

**İTERPOLİMERİK KOMPLEKSLERDEN KONTROLLÜ
İLAC SALIMI**

**CONTROLLED DRUG RELEASE FROM
INTERPOLYMERIC COMPLEXES**

EMRECAN YILDIZ

PROF. DR. LOKMAN UZUN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZET

İTERPOLİMERİK KOMPLEKSLERDEN KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI

EMRECAN YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Lokman UZUN

Mayıs 2021, 102 sayfa

Kontrollü ilaç salımı terapötik etkiyi istenilen sürede sağlamak ve ilacı hedef bölgeye iletmek için kullanılan bir tekniktir. Kontrollü ilaç salım sistemleri geleneksel salım sistemleri ile karşılaştırıldığında olası yan etkileri azaltması, ilaç alımındaki zaman aralıklarını uzatarak hasta konforunu arttırması gibi birçok avantaja sahiptir. İlaç salım sistemlerinde kullanılan malzemelerin yüksek ilaç taşıma kapasitesine sahip olması ve çapraz bağlayıcı gibi biyolojik sistemlere zarar veren kimyasallar içermemesi bu teknikte temel gerekliliktir. Tez çalışmasında yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip genişletilmiş perlit partikülleri ilaç taşıyıcı malzeme olarak kullanılmıştır. Çalışma için model ilaç olarak kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan ve basit tekniklerle (UV-görünür spektroskopisi) miktar analizi yapılan bir anti-kanser ilacı olan doksorubisin tercih edilmiştir. İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerden ilaç salım profillerin ayarlanması amacıyla, interpolimerik komplekslerin kullanılmıştır. Bu kapsamda; farklı yüklere sahip amino asit temelli iki polimer (poli-L-histidin ve poli-L-lizin) kullanılarak genişletilmiş perlit etrafında interpolimerik kompleksler oluşturulmuştur. Hem ilaç yüklü hem de interpolimerik kompleks oluşturulmuş genişletilmiş perlit örneklerin ilaç salım çalışmaları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler, Raman spektroskopisi, zeta-yük analizleri, termal gravimetrik analiz ve taramalı elektron

mikroskopisi ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon işlemi sonucunda, ilaç salım profillerine pH, zaman, sıcaklık ve derişim gibi parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Optimum salım koşullarının pH için 5,5, zaman 21 güne kadar ve sıcaklık 37°C olarak belirlenmiştir. Partikül derişiminin artmasıyla birlikte beklendiği üzere salım yapılan ilacın miktarı da artmıştır. Salım profillerin matematiksel analizleri için Korsmeyer-Peppas, sıfırncı ve birinci derece modelleri verilere uygulanmıştır. Her iki sistem için de Korsmeyer-Peppas modelinin daha uygun olduğu, ancak sıfırncı derece salım profiline yakın bir profile de sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; interpolimerik kompleksin varlığı ilaç salım profilini olumlu yönde etkilediği ve daha kontrollü, pH duyarlı ve uzun süreli salım için uygun olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İnterpolimerik kompleksler, genişletilmiş perlit, doksorubisin, polielektrolit yapılar, kontrollü ilaç salımı

ABSTRACT

CONTROLLED DRUG RELEASE FROM INTERPOLYMERIC COMPLEXES

Emrecaan YILDIZ

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Lokman UZUN

May 2021, 102 pages

Controlled drug release is a technique used to provide the therapeutic effect in the desired time and drug deliver to the targeted area. Controlled drug release systems have many advantages, such as reducing possible side effects compared to traditional release systems, increasing patient comfort by extending the time intervals in drug intake. The basic requirement in this technique is that the materials used in drug delivery systems must have high drug carrying capacity and do not contain harmful chemicals for biological systems. In the thesis study, expanded perlite particles due to their high adsorption capacities were utilized as drug carrier material. Doxorubicin, an anti-cancer drug that is frequently used in cancer treatment and is easily quantified with simple techniques (UV-visible spectroscopy), was chosen as a model drug for the study. Interpolymeric complexes were used to adjust drug release profiles from drug loaded expanded perlite particles. In this context, interpolymeric complexes by using two amino acid based polymers (poly-L-histidine and poly-L-lysine) with different charges were coated the expanded perlite. Drug release studies of both drug loaded and interpolymeric

complex formed expanded perlite samples were analyzed comparatively. The drug delivery systems prepared were characterized by Raman spectroscopy, zeta-potential analysis, thermal gravimetric analysis and scanning electron microscopy. As a result of the characterization process, the effects of parameters such as pH, time, temperature and concentration on drug release profiles were investigated. Optimum release conditions were determined as 5.5, up to 21 days, and 37°C for pH, time, and temperature, respectively. As expected, the amount of drug released increased by the increase in the particle concentration. For the mathematical analyses of release profiles, Korsmeyer-Peppas, zeroth and first order models were applied to the data. It has been determined that the Korsmeyer-Peppas model is more suitable for both systems, however the system has a profile close to the zeroth order releasing profile. The presence of the interpolymeric complex has been determined to positively affect the drug release profile and resulted in more controlled, pH sensitive and suitable for prolonged sustained release.

Keywords: Interpolymeric complexes, expanded perlite, doxorubicin, polyelectrolyte structures, controlled drug release.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimleriyle bana her daim destek veren hem akademik hem de hayat tecrübelerini aktararak zorlukların üstesinden gelmeme yardımcı olan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Lokman UZUN'a,

Akademiye karşı bakışımın şekillenmesinde büyük emeği olan, her konuşmasında ufukumun genişlemesini sağlayan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gökhan DEMİREL'e,

Deneysel çalışmalarım süresince karşıma çıkan sıkıntılara çözüm sağlayan ve güler yüzünü eksik etmeyen sayın hocam Arş. Gör. Eda ÇİNAR AVAR'a ve değerli arkadaşım Görkem LİMAN'a,

Tez çalışmalarım için bana destek veren sayın hocam Dr. Canan ARMUTCU ÇORMAN'a ve başta Tunca KARASU, Miraç TÜYSÜZ olmak üzere emeği geçen tüm BİOSMART Araştırma Grubu üyesi arkadaşlarıma,

Bilgi ve tecrübelerini bana aktaran sayın hocalarım Serdar GÖVDELİ, İdris KARABULUT, Erdoğan AKGÜL ve Ahmet GÖKÇEN'e,

Yaşamım boyunca desteklerini esirgemeyen, varlığı her zaman yanımda hissettiğim aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Emreca YILDIZ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İlaç Salımı.....	3
2.2. İlaç Salım Kinetiği.....	4
2.2.1. Sıfır Derece Modeli.....	4
2.2.2. Birinci Derece Modeli.....	5
2.2.3. Higuchi Modeli.....	5
2.2.4. Hixson-Crowell Modeli.....	6
2.2.5. Korsmeyer-Peppas Modeli.....	6
2.2.6. Baker-Lonsdale Modeli.....	7
2.3. İnterpolimerik Yapılar.....	7
2.3.1. Polielektrolitler.....	8
2.3.2. Polielektrolitlerin Sınıflandırılması.....	9
2.3.3. Polielektrolitler Komplekslerin Teorik Yönleri.....	11
2.3.4. Polielektrolit Komplekslerin Oluşumu.....	11
2.3.5. Polielektrolit Komplekslerin Kullanıldığı Uygulamalar.....	12
2.4. Perlit.....	15
2.4.1. Perlitin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri.....	16
2.4.2. Perlit Rezervleri.....	17

2.4.3. Perlitin Uygulama Alanları	18
2.5. Doksorubisin	19
2.5.1 Doksorubisin Metabolizması	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
3.1. Kimyasal Malzemeler	22
3.3. Deneysel Yöntemler	24
3.3.1 Genişletilmiş Perlitlerin Yıkanması	24
3.3.2. Doksorubisin Çözeltilsinin Hazırlanması	24
3.3.3. Doksorubisin Yüklü Perlit Partiküllerinin Hazırlanması	25
3.3.4. İnterpolimerik Yapıların Sentezi	25
3.3.5. İlaç Salım Çalışmaları	27
3.3.5.1. İlaç Salımında Zaman Taraması	28
3.3.5.2. pH'nın İlaç Salım Hızı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	28
3.3.5.3. Derişimin İlaç Salım Hızı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	29
3.3.5.4. Sıcaklığın İlaç Salım Hızı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	29
3.4. İlaç Yüklü Yapıların Karakterizasyonu	29
3.4.1. İlaç Yükleme Veriminin Hesaplanması	29
3.4.2. Yüzey Güçlendirilmiş Raman Spektroskopi (SERS) Analizleri	30
3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri	31
3.4.4. Termogravimetrik Analiz (TGA)	31
3.4.5. Zeta Potansiyel Analizleri	31
3.5. Sitotoksisite Çalışmaları	31
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Karakterizasyon Çalışmaları	33
4.1.1. Yüzey Güçlendirilmiş Raman Spektroskopi (SERS) Analiz Sonuçları	33
4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Sonuçları	37
4.1.3. Termogravimetrik Analiz Sonuçları	42
4.1.4. Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları	46
4.2. İlaç Yükleme Verimi	46
4.3. İlaç Salım Çalışmaları	48

4.3.1. Genişletilmiş Perlit Partikülleri İçin İlaç Salım Davranışının İncelenmesi	48
4.3.1.1. pH'nın İlaç Salım Hızına Etkisi	48
4.3.1.2. Derişimin İlaç Salım Hızına Etkisi	50
4.3.2. İnterpolimerik Yapılardan İlaç Salım Davranışının İncelenmesi	51
4.3.2.1. pH'nın İlaç Salım Hızına Etkisi	51
4.3.2.2. Derişimin İlaç Salım Hızına Etkisi	52
4.3.2.3. İnterpolimerik Yapıların Salım Hızına Etkisi	54
4.3.2.4. Sıcaklığın İlaç Salım Hızına Etkisi	55
4.4. Sitotoksisite alışmaları	56
4.5. Kinetik Hesaplamalar	56
5. YORUM	76
6. KAYNAKLAR	79
EKLER	87
EK 1 – Tez alışması Orjinallik Raporu	87
ÖZGEçMİş	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	İlaç taşınım sistemlerinin zamansal gelişimi [10].	4
Şekil 2.2.	a) Poli-L-histidinin kimyasal yapısı, b) Poli-L-lizinin kimyasal yapısı.	8
Şekil 2.4.	Genişletilmiş perlite [59].	16
Şekil 2.5.	Dokсорubisin molekülünün kimyasal yapısı [66].	20
Şekil 3.1.	Shimadzu UV-1280 UV-Vis Spektrofotometre.	23
Şekil 3.2.	Bante 920 pH metre.	23
Şekil 3.3.	Delta Nu Raman Mikroskobu (785 nm).	24
Şekil 3.4.	Poli-L-histidinin pH değerine göre iyonlaşması.	26
Şekil 3.5.	Poli-L-lizinin pH değerine göre iyonlaşması.	26
Şekil 3.6.	İnterpolimerik yapıların şematik gösterimi.	27
Şekil 3.7.	İlaç salım tüpleri ve ortamı.	28
Şekil 4.1.	Genişletilmiş perlite ait SERS spektrumu.	34
Şekil 4.2.	İlaç yüklü genişletilmiş perlite ait SERS spektrumu.	35
Şekil 4.3.	İnterpolimerik yapılara ait SERS spektrumu.	36
Şekil 4.4.	Genişletilmiş perlit partiküllerine ait SEM görüntüleri. a) Genişletilmiş perlit partikülleri 2500X, b) Genişletilmiş perlit partikülleri 1000X, c) Genişletilmiş perlit partikülleri 500X.	37
Şekil 4.5.	Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partiküllerine ait SEM görüntüleri a) Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri 2500X, b) Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri 1000X, c) Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri 500X.	39
Şekil 4.6.	İnterpolimerik yapılara ait SEM görüntüleri a) İnterpolimerik yapılar 2500X, b) İnterpolimerik yapılar 1000X, c) İnterpolimerik yapılar 500X.	40
Şekil 4.7.	Genişletilmiş perlit partiküllerine ait termogram.	43
Şekil 4.8.	İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerine ait termogram.	43
Şekil 4.9.	İnterpolimerik yapılara ait termogram.	44
Şekil 4.10.	Genişletilmiş perlit, dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılarına ait termal analiz sonuçları.	44
Şekil 4.11.	Dokсорubisin molekülüne ait UV-Vis Spektrumu.	47

Şekil 4.12.	Dokсорubisin çözeltisine ait kalibrasyon grafiği.....	48
Şekil 4.13.	İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinde ilaç salım profilinin pH duyarlılıklarının incelenmesi. Partikül miktarı: 50 mg; Sıcaklık: 37°C.....	49
Şekil 4.14.	İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinde ilaç salım profilinin farklı derişimlerde incelenmesi. pH: 7,4; Sıcaklık: 37,0°C.....	50
Şekil 4.15.	İnterpolimerik yapılarda ilaç salım profillerinin pH duyarlılıklarının karşılaştırılması. Partikül miktarı: 50 mg; Sıcaklık: 37,0°C.....	51
Şekil 4.16.	İnterpolimerik yapılarda ilaç salım profilinin farklı derişimlerde incelenmesi. pH: 7,4, Sıcaklık: 37,0°C.....	53
Şekil 4.17.	Genişletilmiş perlit partiküllerinde ve interpolimerik yapılarda ilaç salım profillerinin pH duyarlılıklarının karşılaştırılması. Partikül miktarı: 50 mg, Sıcaklık: 37°C.....	54
Şekil 4.18.	Genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılarda ilaç salım profillerinin sıcaklık duyarlılıklarının karşılaştırılması. Partikül miktarı: 30 mg, pH: 7,4.	55
Şekil 4.19.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 5,5.....	59
Şekil 4.20.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,2.....	59
Şekil 4.21.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,4.....	60
Şekil 4.22.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 9,0.....	60
Şekil 4.23.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 11,0.....	61
Şekil 4.24.	İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 5,5.....	61
Şekil 4.25.	İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,2.....	62
Şekil 4.26.	İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,4.....	62
Şekil 4.27.	İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 9,0.....	63
Şekil 4.28.	İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 11,0.....	63
Şekil 4.29.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 5,5.....	64
Şekil 4.30.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 7,2.....	64
Şekil 4.31.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 7,4.....	65
Şekil 4.32.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 9,0.....	65
Şekil 4.33.	İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 11,0....	66
Şekil 4.34.	İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 5,5.	66
Şekil 4.35.	İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 7,2.	67
Şekil 4.36.	İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 7,4.	67

Şekil 4.37.	İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 9,0.	68
Şekil 4.38.	İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 11,0.	68
Şekil 4.39.	İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 5,5.	69
Şekil 4.40.	İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,2.	69
Şekil 4.41.	İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,4.	70
Şekil 4.42.	İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 9,0.	70
Şekil 4.43.	İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 11,0.	71
Şekil 4.44.	İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 5,5.	71
Şekil 4.45.	İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,2.	72
Şekil 4.46.	İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,4.	72
Şekil 4.47.	İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 9,0.	73
Şekil 4.48.	İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 11,0.	73
Şekil 4.49.	Korsmeyer-Peppas (K-P), sıfır derece (0th), ve birinci derece (1st) kinetik parametreleri.	74
Şekil 4.50.	Dokso rubisin çözeltisinin UV-Vis spektrumu. pH: 11,0.	74
Şekil 4.51.	Dokso rubisin çözeltisinin UV-Vis spektrumu. pH: 11,0, 24 saat sonra.	75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Korsmeyer–Peppas denkleminde bulunan n değerine göre salım mekanizmaları [16].	7
Çizelge 2.2.	Bazı polielektrolitlerin sınıflandırılması [25].	10
Çizelge 2.3.	Polielektrolit komplekslerin bazı uygulamaları [25].	13
Çizelge 2.4.	Perlitin fiziksel özellikleri [64].	16
Çizelge 2.5.	Türkiye’deki perlit rezerv dağılımı [64].	18
Çizelge 2.6.	Genişletilmiş perlitin genel kullanım alanları [64].	19
Çizelge 4.1.	Genişletilmiş perlit partikülleri, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapıları ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları.	46
Çizelge 4.2.	Sitotoksisite Sonuçları	56
Çizelge 4.3.	Doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partiküllerine ait kinetik analiz sonuçları. (K-P): Korsmeyer-Peppas, n : salım kuvveti	58
Çizelge 4.4.	İnterpolimerik yapılara ait kinetik analiz sonuçları. (K-P): Korsmeyer-Peppas.	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mg	Miligram
n	Salım kuvveti
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
mL	Mililitre
mW	Miliwatt
mV	Milivolt
$^{\circ}$ C	Derece Celsius
ppm	Milyonda bir

Kısaltmalar

SERS	Yüzey Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
MTT	((3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür)
K-P	Korsmeyer-Peppas
AgNP	Gümüş Nanopartikül
TLC	İnce Katmanlı Kromatografi Kağıdı
DMSO	Dimetil sülfoksit
pKa	İyonlaşma sabitinin logaritması

1. GİRİŞ

Kontrollü ilaç salım sistemleri geleneksel salım sistemleriyle karşılaştırıldığında ilaç salım miktarlarını istenilen seviyede tutmaları, yan etki ve toksisite gibi istenmeyen durumları daha düşük seviyeye indirmeleri ve ilaç alımındaki zaman aralıklarını uzatarak hasta uyumu ve konforunu arttırması gibi birçok avantaja sahiptir. Anti kanser ilaçların yan etkilerini azaltmasında büyük etkiye sahip bu sistemler birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir. Kontrollü salım sistemlerinin kullanılmasın da kullanılan malzemenin olası toksisitesi, yüksek seviyede ilaç salımı ve yüksek üretim maliyeti gibi dezavantajlar barındırabilir [1].

