerek hedefli gönderim sistemleri tasarlandığı (Eisenbrey et. Al, 2010); etilen oksit, metakrilik asit, hidroksibütirat gibi monomerlerden kopolimerler sentezlenerek enkapsülasyon temelli salım sistemleri geliştirildiği (Kim et. Al. 2009, Kim et. Al. 2010), aktivasyona dayalı salım sistemleri yapıldığı (Dong et. Al, 2010) bilinmektedir.

Denemelere, spesifik olmayan etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve hidrofilik etkileşimler için üç farklı polimer denenerek başlanmıştır. Spesifik olmayan etkileşimler için kullanılan p(HEMA) ve hidrofobik etkileşimlere uygun

p(HEMA-MAPA) nanopartiküllerinde adsorbsiyon gözlenmemiştir. Bu durum HEMA içeren nanopartiküllerin –OH gruplarının kendi aralarında hidrojen bağları oluşturması bu nedenle doxorubicin bağlanmasına olanak kalmaması olarak yorumlanmıştır. HEMA-MAH polimerinde ise MAH monomerinin polimer içindeki hidrojen bağları için sterik engel oluşturarak doxorubicin adsorbsiyonunu sağladığı düşünülmüştür. Polimer boyutunun 185-200 nm civarında olması nedeniyle in vivo kullanım için uygun olduğu belirlenmiştir.

Adsorbsiyon denemelerinde, doxorubicin ile polimer arasına zayıf asidik ortamda, doxorubicin ve polimerde bulunan –OH grupları ve doxorubicin yapısında bulunan keton grupları ile polimerdeki –OH grupları arasında hidrojen bağları oluşması mümkündür. Optimum doxorubicin konsantrasyon denemelerinde 1,5 mg/ml doxorubicin konsantrasyonu için 2140 mg/g adsorbsiyon kapasitesi belirlendi. Literatür verilerine bakıldığında grafen oksit için bu değer 0,47 mg/ml doxorubicin konsantrasyonu için 2350 mg/g iken polimer veziküllerde doyumluk kapasitesi 1000 mg/g ın altındadır (Yang et. al., 2008).