Doksorubisin, kanser ilaçları arasında büyük bir tedavi potansiyeline sahiptir [2]. Hızla bölünen hücreler ve yavaş ilerleyen hastalıklarda mücadele yeteneği, insan vücudundaki kanserli olmayan hücreler üzerinde sınırlı toksisite göstermesi nedeniyle on yıllardır tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Son zamanlarda pH, sıcaklık, ışık ve manyetik alan gibi dış uyarıcılara yanıt veren akıllı polimerler kontrollü ilaç salımı için büyük bir ilgi alanı olmuştur. Farklı pKa değerlerine sahip iyonlaşabilir polimerler pH'a duyarlı sistemler için tercih edilen akıllı polimerlerin başında gelmektedir. Polimerik yapı içinde bulunan farklı asit ve baz grupları bulunduğu ortamdaki pH değişimi ile iyonik yapısını değiştirerek yapısal olarak bir değişiklik gösterir [1]. Polielektrolit yapılar, üzerinde iyonize olabilen fonksiyonel gruplara ve farklı kimyasal bileşimlere sahip makromoleküllerdir. Bu yapılar, üzerinde bulunan katyonik ve anyonik yapıları arasında bulunan yapılar arasındaki ikincil etkileşimlerle oluşurlar. Genel olarak polielektrolit yapıların oluşturulmasında kimyasal çapraz bağlayıcılar kullanılmadığı için toksik etki göstermezler ve kontrollü ilaç salımı ve diğer birçok biyolojik uygulamalar için kullanılabilir [3].

Perlit, yüksek ısı altında hacimsel olarak genişleyebilen silisli bir volkanik camdır. Yüksek sıcaklıklarda ısıtıldığında hacmi ilk hacminden 20 kat artmaktadır [4]. Yüksek sıcaklıklarda oluşan genişletilmiş perlitin yoğunluğu, normal perlit ile karşılaştırıldığında çok düşüktür. Gözenekli bir yapıya sahip oluşu ve ısı altında büyük oranda genişlemesi yüzey alanı arttırmaktadır. Bu sebeple adsorpsiyon kapasitesi çok yüksektir.

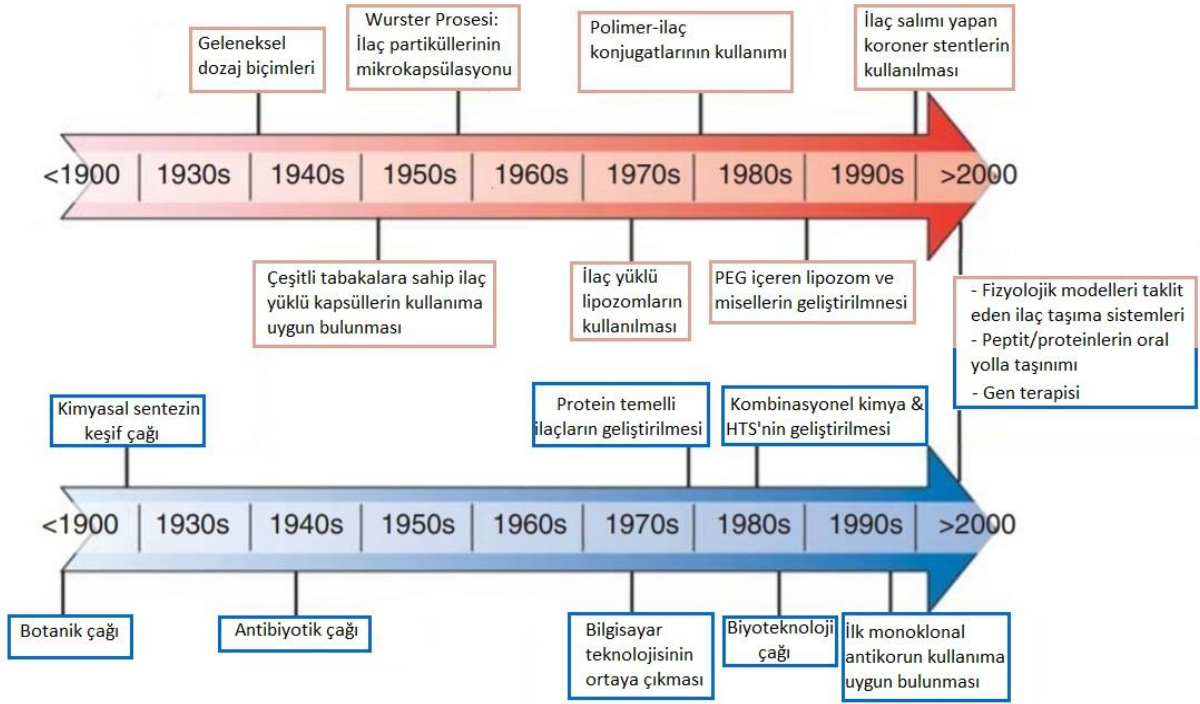
Tez çalışması kapsamında ilk defa yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip silika bazlı bir malzeme olan genişletilmiş perlit partiküllerine doksorubisin ilacı yüklenmiştir. Doksorubisin yüklü perlit partikülleri içeren, biyoyumlu polimerler olan poli-L-lizin ve poli-L-histidinden oluşan interpolimerik kompleksler sentezlenmiştir. Doksorubisin yüklü perlit ve doksorubisin yüklü perlit içeren interpolimerik yapılar için farklı pH, derişim ve sıcaklık için ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Yapılan salım çalışmaları için kinetik parametreler hesaplanmıştır.

Sentezlenen interpolimerik yapılar ve doksorubisin yüklü perlit partiküller için karakterizasyon çalışmaları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisi (SERS) ile yapılmıştır. Oluşturulan yapıların termal dayanımını belirlemek için termogravimetrik (TGA) analiz gerçekleştirilmiştir. Her iki yapı için yüzey yükleri zeta potansiyel ölçümleri ile belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Salımı

İlaç salımı, terapötik etkiyi uzun süre sağlamak için yeni malzeme veya taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde ilgi duyulan geniş bir araştırma alanı olmuştur [5]. 1900'li yılların başlarında, kimya alanındaki gelişmelere bağlı olarak geleneksel ilaçlardan daha modern yaklaşımlara doğru bir geçiş başlamıştır [6, 7]. 1940'lı yıllar boyunca ilaç keşif çalışmaları askeri ihtiyaçlar doğrultusunda yönlendirilmiş, yaralı askerlerin tedavi edilmesi amacıyla antibiyotikler geliştirilmiş ve üretilmiştir [8]. 1950'li yılların başlarında kontrollü salım için mikrokapsüllenmiş ilaçlar geliştirilmiştir [9]. 1960'lı yıllarda kontrollü ve hedeflenmiş ilaç salımına yönelik birçok yöntem önerilmesine rağmen 1970'li yıllara kadar bu yöntemler tam anlamıyla kullanılmamıştır [10]. Bu on yıl süresince, biyoteknoloji ve moleküler biyolojideki çalışmalar protein bazlı ilaçların geliştirilmesi ve birçok hastalıkların tanınmasını sağlayarak ilaç üretim aşamalarında önemli rol oynamıştır. Benzer şekilde, bilgisayar programı ve çeşitli yazılımlar gibi teknolojik gelişmelerden yararlanarak yeni ilaçların üretim süreci önemli ölçüde hızlanmıştır [11, 12]. Yeni tanımlanan ilaç bileşenlerinin yüksek etkinlik ve olumsuz yan etkileri azaltmak amacıyla implantlar, kaplamalar, miseller ve lipozomlar gibi farklı ilaç salım sistemleri önerilmiştir [13, 14]. İlaç keşiflerinde kullanılan teknolojinin zamanla gelişimiyle ilaç kullanımının kolaylaştırılması ve yeni ilaçların keşfedilmesi ilaç salım sistemlerinde büyük bir değişime neden olmuştur. İlaç salım sistemleri hakkındaki tarihsel gelişim Şekil 2.1.'de gösterilmiştir [10].



Şekil 2.1. İlaç taşıma sistemlerinin zamansal gelişimi [10].

2.2. İlaç Salım Kinetiği

İlaç salım mekanizması ilaç, polimer, katkı maddeleri, bileşen oranları, bileşenler arasında oluşan fiziksel-kimyasal etkileşimler ve hazırlama yöntemleri gibi birçok faktöre göre değişim göstermektedir [15]. Matematiksel modeller ilaç salımındaki fiziksel parametrelerin tespitinde yardımcı olarak salım kinetiğinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır [16]. İlaç salım sistemlerinin mekanizmaları açıklamak için birçok model geliştirilmiştir.

2.2.1. Sıfır Derece Modeli

Sıfırıncı derece modele uyan ilaç salım sistemleri etken madde derişiminden bağımsız olarak eşit zaman aralıklarında aynı miktarda ilaç salımı yaparlar [17]. Sıfırıncı derece model Denklem 2.1. ile ifade edilmektedir.

$$Q_t = Q_0 + k_0 t \quad (2.1)$$

Q_t: t zamanında salınan ilaç miktarı

Q₀: t=0 anında bulunan ilaç miktarı

k₀: Sıfırıncı derece salım hız sabiti

Denklem 2.1.'de yer alan sıfırıncı derece salım hız sabiti (k₀) salınan ilaç miktarının zamana karşı grafiğe geçirilmesi ile oluşan doğrunun eğiminden elde edilir.

2.2.2. Birinci Derece Modeli

Birinci derece modele uyan ilaç salım sistemlerinde salınan ilaç miktarı, ilaç derişime bağımlıdır [18]. Birinci derece model Denklem 2.2. ile ifade edilmektedir.

$$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 \cdot t \quad (2.2)$$

Q_t: t zamanında salınan ilaç miktarı

Q₀: t=0 anında salınan ilaç miktarı

K₁: Birinci derece salım hız sabiti

Denklem 2.2.'de yer alan birinci derece salım hız sabiti (k₁) lnQ_t'ye karşı zaman grafiği ile oluşan doğrunun eğiminden elde edilir.

2.2.3. Higuchi Modeli

Matris sistemlerden ilaç salımını açıklamaya çalışan ve 1961 yılınca Higuchi tarafından önerilen ilk matematiksel modeldir [19] . Higuchi modeli Denklem 2.3. ile ifade edilmektedir.

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

Q: t zamanında birim yüzey alanından salınan ilaç miktarı

A: İlaç taşıyıcıya ait yüzey alanı

C: Matris içerisindeki başlangıç ilaç derişimi

Cs: Matris içerisindeki ilaç çözünürlüğü

D: Matris içerisindeki ilaç difüzyon katsayısı

2.2.4. Hixson-Crowell Modeli

Hixson-Crowell parçacıkların yüzey alanının hacminin küp kökü ile orantılı olduğunu ifade etmiştir [17]. Bu model partikül veya tabletlerin yüzey alanındaki değişiminden kaynaklı ilaç sistemlerinde oluşan salımı açıklamaktadır. Hixson-Crowell modeli Denklem 2.4. ile ifade edilmektedir.

$$W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = \kappa t \quad (2.4)$$

W₀: İlacın farmasötik dozaj formundaki başlangıç miktarı

W_t: t zamanında farmasötik dozaj formunda kalan ilaç miktarı

κ: Yüzey-hacim ilişkisini oluşturan sabit

2.2.5. Korsmeyer-Peppas Modeli

Korsmeyer ve arkadaşları, polimerik sistemlerde oluşan ilaç salımını Korsmeyer-Peppas modeli ile tanımlayan bir eşitlik türetmişlerdir [20]. Korsmeyer-Peppas modeli Denklem 2.5. ile ifade edilmektedir.

$$M_t / M_\infty = kt^n \quad (2.5)$$

M_t/M_∞: t zamanında salınan ilaç fraksiyonu

k: Salım hız sabiti

n: Salım kuvveti

Denklem 2.5'te yer alan n değeri değişik geometriye sahip matrislerde oluşan farklı salım mekanizmalarını ifade etmektedir. n değerinin 0,5'e eşit olduğu durumlarda salınan ilacın difüzyonu Fickian difüzyonuna uyarak gerçekleştiği belirtilir. 0,45<n<0,89 durumunda ilaç salımı Fickian difüzyonuna uymayan difüzyon ile oluştuğu, n değeri 0,89 veya bu

değerden daha büyük değere sahip ise ilaç salımı durum II ya da süper durum II mekanizmalarına ile gerçekleştiği ifade edilir [18]. 'n' değerine bağımlı salım mekanizmaları Çizelge 2.1.'de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Korsmeyer–Peppas denkleminde bulunan n değerine göre salım mekanizmaları [16].

Salım Kuvveti (n)	İlaç Taşıma Mekanizması	Zamanın Bir Fonksiyonu Olarak Hız
0,5	Fickian Difüzyonu	$t^{-0,5}$
$0,45 < n < 0,89$	Fickian Olmayan Difüzyon	t^{n-1}
0,89	Durum II	Sıfırıncı Derece Salım
0,89'dan büyük	Süper Durum II	t^{n-1}

2.2.6. Baker-Lonsdale Modeli

Higuchi modeli örnek alınarak Baker ve Lonsdale (1974) tarafından geliştirilen bu model küresel yapılardan ilaç salımını tanımlamaktadır [21]. Baker-Lonsdale modeli Denklem 2.6 ile ifade edilmektedir.

$$kt = \frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_T}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_T}{M_\infty} \quad (2.6)$$

M_T/M_∞ : t zamanında salınan ilaç fraksiyonu

k: Salım hız sabiti

t: zaman

2.3. İnterpolimerik Yapılar

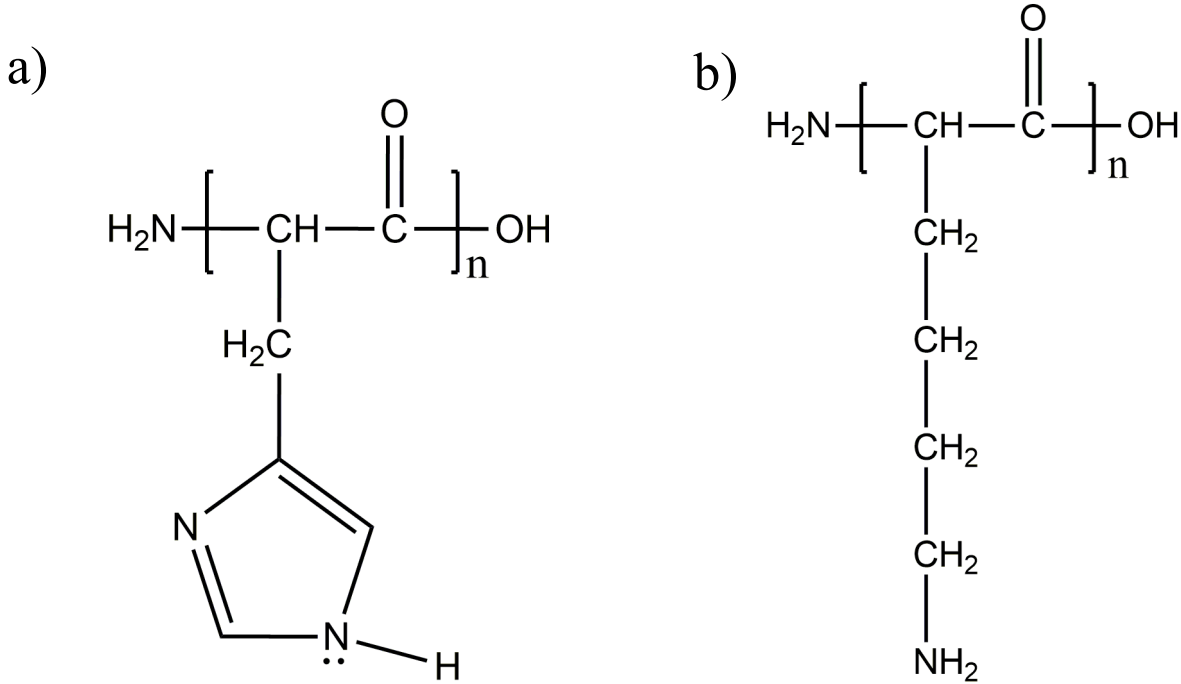
Son yıllarda, yeni ilaç taşıma sistemleri alanında büyük gelişmeler meydana gelmiştir. Yeni ilaç salım teknikleri ile taşınan ilaç miktarının kontrolü, terapötik etki süresinin sürdürülebilirliği ve ilacı hedeflenen yerlere taşınabilmesi amaçlanmıştır. İnterpolimerik etkileşimler ve zıt yüklü kuvvetler sonucu oluşan polielektrolit yapılar temel ve uygulamalı araştırmaların odak noktası olmuştur. Son zamanlarda sıcaklık, pH, elektrik ve manyetik alan gibi birçok dış uyarana duyarlı polimerlerin kullanıldığı çalışmalar hız

kazanmıştır. pH değişimi, yüklü grupların nötralizasyonu ve sıcaklık gibi polimerlerde dış uyarılar sonucu oluşan değişimlerden yararlanarak kontrollü ilaç salım sistemleri geliştirilmiş, ilaç bileşenlerinin biyolojik dağılımı iyileştirilmiştir. Bu nedenle modern farmasötik teknolojide giderek önem kazanmışlardır [22].

Polielektrolit kompleksler, polimer-polimer, polimer-ilaç ve polimer-ilaç-polimer gibi zıt yüklü parçacıklar arasında yer alan etkileşimler sonucu oluşan bileşiklerdir. Zıt yüklü etkileşimin varlığı sebebiyle çapraz bağlayıcı kimyasalların kullanılmasının önüne geçilerek kimyasalların olası toksisitesini ve istenmeyen yan etkileri engellenmiştir [23, 24].

2.3.1. Polielektrolitler

Negatif veya pozitif yüke sahip polimerlerin elektrostatik etkileşimlerle bir araya gelerek oluşturdukları yapılar polielektrolitler olarak adlandırılırlar. Genellikle suda çözünebilirler. Polielektrolitlerin çözünmesi çözücü ve yüklü polimer arasındaki etkileşim sonucu oluşmaktadır. DNA, poli-L-histidin, poli-L-lizin gibi proteinler, karajen ve selüloz türevleri bu tür polimerlere örnek verilebilir [25].



Şekil 2.2. a) Poli-L-histidinin kimyasal yapısı, b) Poli-L-lizinin kimyasal yapısı.

2.3.2. Polielektrolitlerin Sınıflandırılması

Polielektrolitler, menşesine göre doğal polielektrolitler, sentetik polielektrolitler ve kimyasal olarak modifiye edilmiş biyopolimerler; bileşimine göre homopolimer ve kopolimer; moleküler geometrisine göre doğrusal, dallanmış ve çapraz bağlı; elektrokimyasal özelliklerine göre ise polikasyonlar/polianyonlar, poliasitler/polibazlar ve amfoterik polimer olarak sınıflandırılırlar. Bazı polielektrolitler Çizelge 2.2' de özetlenmiştir [25].

Çizelge 2.2. Bazı polielektrolitlerin sınıflandırılması [25].

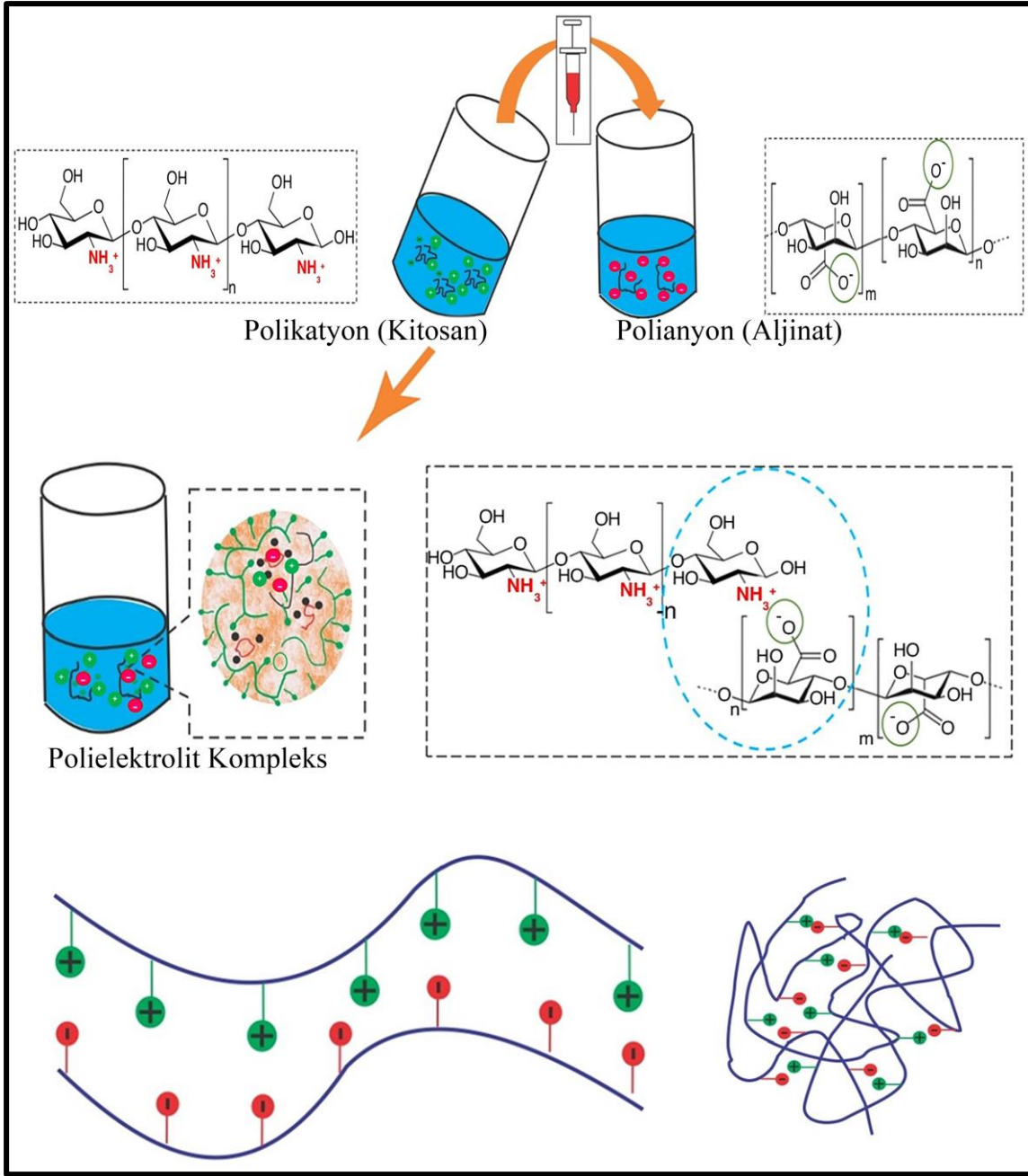
İsim	Sınıf
Doğal Polielektrolit	
Nükleik Asitler	Polianyon
Poli (L-lizin)	Polikasyon
Poli (L-glutamik asit)	Polianyon
Karagenan	Polianyon
Aljinat	Polianyon
Hyalüronik asit	Polianyon
Kimyasal Olarak Değiştirilmiş Biyopolimerler	
Pektin	Polianyon
Kitosan (kitinin deasetilasyonu)	Polikasyon
Selüloz esaslı	Polianyon veya polikasyon
Nişasta bazlı	Polianyon veya polikasyon
Dekstran bazlı	Polianyon veya polikasyon
Sentetik Polielektrolitler	
Poli (vinilbenzil trialkil amonyum)	Polikasyon
Poli (4-vinil-N-alkil-piridimun)	Polikasyon
Poli (akriloil-oksialkil-trialkil amonyum)	Polikasyon
Poli (akrilamidoalkil-trialkil amonyum)	Polikasyon
Poli (dialdimetil-amonyum)	Polikasyon
Poli (stirensülfonik asit)	Polianyon
Poli (vinilsülfonik asit)	Polianyon
Poli (akrilik veya metakrilik asit)	Polianyon
Poli (itakonik asit)	Polianyon
Maleik asit / dialilamin kopolimeri	Poliamfolitik

2.3.3. Polielektrolitler Komplekslerin Teorik Yönleri

Polielektrolit komplekslerin oluşumu ve özellikleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır [26-29]. Polielektrolit komplekslerin oluşum mekanizmasını açıklamak için elektrostatik kuvvetlere ve Flory-Huggins'in polielektrolitlerin serbest enerjilerine dayanan teorileri önerilmiştir [30-32]. Genel olarak iki polimerin yapısal olarak uyumlu olmaması ve birbirini itmesine rağmen polimerlerin yük oranı, polimerler arasında meydana gelecek etkileşim türünü belirler. Yük oranı düşük olduğunda, polimer yapılarının itmesi (Flory etkileşim parametresi) baskındır ve çözelti, her biri çoğunlukla polimerlerden birini içeren iki faza ayrılır. Yüksek yük oranında, polimerler arasındaki elektrostatik etkileşimler baskındır ve bir araya gelerek kompleks oluştururlar. Yük oranı aralığın ortasında ise denge durumu iki polimerin sadece mikroskobik olarak ayrıldığı bir mezofaz olabilir. Karışımın fiziksel özelliklerine (bağlı derişim, bağli zincir uzunlukları ve yük yoğunlukları) bağli olarak, polimerler arasındaki makroskopik bir faz ayrımı ya da polimer zincirlerinin kısmi agredasyonuna bağli olarak iki tür kompleks oluşumu gözlemlenir [33].

2.3.4. Polielektrolit Komplekslerin Oluşumu

Polielektrolit yapılar bir veya birden fazla zıt yüklü iyonlara sahip polielektrolitlerin bir araya gelerek aralarında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler sonucu oluşur. Bu yapıların oluşumu Şekil 2.2'de gösterilmiştir. İlk adım da zıt yüklü polielektrolitleri içeren çözeltiler karıştırılarak bir araya gelen bu yapılar arasında iyonik etkileşimler oluşur. İyonik etkileşimler sonucu bir arada bulunan polielektrolit yapılar hidrojen bağları, Van der Waals bağları ve hidrofobik etkileşimler ile karmaşık geometrilere sahip makro molekülleri oluştururlar [34].



Şekil 2.3. Polielektrolit yapıların oluşumunu [34].

2.3.5. Polielektrolit Komplekslerin Kullanıldığı Uygulamalar

Polielektrolit kompleksler, potansiyel uygulamaları sebebiyle son birkaç yılda büyük ilgi görmüştür. Bu kompleksler membran, film ve fiberlerin kaplanması, proteinlerin ve nükleik asitlerin izolasyonu, farmasötik ürünleri bağlanması, ilaç taşımında mikrokapsüllerin hazırlanması ve katalizör için destek materyali olarak kullanılması gibi birçok çalışmada kullanılmışlardır [35-46]. Polielektrolit komplekslerin fonksiyonel uygulamaları Çizelge 2.3.'de özetlenmiştir [25].

Çizelge 2.3. Polielektrolit komplekslerin bazı uygulamaları [25].

Fonksiyonel Özellik	Uygulamaları
Karşı İyonlarla Etkileşim	<ul style="list-style-type: none"> • Filtrasyon İşlemi Desteği - Karşı İyonların Uzaklaştırılması • Jelleşme Süreci - Çok Değerliğe Sahip Karşı İyonlarla Köprüleme • Analitik Yöntemler - Karşı İyon Değişimi
Yüzey Aktif Maddelerle Etkileşim	<ul style="list-style-type: none"> • Düşük Enerjili Yüzey Modifikasyonu İçin Çözünmeyen Poliiyon-Yüzey Aktif Madde Kompleksi • Misellerin Oluşumu
Yüke Sahip Düşük Mol Kütleli Moleküllerle Etkileşim	<ul style="list-style-type: none"> • Poliiyon İlaç Kompleksleri
Yüklü Parçacıklarla Etkileşim	<ul style="list-style-type: none"> • Yüzdürme - Atık Su Arıtma • Susuzlaştırma - Çamur, Kağıt Hamuru ve Kağıt Üretimi • Yüzdürme Yöntemi - Madencilik • Tutma - Kağıt Üretimi
Yüklü Yüzey Aktif Maddelerle Etkileşim	<ul style="list-style-type: none"> • Yer Değiştirme Kromatografisi - Biyomoleküllerin Toplanması ve Ayrılması • Yüzeylerin ve Arayüzlerin Modifikasyonu - Kaplama (antistatik, sensörler, çok katmanlı) • Katkı Maddesi (Kozmetikler, Deterjanlar)

Son yirmi yıldır yapılan araştırmalar sonucu ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesinde polielektrolit komplekslerin olumlu yönde etkili olduğu görülmüştür [47-50]. Aktif bileşenler, polimer matriks içinde moleküler seviyede kapsüllenerek kararlılık ve çözünme gibi fizikokimyasal özelliklerin değiştirilmesiyle ilaç salımı için daha geniş

avantajlar sunar. İlaç molekülleri, polielektrolit bileşenlerle dört farklı yolla birleştirilebilir [25]. Birinci durumda, kompleks çökelme aşamasında çözelti ortamında bulunan ilaç moleküllerini içine hapsederek ilaç yüklü yapılar oluştururlar. İkinci durumda ortamda bulunan polielektrolit kompleksler çözelti ortamından ilaç moleküllerini adsorbe ederler. Üçüncü durumda, ilaç molekülleri, kompleksi oluşturan bileşiklerden birine kimyasal olarak bağlandıktan sonra kompleksi oluşturan diğer bileşenle polielektrolit yapı oluşturduktan çökerek ilaç yüklü kompleks oluştururlar. Son durumda ise ilaç bileşenler poliyon gibi davranarak polielektrolit kompleks oluştururlar. Polielektrolit komplekslerden ilaç salımı iyon değişim mekanizması, yük etkileşimi, kompleksin çözünmesi ya da parçalanmasıyla gerçekleşir. Polielektrolit komplekslerin farklı hazırlanma yöntemleri ve uygulamalarıyla ilgili birçok çalışma mevcuttur.

Wang ve arkadaşları poli-L-lizin ile hiyalüronik asitten oluşan doksorubisin yüklü pH duyarlı polielektrolit yapılar oluşturmuşlardır. Doksorubisin molekülleri hiyalüronik aside bağlandıktan sonra poli-L-lizin ile kompleks oluşturarak farklı pH'larda yapılan salım çalışmalarında pH:7,4'de ilaç salımı çok az iken pH: 5,0-6,0 arasında önemli miktarda ilaç salımın gerçekleştiğini belirtmişlerdir [51].

Kawashima ve arkadaşları teofilin içeren kitosan-sodyum tripolifosfat'dan oluşan polielektrolit bir yapı oluşturmuşlardır. Sodyum tripolifosfat içeren teofilin granülleri kitosan çözeltisi içerisinde karıştırılmıştır. Karışma esnasında, granüllerdeki çözünmüş sodyum tripolifosfat yüzeye taşınarak Kito sanla polielektrolit kompleks filminin oluşmasına neden olmuştur. Kaplanmış granüller sıfırıncı derece kinetiğe sahip ilaç salım modeli oluşturduğu ve saf granüllerle karşılaştırıldığında salım miktarlarının önemli derecede azaldığı belirtilmiştir [52].

Shiraishi ve arkadaşları sodyum tripolifosfat-kitosandan oluşan polielektrolit kompleksleri ile indometasin yüklü jel küreler oluşturmuşlardır. Bu çalışmada kitosan hidrolizatlarının moleküler ağırlığının, indometasinin jel kürelerden salım ve emilim oranları üzerindeki etkileri incelenmiş ve indometasin salım miktarının artan moleküler ağırlık ve indometasin miktarı ile azaldığı belirtilmiştir [53].

Liao ve arkadaşları ara yüzey polielektrolit kompleksleşme tekniği ile kitosan-aljinat'dan oluşan polielektrolit kompleks fiberleri hazırlamışlardır. Bileşen özelliklerine bağlı

olarak, komplekslere yüklü olan ilaç ve proteinlerin salım süresinin saatlerden haftalara değişebileceğini gözlemlemişlerdir. Dekametazon iki saat içinde tamamen salınırken sığır serum albümin ve avidin gibi yüklü bileşiklerde örnek salımının üç hafta boyunca sürdüğü görülmüştür. Bu çalışmada, ara yüzey polielektrolit kompleksleşme tekniği yüksek ilaç yükleme kapasitesi, sürekli salım profili, yüklenen ilaçların biyoaktivitesinin koruma kapasitesi ve kontrollü salım sağlayan fiberler üretmek için iyi bir teknik olduğu ifade edilmiştir [54].

Win ve arkadaşları, oral yolla alınan ibuprofenin kontrollü salımı için fosforile edilmiş kitosan esaslı polielektrolit jel küreler oluşturmuşlardır. pH 4,0'de tripolifosfat ve karşıt polianyonuyla bir iyonotropik jelleşme yöntemini kullanarak çözünür fosforile edilmiş kitosandan fosforile edilmiş kitosan jel küreler hazırlamışlardır. Farklı pH'larda in vitro salım çalışmaları kapsamında fosforile edilmiş kitosan jel kürelerden ibuprofenin salım yüzdesi, çözeltinin pH'ı yükseldikçe arttığı gözlemlenmiştir. İbuprofenin pH 7,4'teki salım hızı ibuprofenin yüksek çözünürlüğü ve fosfat grubunun iyonlaşması nedeniyle pH 1,4'teki salım hızına göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. [55].