Kontrollü salım, pH 1,2 - 7,4 arasındaki değerlerde, 37°C sıcaklık ve 160 rpm hızda çalkalama ile fizyolojik koşullara benzer ortamda incelendi (Chouhan and Bajpai, 2009). Denemeler sonucunda pH 1,2 ve 2 değerleri için 4. saatten başlayarak salım gözlendi. Literatürde hidrojen bağları ile olan etkileşimlerde, hidrojen bağlarının kısmi disosiyasyonuna bağlı olarak, asidik ve bazik ortamlarda daha etkin salım olduğu belirlenmiştir (Yang et. al., 2008). Yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında aynı sürede pH 7,4 için salım yapan sistemler olduğu görülmektedir (Kim et al., 2009; Al-Abd et.al., 2010). Çalışmanın devamında tümör mikroçevresine uygun ortamda in vitro ilaç salımının uzun süreli incelenmesi, hücre kültürü denemeleri ve in vivo denemelerin gerçekleştirilmesi düşünülmektedir. İn vivo denemelerde polimerin enzimatik yıkımına bağlı olarak salım parametrelerinde farklılıklar beklenmektedir.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Boccellino, M., Pedata, P., Castiglia, L., Porta, R.L., Pieri, M., Quagliuolo, L., Acampora, A., Sannolo, N. and Miraglia, N.,** 2010, Doxorubicin can penetrate nitrile gloves and induces apoptosis in keratinocytes cell lines, *Toxicology Letters*, doi:10.1016/j.toxlet.2010.04.026 (yayınlanmadı)
- Chouhan, R. and Bajpai, A.,** 2009, Real time in vitro studies of doxorubicin release from PHEMA nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology*, 7:5 1-12 pp.
- Çapan, Y.,** 2002, Kontrollü Salım Sistemlerinin Salım Mekanizmaları ve kullanılış yolları, 41-56, *Kontrollü Salım Sistemleri*, Gürsoy, A.Z. (Der.), *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, 1, İstanbul, 406s.
- Dong, L., Xia S., Wu K., Huang Z., Chen H., Chen J. and Zhang J.,** 2010, A pH/Enzyme-responsive tumor-specific delivery system for doxorubicin, *Biomaterials*, 1-8 pp.
- Dubernet, C., Fattal, E., Covreur, P.,** 2000, *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Wise, D.L (Edt.)
- Durner, J., Walther, U.I., Zaspel, J., Hickel, R., Reichl, F.X,** 2010, Metabolism of TEGDMA and HEMA in human cells, *Biomaterials*, 31: 818-823 pp.
- Denizli, A.,** 2002 Preparation of immuno-affinity membranes for cholesterol removal from human plasma, *Journal of Chromatography B*, 772: 357–367pp.
- Egen, M. and Zentel, R.,** 2004, Surfactant-Free Emulsion Polymerization of Various Methacrylates: Towards Monodisperse Colloids for Polymer Opals, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 205, 1479–1488 pp.
- Eisenbrey, J.R, Burstein, O.M, Kambhampati, R., Forsberg, F., Liu, J-B. and Wheatley, M.A.,** 2010, Development and optimization of a doxorubicin loaded poly(lactic acid) contrast agent for ultrasound directed drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 143: 38-44 pp.
- Guptal, P.K., Lam F.C. and Hung C.T.,** 1988, Investigation of the stability of doxorubicin hydrochloride using factorial design, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14(12): 1657-1671 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güler, E.M.**, 2010, Kontrollü Salım Sistemleri Diploma Tezi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü
- Kim, O.J., Kabanov, A. and Bronich, T.K.**, 2009, Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, 138: 197-204 pp.
- Kim T-H., Mount, C.W, Gombotz W.R. and Pun, S.H.**, 2010, The delivery of doxorubicin to 3-D multicellular spheroids and tumors in a murine xenograft model using tumor penetrating triblock copolymer micelles, *Biomaterials*, 31: 7386-7397pp.
- Kumari, A., Yadav, S.K. and Yadav, S.C.**, 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75: 1-18 pp.
- Manocha, B., and Margaritis, A.**, 2010, Controlled Release of Doxorubicin from Doxorubicin/ $\gamma$ -Polyglutamic Acid Ionic Complex, *Journal of Nanomaterials*, Article ID 780171, 9 pages, 2010. doi:10.1155/2010/780171 (yayınlanmadı)
- Öztürk, N., Akgöl, S., Arısoy, M. and Denizli, A.**, 2007, Reversible adsorption of lipase on novel hydrophobic nanospheres, *Separation and Purification Technology*, 58: 83–90pp.
- Pişkin, E.**, 1989, Polimer biliminin temelleri, 7-28 s., Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler, Gürsoy, A. (Der.) Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları
- Qi, J., Yao, P., He, F., Yu, C. and Huang, C.**, 2010, Nanoparticles with dextran/chitosan shell and BSA/chitosan core—Doxorubicin loading and delivery, *Pharmaceutical Nanotechnology*, doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.063 (yayınlanmadı)
- Singh, R. and Jr, J.W.L.**, 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86: 215–223 pp.
- Tan, M.L., Friedhuber, A.M., Dunstan, D.E., Choong, P.F.M. and Dass, C.R.**, 2010, The performance of doxorubicin encapsulated in chitosan–dextran sulphate microparticles in an osteosarcoma model, *Biomaterials*, 31: 541–551 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Yang, X., Zhang, X., Liu, Z., Ma, Y., Huang, Y. and Chen, Y.,** 2008, High efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide, *J. Phys. Chem C*, 112, 17554-17558 pp.

**Zhang, L., Radovic-Moreno, A.F., Alexis, F., Gu, F.X., Basto, P.A., Bagalkot, V., Jon, S., Langer, R.S. and Farokhzad, O.C.,** 2007, Co-delivery of hydrophobic and hydrophilic drugs from nanoparticle–aptamer bioconjugates, *ChemMedChem*, 2: 1268 – 1271 pp.

**ÖZGEÇMİŞ**

Ad :Emir  
Soyad : ÖZÇALIŞKAN  
Doğum Yeri : Bornova  
Doğum Tarihi : 18.06.1985  
Adres : 1681 Sok. No:29/2 Karşıyaka-İZMİR  
e-posta adresi : eozcaliskan@gmail.com  
Cep Telefonu : 0505 452 54 53

**EĞİTİM BİLGİLERİ**

Özel Ege Lisesi (1996-1997)  
TED Özel Aliğa Lisesi (1997-2000)  
Atakent Anadolu Lisesi (2000-2003)  
Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2003-2008)  
Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya  
Anabilim Dalı (2008- )