2.4. Perlit

Diatomit, perlit gibi silika tabanlı inorganik malzemeler yüksek gözenek sayısı, geniş yüzey alanı, küçük parçacık boyutu ve düşük ısıl iletkenlik gibi birçok benzersiz özelliklere sahiptirler. Perlit, yüksek ısı altında hacimsel olarak büyük ölçüde genişleyebilen silisli bir volkanik camdır. 870°C ve üzeri sıcaklıklarda ısıtıldığında hacmi ilk hacminden 4–20 kat arası artmaktadır [4, 56]. Gözenekli bir yapıya sahip oluşu ve ısı altında büyük oranda genişlemesi sebebiyle su emilimi oldukça yüksektir. Ayrıca genişletilmiş perlitin yoğunluğu, normal perlitte karşılaştırıldığında çok düşüktür. Perlit, inşaat malzemeleri, tıp ve kimya sanayi gibi birçok alanda kullanılmaktadır [57]. Ayrıca sağlığa zararlı olmaması ve ısıya karşı dirençli olması biyolojik ve diğer uygulama alanlarındaki kullanım oranını arttırmaktadır. Vermikulit, genişletilmiş kil, süngertaşı ve yün gibi malzemelerle karşılaştırıldığında perlitin düşük maliyetli olması çok önemli bir avantaj sağlar. Türkiye dünyada en büyük perlit rezervine sahip ülkelerden biridir. Türkiye'deki toplam perlit rezervinin 4,5 milyar ton olduğu tahmin edilmiştir [58]. Genişletilmiş perlit Şekil 2.3.'de gösterilmiştir [59].



Şekil 2.4. Genişletilmiş perlite [59].

2.4.1. Perlitin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Perlit kimyasal olarak % 12–18 alüminyum oksit ve az miktarda potasyum oksit, sodyum oksit, demir, magnezyum, kalsiyum, titanyum içeren amorf silika bazlı inorganik malzemedir [60]. Perlitin diğer volkanik yapılardan ayıran en büyük özellik 760–980°C'a kadar hızlıca ısıtıldığında hacmi ilk hacminden 4–20 kat genişlererek yüksek yüzey alanına sahip olmasıdır [61]. Perlitin yavaşça ısıtılması durumunda adsorbe edilen su yavaş yavaş ayrılacağı için hacimsel genişleme hızlı ısıtmadaki kadar büyük olmayacaktır. [62]. Perlit ısıtıldıktan sonra düşük yoğunluklu, gözenekli bir yapıya sahip olur ve rengi griden beyaza döner. % 2–5 oranında su içeren perlit Dünya'da 60 milyon yıldan daha az sürede var olan camsı, riyolitik, yüksek oranda silis içeren volkanik kayalardan meydana gelir [63]. Perlitin fiziksel özellikleri Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir [64].

Çizelge 2.4. Perlitin fiziksel özellikleri [64].

Renk	Gri, Beyaz(genişletilmiş), Siyah
Reflektif İndeksi	1,5
pH (sulu ortamda)	6,5–8,0
Serbest Nem (en yüksek)	%0,5
Kütle Yoğunluğu (düşük kütlede)	Genişletilmiş: 32-400 kg/m ³ Ham: 960/1200 kg/m ³
Mesh Boyutu	4 – 8 mesh ve daha ince
Yumuşama Noktası	1600 – 2000°F/871 – 1093°C
Füzyon Noktası	2300- 2450°F/1260-1343°C

2.4.2. Perlit Rezervleri

Dünya'daki perlit rezervi Türkiye'de %41, Yunanistan'da %26, Birleşik Devletler'de ise %18'dir. Dünya'daki perlit rezervleri incelendiğinde Türkiye'deki rezervler daha fazladır. Dünya perlit rezervinin 8 milyar ton olduğu ve bu rezervin 5,7 milyarı ise Türkiye'de bulunduğu tahmin edilmiştir. Türkiye'deki perlit rezerv dağılımı ise çizelge 2.5.'da gösterilmiştir [64].

Çizelge 2.5. Türkiye’deki perlit rezerv dağılımı [64].

Perlit Kaynağı	Rezerv (ton)	Yüzde (%)
Kars-Sarıkamış	2,043,000,000	33,9
Van-Erciş	1,400,000,000	23,2
Bitlis-Adilcevaz ve Tatvan	940,000,000	15,6
Nevşehir-Derinkuyu-Acıgöl	800,000,000	13,3
Erzurum-Pasinler	386,824,000	6,4
Çankırı-Orta-Kalfat	128,200,000	1,5
İzmir-Bergama-Cumaovası-Foça	88,000,000	1,5
Erzincan-Mollatepe	71,500,000	1,2
Ankara-Çubuk	51,000,000	0,8
Ankara-Kızılcahamam-Güvem	31,500,000	0,5
Balıkesir-Şavaştepe	26,000,000	0,4
Balıkesir-Sındırgı	21,206,000	0,4
Manisa-Saruhanlı	17,700,000	0,3
Kütahya-Avdan	11,500,000	0,2
Ankara-Kızılcahamam-Çamkoru	8,000,000	0,1
Ankara-Kızılcahamam-Korkmazlar	3,700,000	0,1
Toplam	6,028,130,000	100

2.4.3. Perlitin Uygulama Alanları

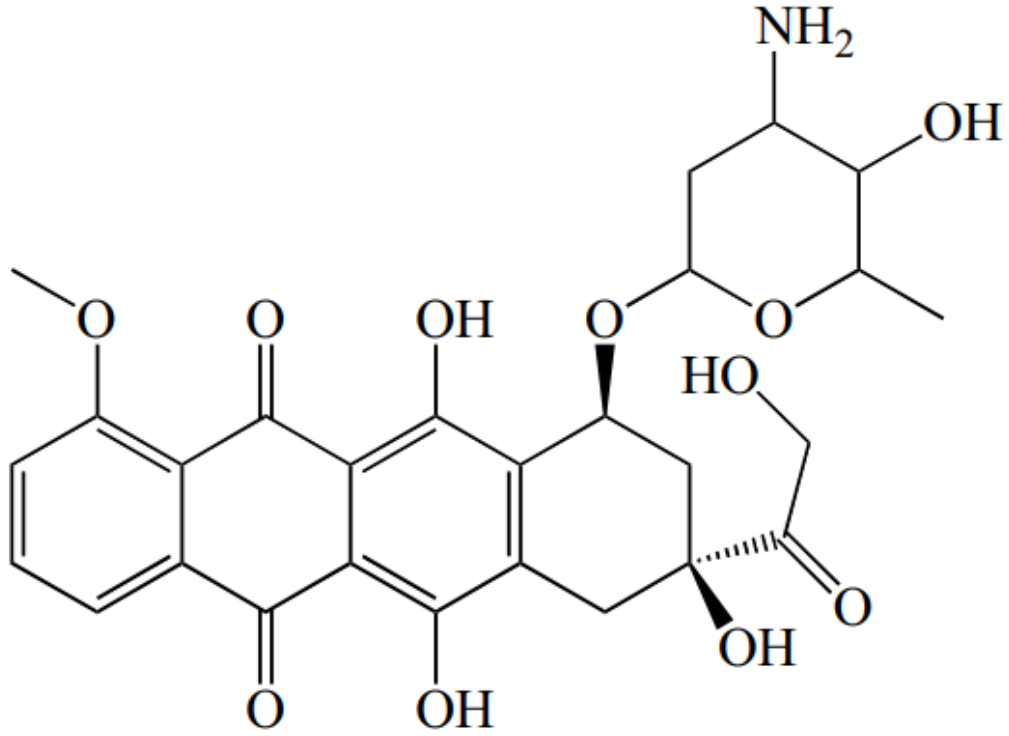
Perlitin çelik endüstrisi, silika kaynağı ve kumlama gibi birçok farklı alanda uygulamaları mevcuttur. Genellikle inşaat, seramik, gıda, kimya ve tarım endüstrisinde kullanımı daha yaygındır. Genişletilmiş perlit daha hafif ve yüksek miktarda gözenekli yapıya sahip olması ve maliyet olarak daha avantajlı olduğu birçok uygulama için daha çok tercih edilir. Bunun yanında hem ülke ekonomisine hem de küresel ısınmaya karşı olumlu etkiye sahiptir. Genişletilmiş perlitin genel kullanım alanları Çizelge 2.5.’de özetlenmiştir [64].

Çizelge 2.6. Genişletilmiş perlitin genel kullanım alanları [64].

Kullanım amacı	Kullanım yeri
Akustik	Sıvalar, harçlar, alçı levhaları, duvar yalıtımı, otoyol ses emici duvarlar
Ateşe Dayanıklılık	Kasalarda, odalarda ve baca kaplamalarında yangın yalıtımı
Bahçe	Bitki köklenmesi, tohum yetiştirme ortamı, tohum kaplama
Ortam ve Düşük Sıcaklık İzolasyonu	Çatı zemin kaplaması, beton zemin dolgusu, perlit asfalt, bitümlü perlit, duvar panolarında dolgu, duvar izolasyonları, soğutma tesisleri
Orta ve Yüksek Sıcaklık İzolasyonu	Kazan kaplamaları, boru kaplamaları, dökme boru izolasyonu
Petrol Kuyusu İşlemleri	Petrol kuyusu çimentolama ve düşük yoğunluklu çamur
Sıvı Filtreleme	Bira, şarap, sitrik asit, şeker, yağlar, ilaçlar, meyve suları, içme suyu, yüzme havuzu suyu, biyodizel
Tarımsal Katkı ve Destek	Koku ve nem emiciler, gıda ve ilaç için taşıyıcılar
Yüksek Isı İzolasyonu	Dökümhane kalıpları, fırınları, malzemeleri

2.5. Doksorubisin

Doksorubisin, değiştirilmemiş formunda kemoterapötik ilaçlar arasında büyük bir tedavi potansiyeline sahiptir [2]. Hızla bölünen hücreler ve yavaş ilerleyen hastalıklarda mücadele yeteneği, insan vücudundaki kanserli olmayan hücreler üzerinde sınırlı toksisite göstermesi nedeniyle on yıllardır tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Doksorubisin aglikonik ve şeker gruplarına sahip seçici olmayan bir sınıf 1 antrasiklin grubunda yer alır. Aglikon, bitişik halde bulunan kinin–hidrokinon gruplarına sahip bir tetrasiklik halka, metoksi grubu bulunduran kısa zincir ve karbonil gruplarından oluşan bir yapıdır. Şeker bileşeni, halkalardan birine glikozit bağıyla bağlanır [65]. Doksorubisin molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.4. ile gösterilmiştir [66].



Şekil 2.5. Doksorubisin molekülünün kimyasal yapısı [66].

2.5.1 Doksorubisin Metabolizması

Doksorubisin farmokinetiği ve birçok tümör tiplerine karşı tek veya çok ajanlı tedavilerle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların çoğu, doksorubisin dağılımının intravenöz enjeksiyondan sonra çok fazlı olduğunu göstermiştir. Bu, doksorubisinin 3–5 dakikalık yarı dağılım ömrünü vererek ilacın hücreler tarafından hızlı alımını gösterir. Doksorubisinin 24–36 saatlik son yarılanma ömrü, doksorubisin dokudan atılmasının alımından daha uzun sürdüğünü göstermektedir [67]. Toksikite riskini azaltmak için ilacın kararlı durum dağılımı zorunludur. Sabit dağılım aralığı 500 – 800 L/m² arasında değişir ve bu vücuttaki dokuların güçlü miktarda doksorubisin almasına izin verir [67]. Doksorubisin ve ana metabolit doksorubisinol plazma proteinlerine bağlıdır. Çoğu ilaç gibi doksorubisinde hücreye pasif difüzyon yoluyla girer ve ilacın hücre içi derişimi hücre dışı derişimine göre 10–500 kat daha fazladır. Hücre çekirdeğindeki doksorubisin derişimi ise hücre sitoplazmasındaki derişime göre 50 kat daha fazladır. Çekirdekteki doksorubisin miktarı ise 340 µM seviyesine kadar ulaşabilmektedir. Hücre içindeki serbest halde bulunan doksorubisin molekülleri ise hücre içi organellere dağıtılır [68]. Kemik iliği ve beyaz kan hücrelerinde bulunan doksorubisin derişimi kan plazmasından

200–500 kat daha yüksektir. Doksorubisin vücutta bulunan dokulara hızlı bir şekilde dağıldığı için kandaki doksorubisin derişimi hızlı bir şekilde düşmektedir. Doksorubisin dokulara hızlı bir şekilde nüfuz ederken, lipofilik ve DNA'aya bağlanma özelliği ile hücre içinde daha uzun süre kalabilmektedir. Doksorubisin yüksek penetrasyon özelliğine sahip olmasına rağmen kan–beyin bariyerini geçemez. Doksorubisinin vücuttaki kimyasal değişimi karaciğerde meydana gelmektedir. Doksorubisinol molekülü stereo-spesifik indirgemeye uğrar. Bu değişimin meydana gelebilmesi için aldo–ketoreduktaz ve sitoplazmik karbonil reduktaz enzimlerine ihtiyaç duyulur. Hem doksorubisin hemde doksorubisinol moleküllerinin metabolize edilebilmesi için hidrolitik glikozit ve O-sülfasyon, O-demetilasyon gibi bir dizi tepkimeye girmesi gerekmektedir. Şekerde bulunan glikozit bağları asit katalizli hidrolize uğradığında doksorubisin ve doksorobisinol moleküllerindeki şeker bileşenleri ayrılırlar. Glikozit bağının hidrolizi doksorubisinonun doksorubisinden ve doksorubisinolonun doksorubisinolden oluşumuna neden olur. Son olarak biyolojik dokularda oluşan ilaç metabolitleri dışkı ve idrar yoluyla vücuttan atılır [68].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında çalışmalar 4 ana bölümden oluşmaktadır. Çalışmanın ilk aşamasında doksorubisin moleküllerini taşıyacak olan genişletilmiş perlitler yıkanarak içinde bulunan safsızlıklardan arındırılmıştır. İkinci aşamada doksorubisin molekülleri taşıyıcısı olan genişletilmiş perlite ikincil etkileşimlerle adsorpsiyonu sağlamıştır. Adsorpsiyon verimini hesaplamak için hazırlanan doksorubisin çözeltisinin başlangıç derişimi, adsorpsiyon işleminden sonra oluşan çözeltinin derişimi ve yıkama işleminde oluşan çözeltilerin derişimi UV-Vis Spektrofotometre (UV-1280, Shimadzu, Japonya) ile tayin edilmiştir. Üçüncü aşamada ikincil etkileşimlerde doksorubisin yüklü perlit partikülleri, poli-L-histidin ve poli-L-lizinden oluşan interpolimerik yapıların içine hapsedilmiştir. İnterpolimerik yapıların oluşumu zeta potansiyometre (Malvern, İngiltere) ve pH metre (Bante 920, Bante Instruments, Çin) cihazlarıyla belirlenmiştir. Yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisi (SERS) analizleri için raman mikroskobu (Delta Nu Raman Mikroskobu, 785 nm, Laramie, Wyoming, ABD) kullanılmıştır. Genişletilmiş perlit partikülleri, ilaç yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapılar taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiş ve her bir örneğin termal dayanıklılığını ölçmek için termogravimetrik analiz yapılmıştır. Hazırlanan polimer kaplı ve polimer kaplı olmayan doksorubisin yüklü perlitlere ait ilaç salım profillerini belirlemek için farklı pH, sıcaklık ve derişim aralıklarında ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Her bir örnek için sitotoksitesite çalışmaları yapılmıştır. Son olarak ilaç salım profilleri sıfıncı derece, birinci derece ve Korsmeyer-Peppas modelleriyle matematiksel olarak analiz edilmiştir.

3.1. Kimyasal Malzemeler

Poli-L-lizin hidroklorür (wt 15,000-30,000), poli-L-histidin (wt 5,000-25,000), sodyum asetat, sodyum dihidrojen fosfat, sodyum hidrojen fosfat, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, tris (hidroksimetil) aminometan, hidroklorik asit Sigma-Aldrich (St. Louis, ABD) firmasından temin edilmiştir. Doksorubisin hidroklorür Koçak Farma (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Genişletilmiş perlit Niğtaş, Niğde firmasından ücretsiz olarak temin edilmiştir. Salım çalışmaları için Servapor diyaliz membran (yarıçap: 29 mm) kullanılmıştır. MTT testi için kullanılan besiyeri (DMEM-F12), fetal bovine serum, %1 penisilin-streptomisin Biological Industries, İsrail'den temin edilmiştir. 3-(4,5-

Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür, Ambresco Life Science (İsrail)'den alınmıştır. Kullanılan saf suyun (deiyonize su) direnci 18 M Ω /cm'dir.



Şekil 3.1. Shimadzu UV-1280 UV-Vis Spektrofotometre.



Şekil 3.2. Bante 920 pH metre.



Şekil 3.3. Delta Nu Raman Mikroskobu (785 nm).

3.3. Deneysel Yöntemler

3.3.1 Genişletilmiş Perlitlerin Yıkanması

Genişletilmiş perlitlerin yıkanması için 1 M HCl, 1 M NaOH ve saf su kullanılmıştır. 5'er defa 1 M HCl, 1 M NaOH ve saf su ile 30'ar dakika yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra filtre kağıdı (Whatman 1PS) ile süzülmüştür. Son yıkamadan sonra 24 saat boyunca 40°C sıcaklıkta kurutulmuştur.

3.3.2. Dokсорubisin Çözeltisinin Hazırlanması

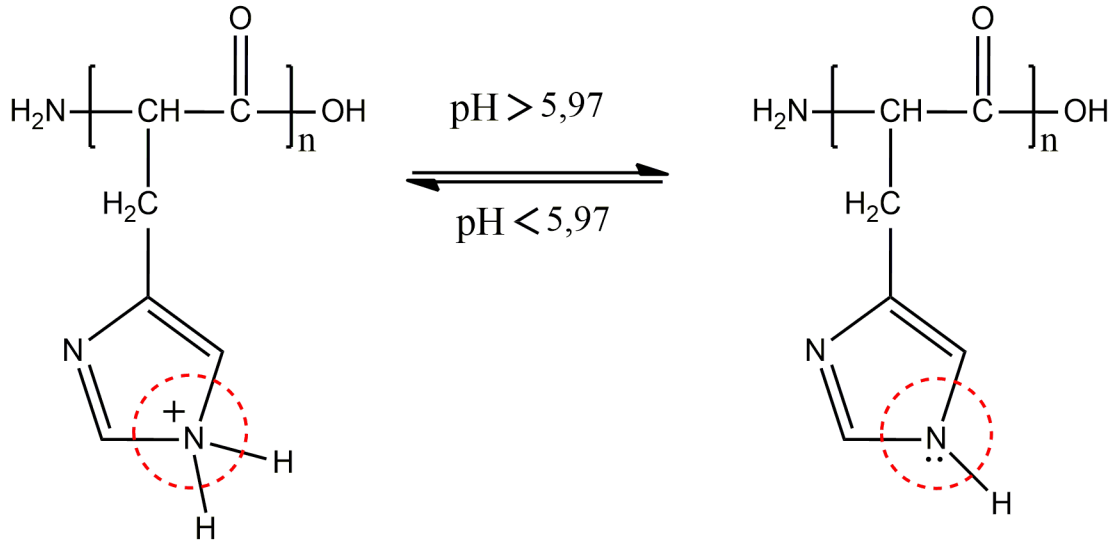
İlaç yüklü genişletilmiş perlitin hazırlanması için 5 mg dokсорubisin, 10 mL saf su içinde çözülmüştür. Ayrıca kalibrasyon grafiği elde etmek için farklı derişimlerde (1000-2 ppm) çözeltiler hazırlanarak UV-Vis spektrofotometre cihazı ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.

3.3.3. Dokсорubisin Yüklü Perlit Partiküllerinin Hazırlanması

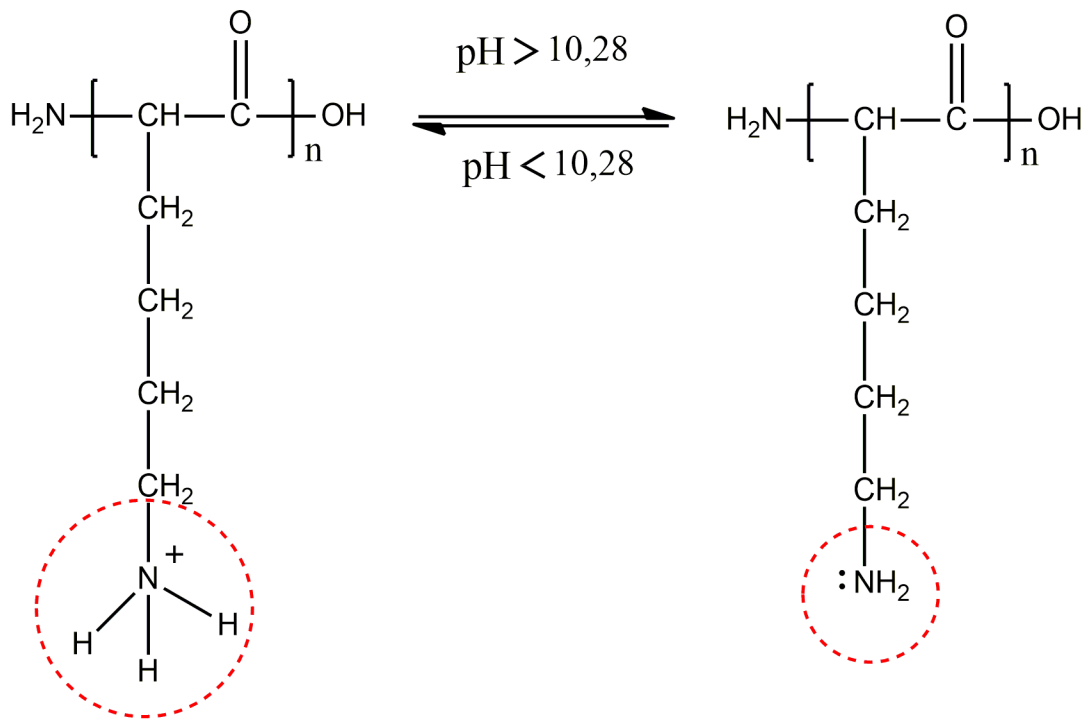
5,0 mg dokсорubisin, 10,0 mL saf su içinde çözülmüştür. İlaç yükleme veriminin hesaplanması için oluşan çözeltinin absorbans değeri UV spektrofotometre ile ölçülmüştür. Daha sonra hazırlanan dokсорubisin çözeltisi 1,0 gram genişletilmiş perlit partikülleri bulunan tüpe eklenmiştir. Oluşan karışım 24 saat boyunca rotatörde 90 rpm hızda karıştırılmıştır. 24 saat sonra karışım süzgeç kağıdı ile süzildükten sonra katı kısım için 3 defa 10 mL saf su ile yıkama işlemi yapılmıştır. İlaç yükleme veriminin hesaplanması için oluşan süzüntünün ve yıkama işleminden sonra oluşan çözeltinin absorbans değeri UV-Vis spektrofotometre ile belirlenmiştir. Süzgeç kağıdında kalan dokсорubisin yüklü perlit partikülleri etüvde 30°C’da kurutulmuştur.

3.3.4. İnterpolimerik Yapıların Sentezi

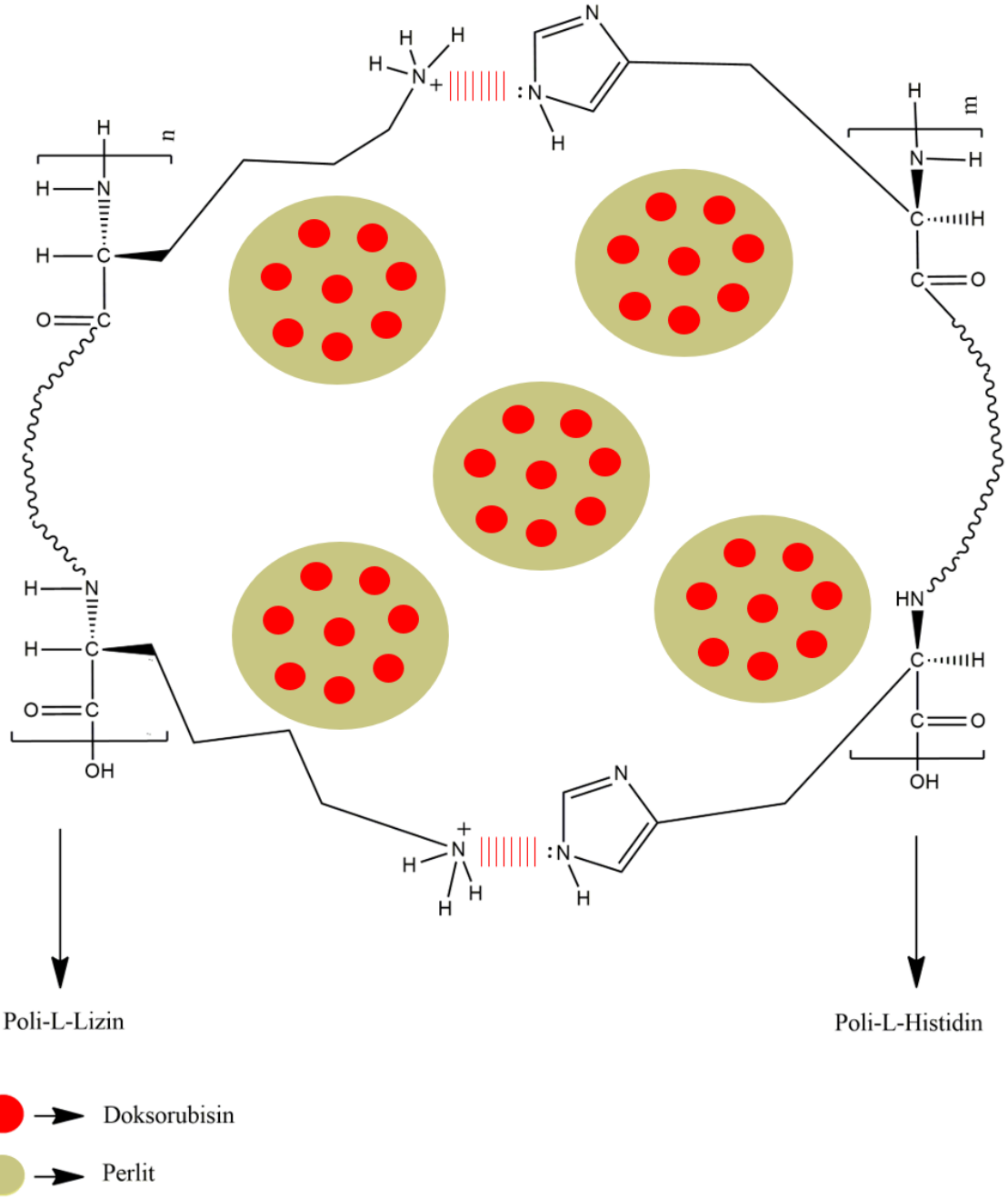
Poli-L-histidin ve poli-L-lizin molekülleri yapılarında yer alan kimyasal gruplar sebebiyle bulunduğu ortamın pH değerine göre pozitif ve negatif yüklere sahiptirler. Poli-L-histidin ve poli-L-lizin sahip oldukları pozitif ve negatif yükler arasında oluşan elektrostatik etkileşim sonucu interpolimerik yapılar oluştururlar. İnterpolimerik yapıların sentezi için ilk olarak 7mL 10 mM, pH 7,4 fosfat tamponunu 15 mL’lik falkon tüpe eklenmiş ve iletkenliği ölçülmüştür. İletkenlik ölçümü interpolimerik yapıların oluşumunu belirlemek için her bir aşamada tekrarlanmıştır. İletkenliği ölçülen fosfat tamponunun üzerine 1 mL poli-L-histidin çözeltisi (1,5 mg/mL) eklenmiştir. Oluşan çözeltinin pH ve iletkenlik değerleri tekrar ölçülmüştür. Çözelti üzerine 500 mg dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlitler eklenerek 15 dakika boyunca karıştırıldıktan sonra üzerine 1 mL poli-L-lizin çözeltisi (1,0 mg/mL) eklenip 24 saat boyunca tekrar karıştırılmıştır. 24 saat sonunda falkon tüpte bulunan karışım süzildükten sonra 3’er defa saf su ile yıkanmıştır. Oluşan süzüntü ve yıkama çözeltilerinin pH, iletkenlik ve absorbans değerleri tekrar ölçülmüştür. Katı kısım ise etüvde 30°C’da kurutulmuştur.



Şekil 3.4. Poli-L-histidinin pH değerine göre iyonlaşması.



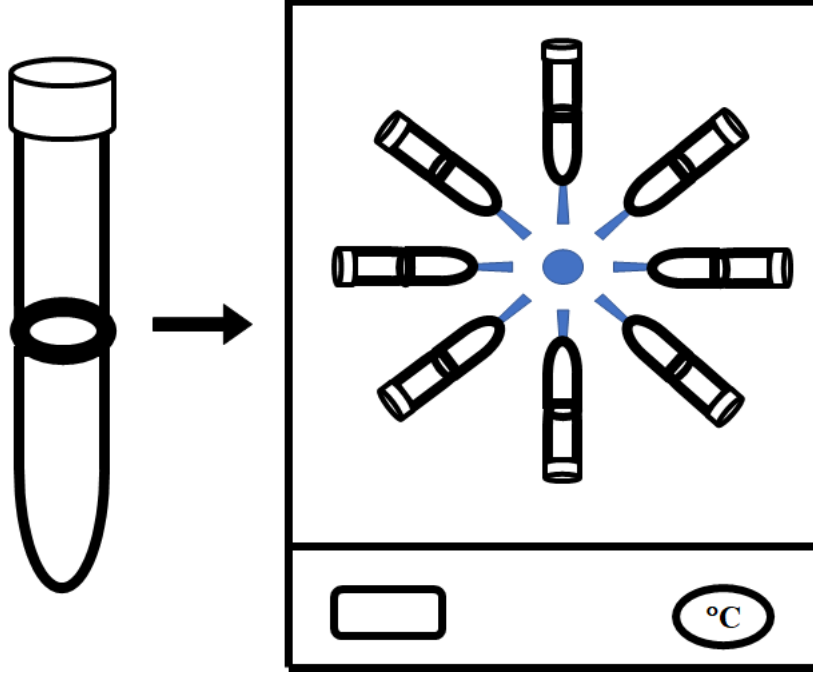
Şekil 3.5. Poli-L-lizinin pH değerine göre iyonlaşması.



Şekil 3.6. İnterpolimerik yapıların şematik gösterimi.

3.3.5. İlaç Salım Çalışmaları

Doksorubisin yüklü perlit partiküllere ve interpolimerik yapılara ait ilaç salım profillerinin belirlenmesi için farklı pH, derişim ve sıcaklıklarda salım çalışmaları yapılmıştır.



Şekil 3.7. İlaç salım tüpü ve ortamı.

3.3.5.1. İlaç Salımında Zaman Taraması

Doksorubisin yüklü perlit partiküllerde ve interpolimerik yapılarda gerçekleşen ilaç salım miktarlarının zamanla değişimini incelemek için farklı zaman aralıklarında (5-60 dakika) ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Her bir süre için interpolimerik yapı içeren ve interpolimerik yapı içermeyen doksorubisin yüklü genişletilmiş perlitler partiküllerinden 30 mg tartılarak 3 mL 10 mM, pH 7,4 fosfat tamponu içerisine konulmuştur. Belirlenen süreler sonunda iki yapıdan salınan ilaç miktarları 478 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Her bir işlem üçer defa tekrarlanmıştır.

3.3.5.2. pH'nın İlaç Salım Hızı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

pH'nın ilaç salım hızı üzerindeki etkisini belirlemek için interpolimerik yapı içeren ve interpolimerik yapı içermeyen doksorubisin yüklü genişletilmiş perlitler farklı pH aralıklarında (10,0 mM $\text{CH}_3\text{COOH-CH}_3\text{COONa}$ pH: 5,5; 10,0mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ pH: 7,2, 7,4; Tris pH: 9,0; $\text{H}_2\text{CO}_3\text{-NaHCO}_3$ pH: 11,0) salım çalışmaları yapılmıştır. İlaç yüklü örneklerden 50 mg alınarak üzerine farklı pH değerlerine sahip (5,5-11,0) tampon çözeltilerinden 8 mL eklenmiştir. Salım çalışmaları için ortam sıcaklığı 37°C sıcaklıkta sabit tutulmuştur. 24 saatte bir salım hücrelerinden numune alınarak UV-Vis

spektrofotometre ile 478 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir işlem üçer defa tekrarlanmıştır. Salım çalışmalarında Servapor diyaliz membran (yarıçap: 29 mm) kullanılmıştır.

3.3.5.3. Derişimin İlaç Salım Hızı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Derişimin ilaç salımı üzerindeki etkisini belirlemek için interpolimerik yapı içeren ve interpolimerik yapı içermeyen doksorubisin yüklü genişletilmiş perlitlerden 12,5, 25,0, 50,0, 75,0 ve 100,0 mg tartılmıştır. Tartılan örnekler pH:7,4 fosfat tamponu bulunan salım hücrelerine konulmuştur. Salım hücrelerinden 24 saatte bir örnek alınmıştır. Salım miktarını belirlemek için çözelti absorbens değeri UV-Vis spektrofotometre ile 478 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir işlem üçer defa tekrarlanmıştır.

3.3.5.4. Sıcaklığın İlaç Salım Hızı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

İlaç salım miktarlarının sıcaklıkla değişimini incelemek için 4,0°C, 25,0°C ve 37,0°C sıcaklıklarda ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Her bir sıcaklık için interpolimerik yapı içeren ve interpolimerik yapı içermeyen doksorubisin yüklü genişletilmiş perlitler partiküllerinden 30 mg tartılmıştır. Tartılan örnekler salım hücrelerine yerleştirildikten sonra üzerlerine 3 mL 10 mM, pH 7,4 fosfat tamponu ilave edilmiştir. Bu işlem üçer defa tekrarlanmıştır. Salım miktarını belirlemek için çözelti absorbens değerleri UV-Vis spektrofotometre ile 478 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bu işlemler üçer defa tekrarlanmıştır.

3.4. İlaç Yüklü Yapıların Karakterizasyonu

Doksorubisin yüklü perlit partikülleri ve interpolimerik yapıların yapısal analizi için yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu, termogravimetrik analiz ve zeta potansiyel ölçümler yapılmıştır.

3.4.1. İlaç Yükleme Veriminin Hesaplanması

Genişletilmiş perlite yüklenen ilaç miktarını bulabilmek için UV-Vis spektrofotometreden yararlanılmıştır. Doksorubisin moleküllerinin UV-Vis

spektroskopisinde gösterdiği karakterize dalga boyunun belirlenmesi için dalga boyu taraması yapılmıştır. Yapılan tarama sonucu doksorubisin moleküllerinin 478 nm’de en yüksek absorbans değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Literatürde doksorubisin moleküllerinin 478-480 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değeri verdiği belirtilmiştir [69]. İlaç yükleme verimini belirlemek amacıyla genişletilmiş perlite ilaç yüklemek için hazırlanan doksorubisin çözeltisinin absorbans değeri UV-Vis spektrofotometre ile 478 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hazırlanan doksorubisin çözeltisi genişletilmiş perlite eklendikten sonra oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Genişletilmiş perlit içeren doksorubisin çözeltisi genişletilmiş perlit partiküllerinden ayrıştırılması için süzümüştür. İlaç yüklü genişletilmiş perlitler üçer defa saf 10 mL saf su ile yıkanmıştır. Oluşan süzüntü ve yıkama çözeltilerinin absorbans değeri Uv-Vis spektrofotometre ile 478 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri doksorubisin çözeltisi için hazırlanan kalibrasyon grafiği ile derişim değerlerine çevrilmiştir. Elde edilen derişim miktarlarıyla ilaç yükleme verimi hesaplanmıştır.

3.4.2. Yüzey Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Analizleri

Raman spektrofotometresi (Delta Nu Raman Mikroskobu, 785 nm) ile genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik kompleksler için yapısal analizleri gerçekleştirilmiştir. SERS uygulaması ile karakterize edilecek örneğin sinyal şiddetlerini arttırmak için plazmonik etki oluşturan metal nanoyapılar kullanılmıştır. Burada metal nanoyapı olarak gümüş nanopartiküller (AgNP) sentezlenip kullanılmıştır. AgNP sentezi için Leopold yöntemi tercih edilmiş, indirgeyici ajan olarak hidroksilamin hidroklorürün ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) kullanılmıştır [70]. İlk olarak 90 mL $3,0\times 10^{-3}$ M NaOH çözeltisi beherde hazırlanmıştır. Hazırlanan NaOH çözeltisi üzerine hidroksilamin hidroklorürün’den $1,50\times 10^{-4}$ mol alınarak içerisine eklenmiştir. Çözelti karıştırıldıktan sonra 1×10^{-2} M AgNO_3 çözeltisinden 10 mL alınarak beherdeki karışıma ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım açık kahverengi olana kadar karıştırılmıştır. Çözelti renginin açık kahverengi oluşu AgNP’lerinin oluştuğunun kanıtıdır. Sentezlenen AgNP’ler ışık olmayan bir yerde 12 saat boyunca bekletilmiştir. SERS analizi için 5 mg ilaç yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapılar tartılmıştır. Tartılan örnekler ince katmanlı kromatografi kağıdına (TLC) yerleştirilmiştir. Her bir numunenin üzerine sentezlenen AgNP’lerden 100 μL damlatılmıştır. AgNP damlatılan numunelerin kuruması

için 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler kurutulduktan sonra raman mikroskobu ile 20X mercek ve 20 saniye 100 mW lazer gücü kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

3.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

İlaç yüklü genişletilmiş perlit, genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılara ait morfolojik yapı analizleri taramalı elektron mikroskobu (QUANTA 400F Field Emission SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Termogravimetrik Analiz (TGA)

İnterpolimerik yapı, ilaç yüklü olan ve ilaç yüklü olmayan genişletilmiş perlitin termal kararlılıklarını belirlemek amacıyla termogravimetrik analiz yapılmıştır. Ölçümler 50°C -550°C sıcaklıkları arasında, hava ve azot atmosferinde 10°C/d hız ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.5. Zeta Potansiyel Analizleri

Sentezlenen interpolimerik yapılar, ilaç yüklü perlit ve ilaç yüklü olmayan genişletilmiş perlit için zeta-yüzey yükü analizleri yapılmıştır. Ölçümler fosfat tamponu (pH:7,4) ortamında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

3.5. Sitotoksite Çalışmaları

Genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılara ait sitotoksite değerlendirilmesi için MTT Test yapılmıştır. Tüm örnekler 6 mg /mL olacak şekilde hücre kültürü besiyerinde homojenize edilerek 37°C de, %5 CO₂'li ortamda 24 saat ekstraksiyon için inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüm örnek solüsyonları 0,22 µm'lik filtreden geçirilip üzerine %10 fetal bovine serum ve %1 penisilin-streptomisin ilavesi yapılarak teste hazır hale getirilmiştir. 96 kuyucuklu plakaların her kuyusuna 1x10⁴ L929 fibroblast hücre hattı ekilmiştir. Hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra kuyulardaki vasat besiyeri atılıp hazırlanan örnekler 6 mg/mL derişimde hücrelerin üzerine her kuyuda 100 µL olacak şekilde uygulanmıştır. Yapılan işlem 6 tekrarlı olarak

çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak ZDEC (%1 çinko dietilditiokarbamat içeren poliüretan film), negatif kontrol olarak sadece besiyeri içeren hücreler ve yüksek yoğunluklu polietilen film kullanılmıştır. Uygulamanın ardından 96 kuyucuklu plaka 37°C de, %5 CO₂'li ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 100 µL besiyeri ve 10 µL MTT ((3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyumbromür), Ambresco life science, İsrail) çözeltisi ilave edildi ve 4 saat karanlıkta 37°C de %5 CO₂ bulunan ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından her kuyuya 150 µL DMSO eklenerek yavaşça pipetlenmiş ve mikropilaka okuyuculu spektrofotometre (Allsheng AMR-100, Çin) ile 570 nm de ölçüm yapılmıştır. Sadece besiyeri içeren kontrol grupları baz alınarak Denklem 3.1.'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = (100 \times OD_{570e}) / OD_{570b} \quad 3.1.$$

OD_{570e}: Numunenin optik yoğunluğunun değeri,

OD_{570b}: Kontrol grubunun optik yoğunluğu

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez kapsamında yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar 5 temel başlık altında özetlenmiştir.

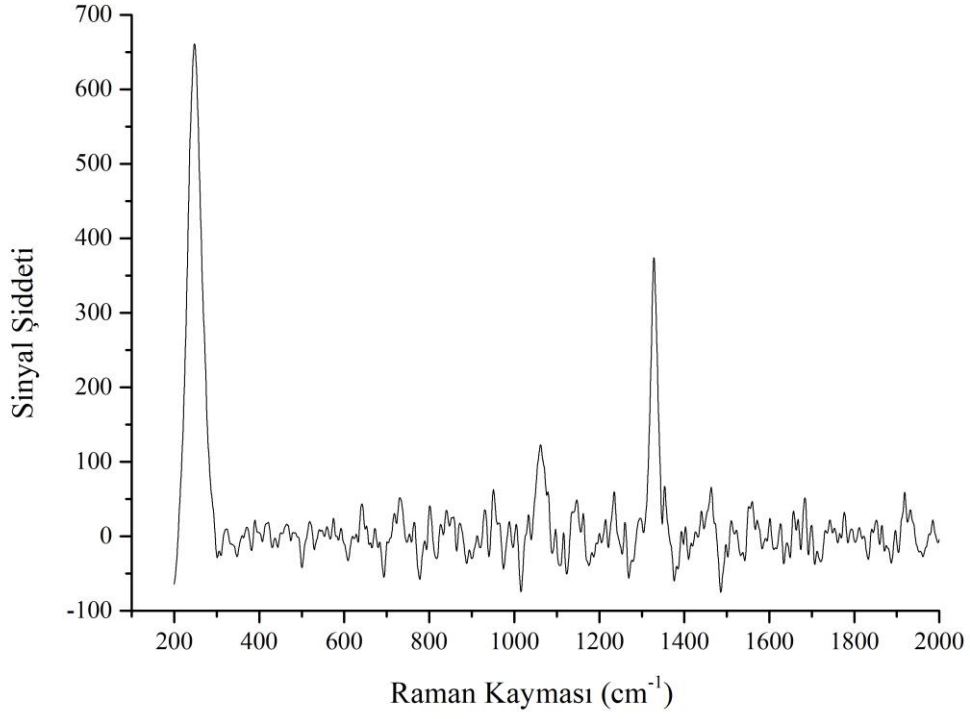
1. İlaç yüklü genişletilmiş perlitlerin hazırlanması ve karakterizasyonu
2. İlaç yüklü interpolimerik yapıların sentezi ve karakterizasyonu
3. Genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü perlit ve interpolimerik yapılarda farklı pH, derişim ve sıcaklıklarda ilaç salım çalışmalarının incelenmesi
4. Genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü perlit ve interpolimerik yapılarda elde edilen salım profillerinin matematiksel modellemelerle açıklanması
5. İlaç yüklü yapılar için sitotoksisite çalışmalarının incelenmesi

4.1. Karakterizasyon Çalışmaları

Genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü perlit ve interpolimerik yapılar için yapılan karakterizasyon çalışmaları taramalı elektron mikroskobu (SEM), zeta potansiyel ölçümü ve termogravimetrik analiz (TGA) ile yapılmıştır. Ayrıca genişletilmiş perlit , ilaç yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapıların yapısal analizi için yüzey güçlendirilmiş raman spektroskopisi (SERS) kullanılmıştır.

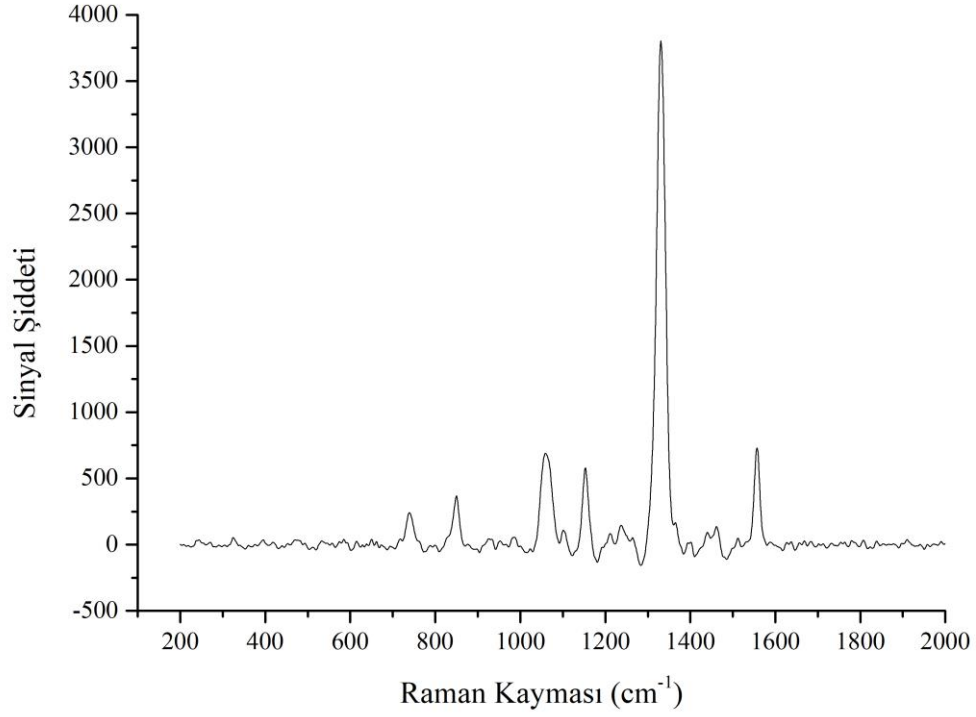
4.1.1. Yüzey Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS) Analiz Sonuçları

Genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinin ve interpolimerik yapıların SERS spektrumları Şekil 4.1., Şekil 4.2., ve Şekil 4.3.'de verilmiştir.



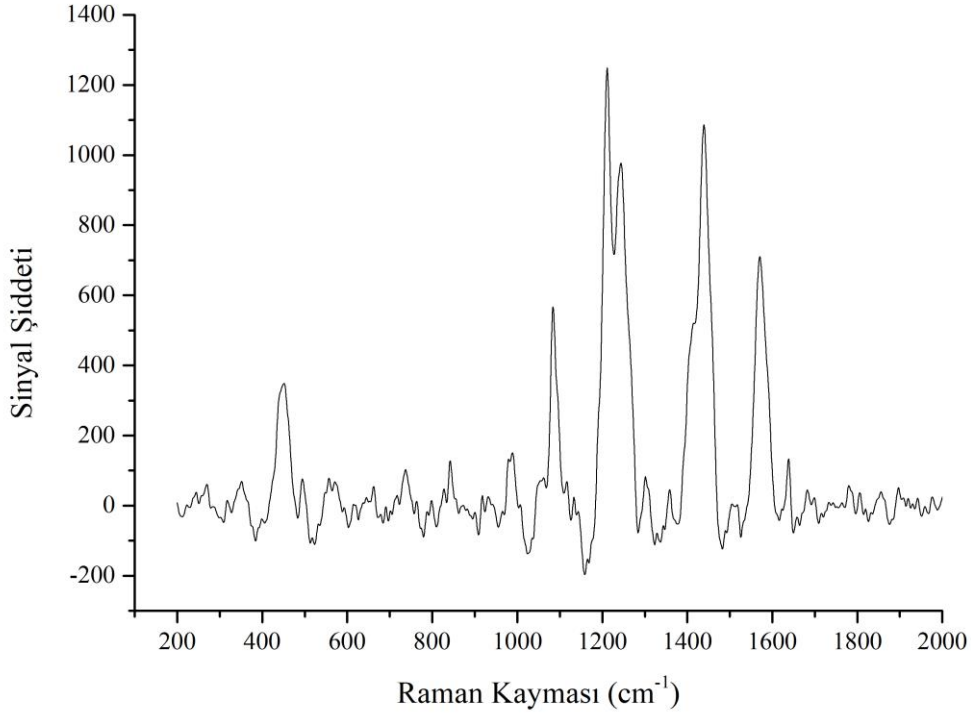
Şekil 4.1. Genişletilmiş perlite ait SERS spektrumu.

Şekil 4.1.'de yer alan 1000-1400 cm^{-1} arasında görülen pikler silisyum oksit moleküllerine ait asimetrik titreşimden kaynaklanmaktadır [71]. 200-300 cm^{-1} görülen pikler ise AgNP'lere ait piklerdir [72].



Şekil 4.2. İlaç yüklü genişletilmiş perlite ait SERS spektrumu.

Şekil 4.2.'da ilaç yüklü genişletilmiş partiküllere ait SERS spektrumunda yaklaşık 1400-1600 cm⁻¹ arasında görülen pikler doksorubisin moleküllerinde bulunan halkasal yapılara aittir. 1150-1300 cm⁻¹ arası pikler C-O, C-O-H ve C-H titreşimlerine ait piklerdir. 700-900 cm⁻¹ arasında bulunan pikler C-H, halkasal titreşimler sonucu oluşmuştur [73]. Yaklaşık 1350 cm⁻¹'de yer alan pik genişletilmiş perlit partiküllerine ait silisyum oksit asimetric titreşimlerinden kaynaklanmaktadır.



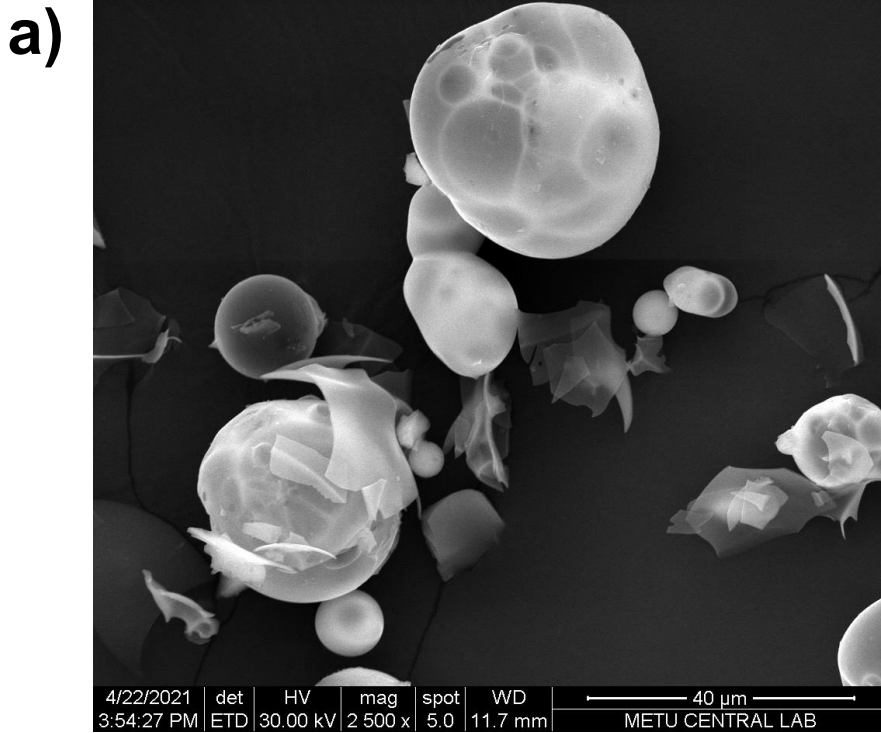
Şekil 4.3. İnterpolimerik yapılara ait SERS spektrumu

Bazı biyopolimerler üzerinde bulunan karboksil ve amin grupları sebebiyle farklı pKa değerlerinde sahiptirler. Farklı pKa değerlerine sahip biyopolimerler bulunduğu ortamın pH değerine göre pozitif, negatif yüklü veya nötr halde bulunurlar. Bulduğu ortamın pH değeri pKa değerinden küçük ise yapı pozitif yüklü hale gelirken; pH'nın pKa değerinden büyük olması durumunda yapı negatif veya nötr halde bulunur. Poli-L-histidine bulunan imidazol halkasının pKa değeri 5,97; poli-L-lizinde bulunan R-grubunun pKa değeri ise 10,28'dir. İnterpolimerik yapılar poli-L-histidine bulunan imidazol halkasının nötr, poli-L-lizinin R-grubunda bulunan amin grubunun ise pozitif yüklü hale getirilerek pozitif yüklü imidazol halkası ile üzerinde ortaklaşmamış elektron çifti bulunan R-grubu arasındaki elektrostatik etkileşimler ile oluşmuştur. Nötr halde bulunan poli-L-histidine ait C=C titreşimleri 1570-1575 cm⁻¹'de oluşmaktadır. Şekil 4.3.'de interpolimerik yapılara ait SERS spektrumunda görülen 1571 cm⁻¹'de ki pik poli-L-histidine bulunan nötr haldeki imidazol halkasına ait C=C titreşimleri sebebiyle oluşmuştur. Bu titreşim piki ile interpolimerik yapıda bulunan poli-L-histidine ait imidazol halkasının nötr halde bulunduğu söylenebilir. 1420-1450 cm⁻¹ arasında yer alan pik CH₂ gerilmelerine ait titreşim pikidir. Nötr halde bulunan poli-L-lizindeki amit III'e

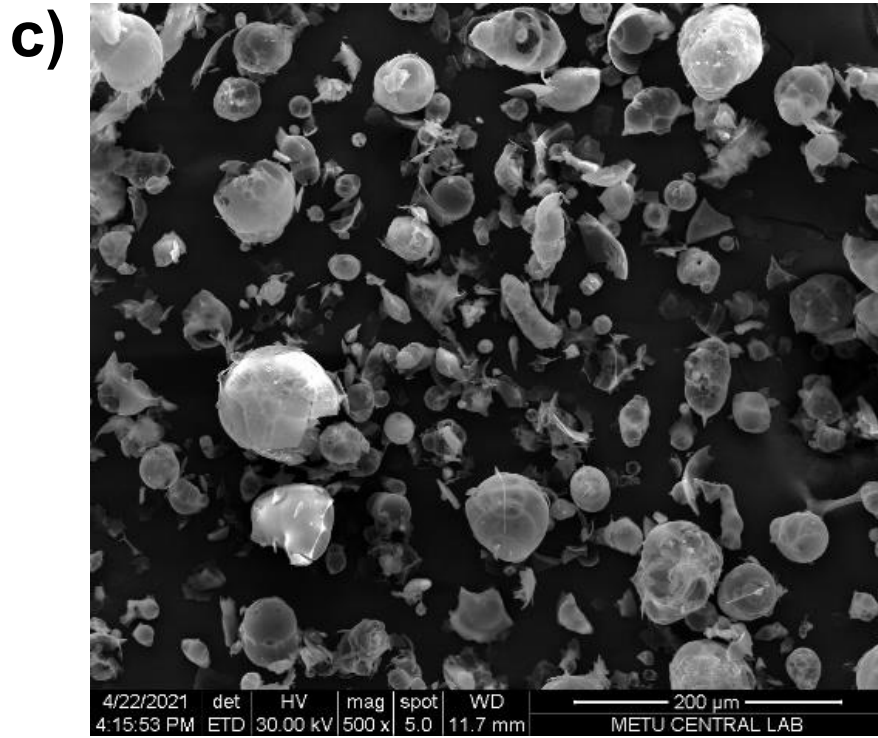
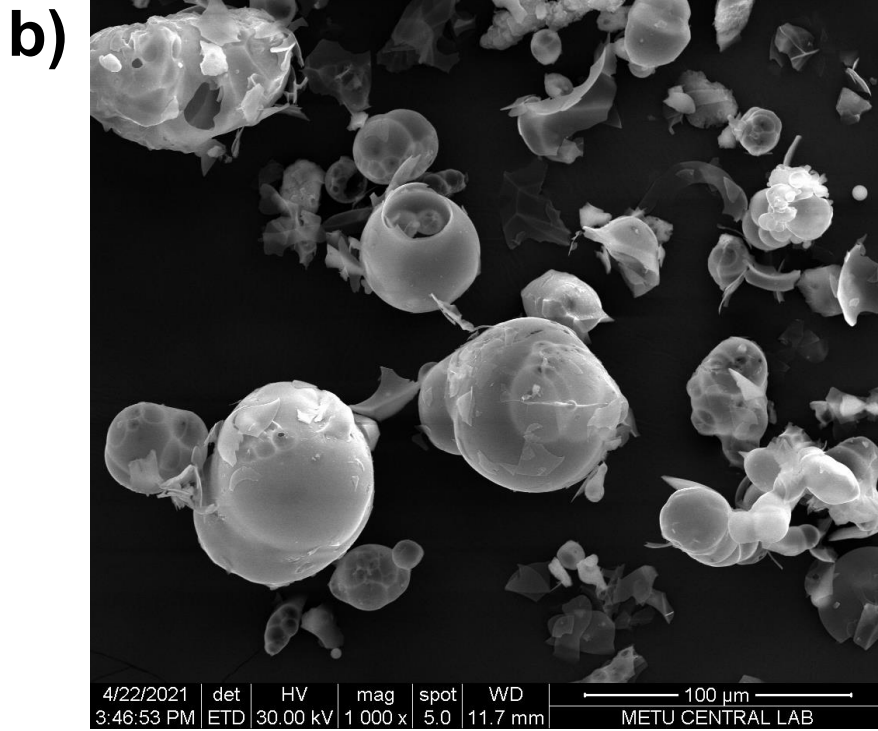
ait titreşim pikleri raman spektrumunda gözükmez iken pozitif yüke sahip poli-L-lizine ait amit III'e ait titreşim pikleri 1210-1250 cm^{-1} arasında görülmektedir. Şekil 4.3.deki raman spektrumuna bakıldığında 1210-1244'te yer alan keskin pikler pozitif yüklü poli-L-lizinde bulunan amit III'e aittir. Bu pikler interpolimerik yapıda bulunan poli-L-lizinin pozitif yüke sahip olduğunun kanıtıdır. 1050-1100 cm^{-1} arasında olan pikler C-C arasındaki titreşim piklerine aittir. 1300-1350 cm^{-1} arasındaki pikler genişletilmiş perlit partiküllerine ait silisyum oksit moleküllerine ait titreşimlerden kaynaklanmaktadır. 400-500 cm^{-1} arasında olan pikler ise doksorubisin moleküllerinde bulunan fenil halkasına sahip titreşim pikleridir [74, 75].

4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Sonuçları

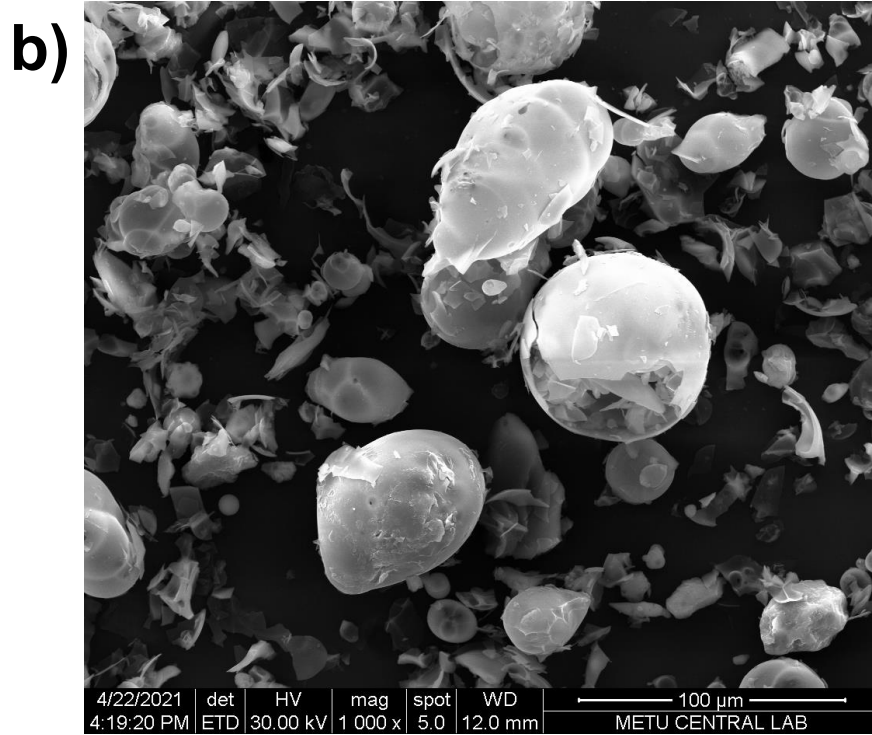
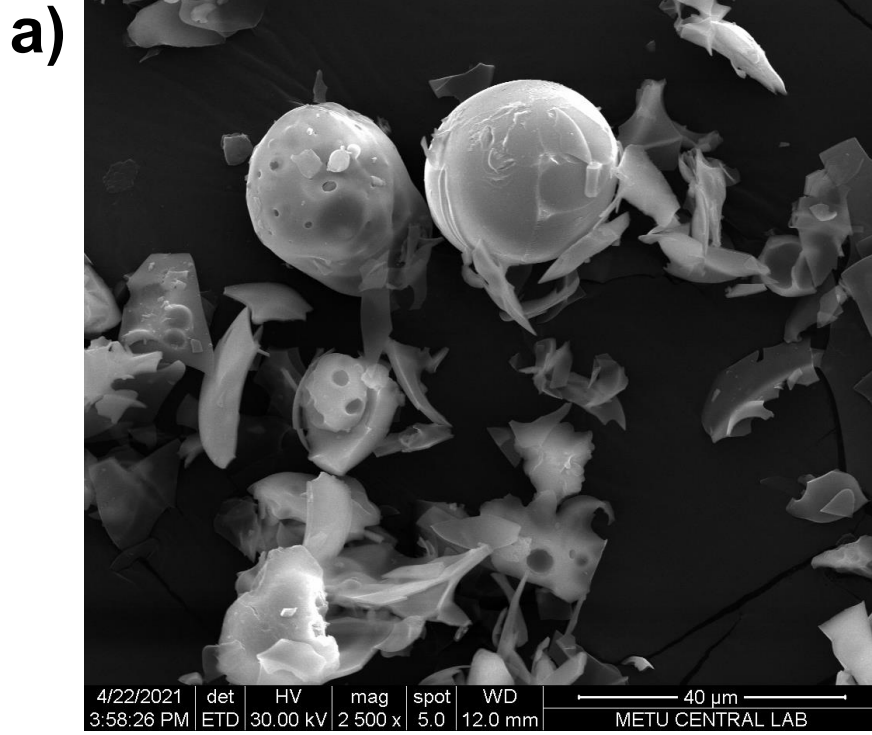
Genişletilmiş perlit, ilaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinin ve interpolimerik yapıların SEM görüntüleri Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6. ile gösterilmektedir.



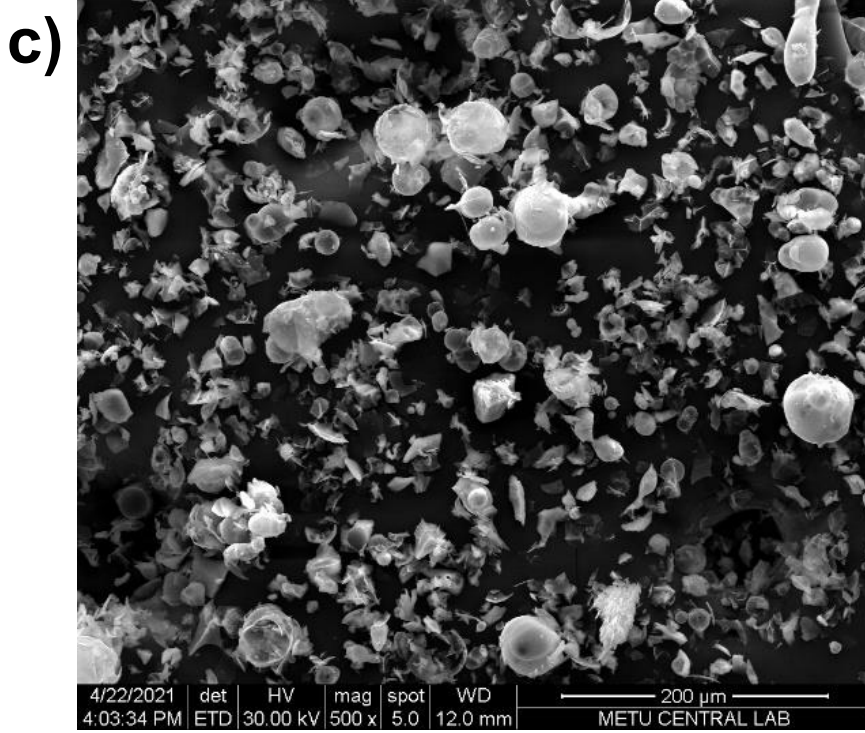
Şekil 4.4. Genişletilmiş perlit partiküllerine ait SEM görüntüleri. a) Genişletilmiş perlit partikülleri 2500X, b) Genişletilmiş perlit partikülleri 1000X, c) Genişletilmiş perlit partikülleri 500X.



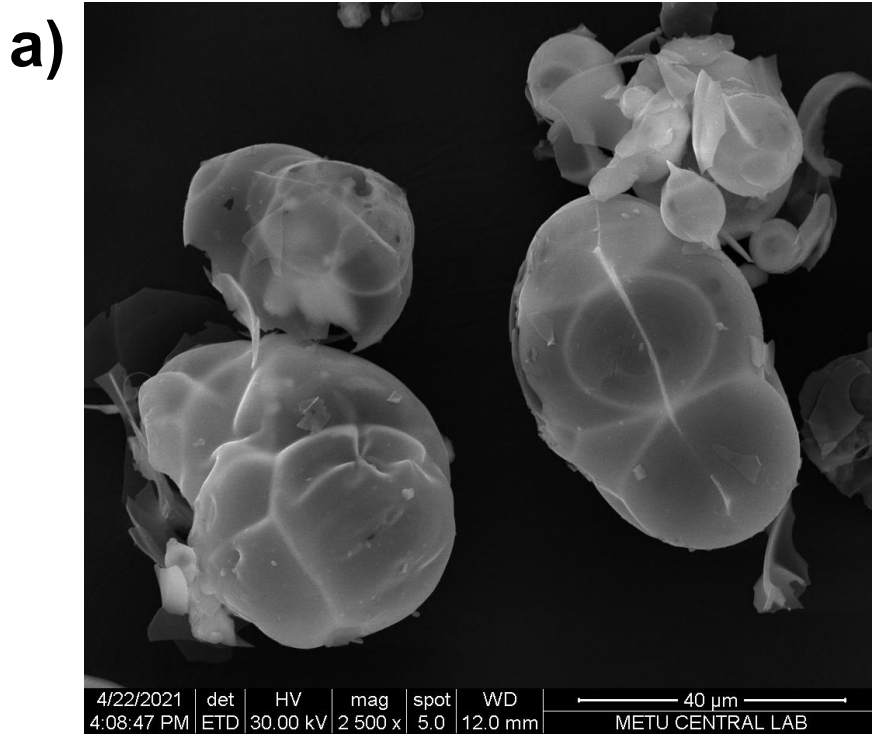
Şekil 4.4. (devamı)



Şekil 4.5. Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partiküllerine ait SEM görüntüleri a) Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri 2500X, b) Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri 1000X, c) Dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri 500X.

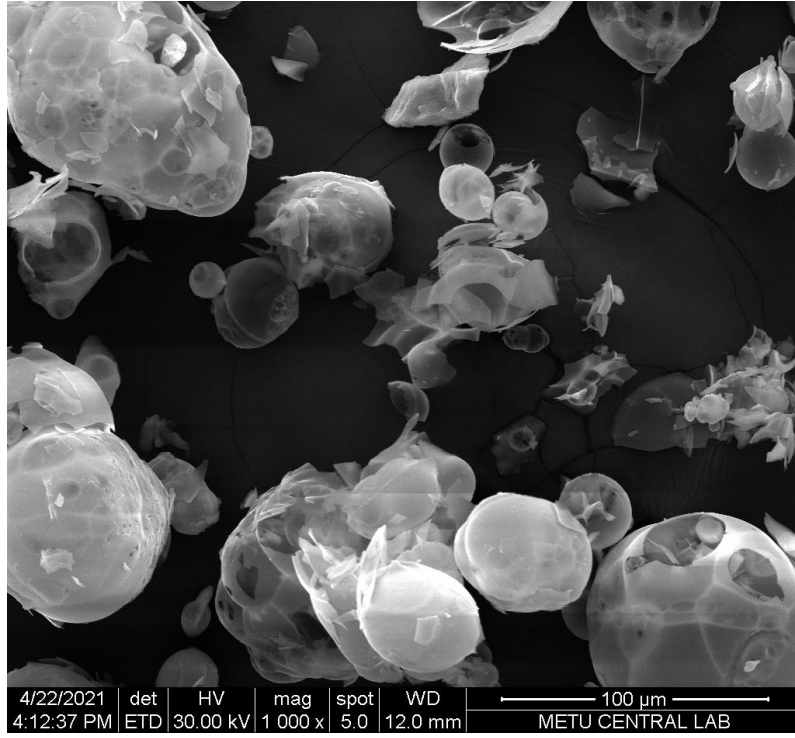


Şekil 4.5. (devamı)

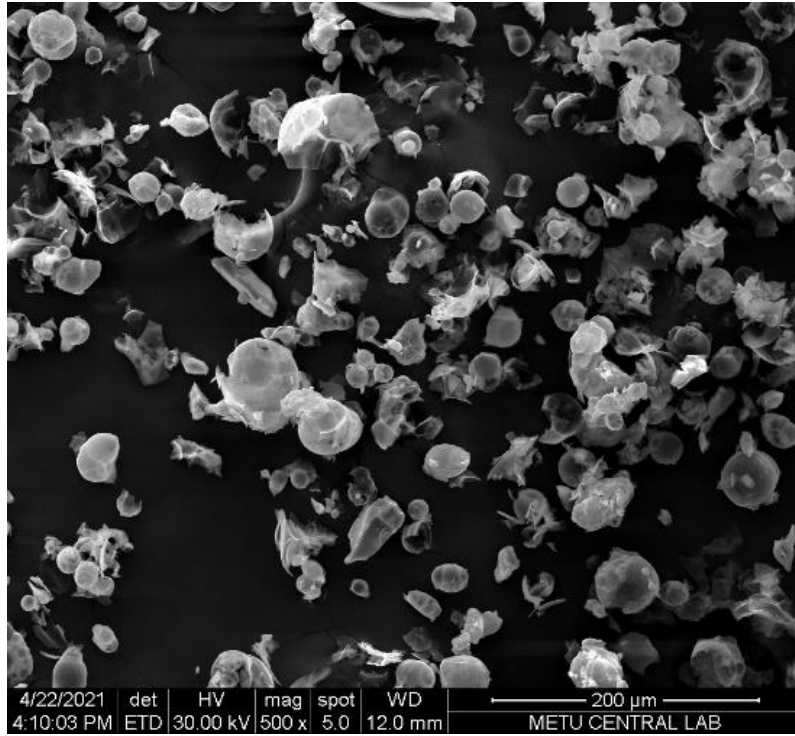


Şekil 4.6. İnterpolimerik yapılara ait SEM görüntüleri a) İnterpolimerik yapılar 2500X, b) İnterpolimerik yapılar 1000X, c) İnterpolimerik yapılar 500X.

b)



c)

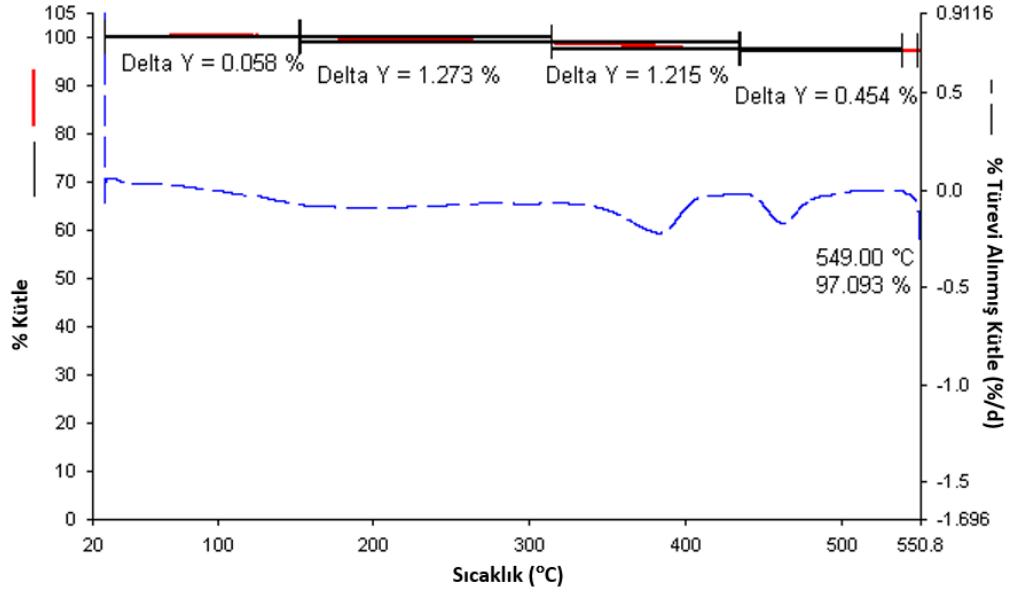


Şekil 4.6. (devamı)

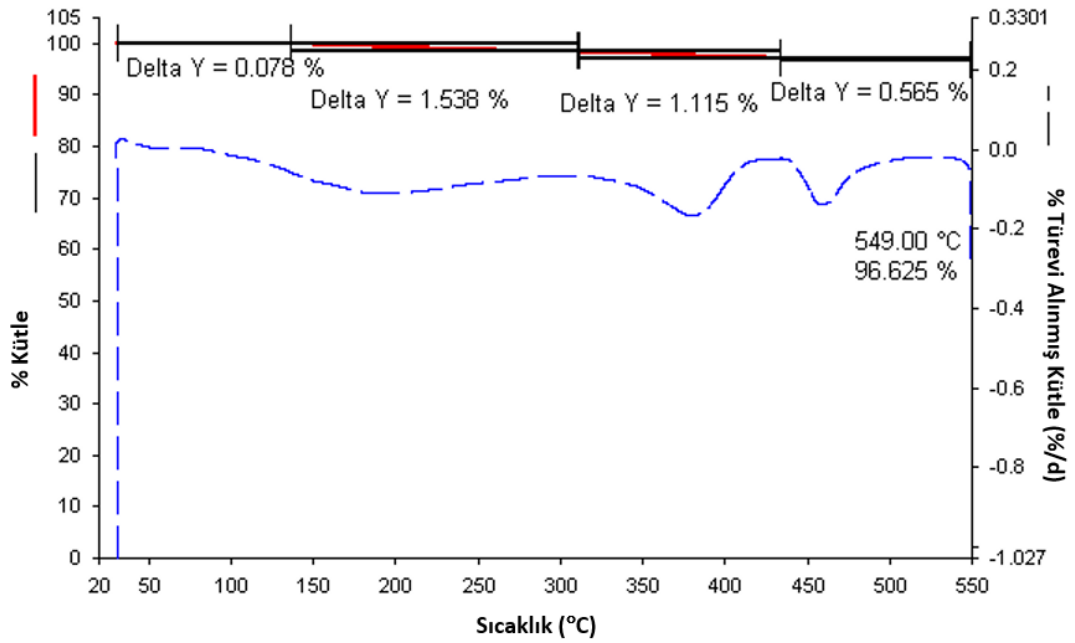
Perlitin partiküllerinin yüksek sıcaklıkta ve hızlı bir şekilde ısıtılması sonucu patlatılarak oluşan genişletilmiş perlit partiküllerinin yüzey alanı oldukça büyüktür. Şekil 4.4.'de yer alan genişletilmiş perlit partiküllerine ait SEM görüntülerinde perlit partiküllerinin hızlı bir şekilde ısıtılması sonucu içinde boşluk bulunduran küre şekline sahip genişletilmiş perlit partikülleri görülmektedir. İçi boş olan küresel yapıdaki genişletilmiş perlit partikülleri sahip olduğu geometrik yapıdan dolayı yüksek adsorpsiyon ve ilaç yükleme kapasitesine sahiptir. Küresel yapı dışında bulunan partiküller ise perlit partiküllerinin ısıtılarak patlatılması ile küresel yapının bozulması sonucu oluşan parçacıklardır. Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'da ilaç yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapılara ait SEM görüntüleri yer almaktadır. Bu görüntüler Şekil 4.4.'de bulunan genişletilmiş perlit partiküllerine ait görüntüler ile karşılaştırıldığında genişletilmiş perlit partiküllerin geometrik yapısında, ilaç adsorpsiyonu ve interpolimerik yapıların oluşumu kaynaklı bir yüzey deformasyonu oluşmadığını görülmüştür.

4.1.3. Termogravimetrik Analiz Sonuçları

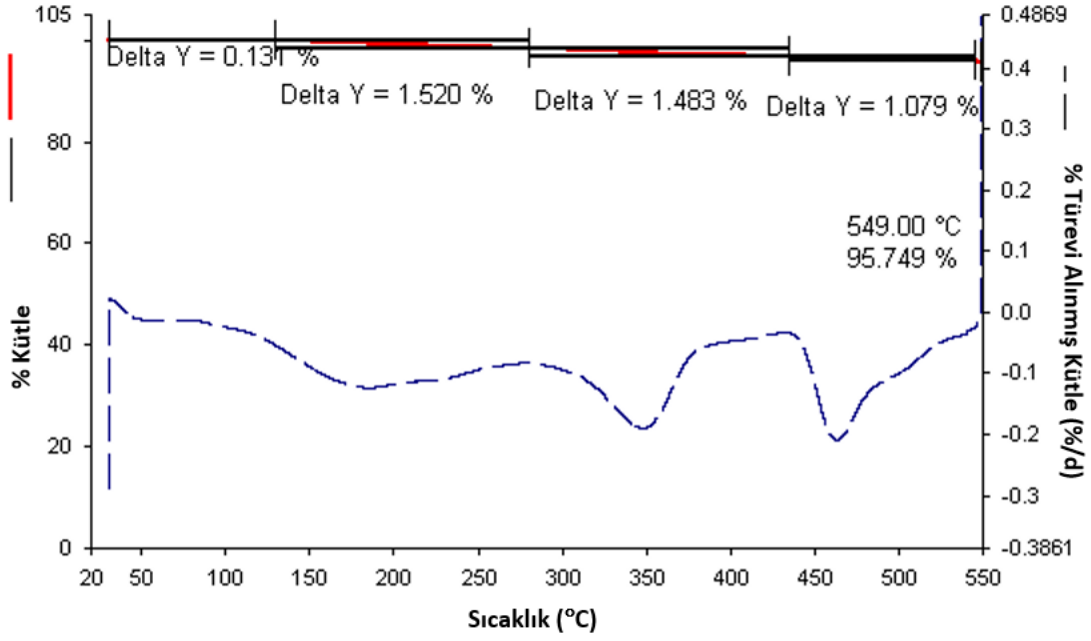
Genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapıların termal kararlılığı termal gravimetrik analiz ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.7., 4.8., 4.9. ve 4.10.'de verilmiştir.



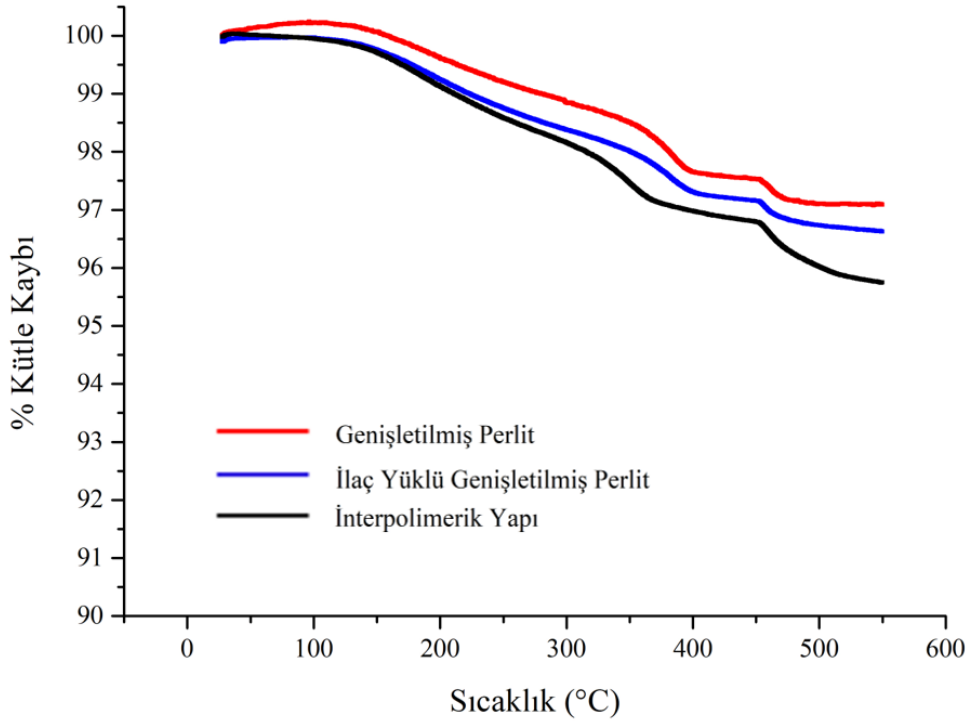
Şekil 4.7. Genişletilmiş perlit partiküllerine ait termogram.



Şekil 4.8. İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerine ait termogram.



Şekil 4.9. İnterpolimerik yapılara ait termogram.



Şekil 4.10. Genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılarına ait termal analiz sonuçları.

Şekil 4.7.' de gösterilen genişletilmiş perlit partiküllerine ait termogramda 100-200°C aralığında görülen kütle kaybı yapıda bulunan hidratize olmuş su moleküllerinden kaynaklanmaktadır. 550°C'a kadar ısıtıldıktan sonra oluşan yaklaşık %3'lük kayıp genişletilmiş perlitin termal kararlı olduğunun göstergesidir.

Şekil 4.8.'de gösterilen ilaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerine ait termogramda görülen 100-300°C aralığında kütle kaybı genişletilmiş perlit partiküllerinde bulunan hidratize su molekülleri ve yüklü ilaç olan doksorubisinin sahip olduğu amin gruplarının yapıdan ayrılması ve halkalı yapıların bozulmasından kaynaklanmaktadır. İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinin 550°C'a kadar ısıtıldıktan sonra yaklaşık %3,5'lik kütle kaybı ile doksorubisin moleküllerinin genişletilmiş perlitin termal dayanıklılığını etkilemediği belirlenmiştir.

Şekil 4.9.'da yer alan interpolimerik yapılara ait olan termogramda yaklaşık %4,5'lik kütle kaybı olduğu görülmektedir. 100-300°C aralığında oluşan kütle kaybı genişletilmiş perlit partiküllerinde yer alan su molekülleri, yapıda yüklü bulunan doksorubisin moleküllerine ait amin gruplarının uzaklaşması, halkalı yapıların bozulması ve interpolimerik yapıları oluşturan poli-L-histidine yer alan imidazol halkalarının bozulması, poli-L-lizinde amin ve karboksilik grupların yapıdan uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. 550°C'a kadar ısıtıldıktan sonra geride kalan %95,75'lik kütle doksorubisin, poli-L-histidin ve poli-L-lizinin genişletilmiş perlitin termal kararlılığını etkilemediğinin göstergesidir.

Şekil 4.10. da ise genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapıların 550°C'a kadar ısıtılması sonucu oluşan termogravimetrik analiz sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

4.1.4. Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları

Genişletilmiş perlit partikülleri, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapıların zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Genişletilmiş perlit partikülleri, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapıları ait zeta potansiyel ölçüm sonuçları.

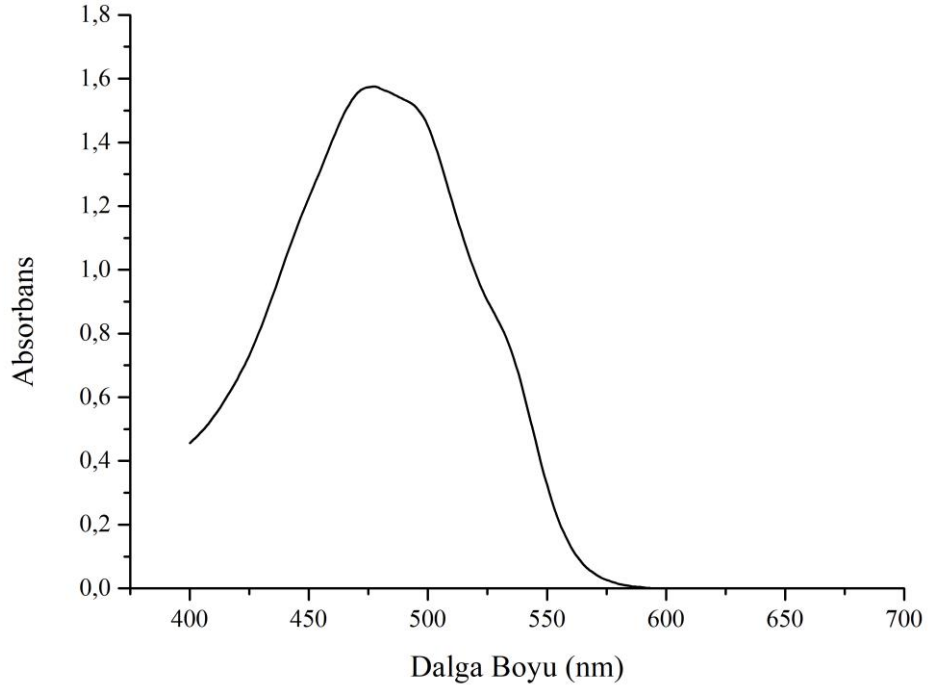
Materyal	Zeta Potansiyel (mV)
Genişletilmiş Perlit	-0,126
Dokсорubisin Yüklü Genişletilmiş Perlit	-0,032
İnterpolimerik Yapı	0,071

Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi genişletilmiş perlit partiküllerinin zeta potansiyeli -0,126 mV iken dokсорubisin yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinin zeta potansiyeli -0,032 mV olarak ölçülmüştür. Bunun sebebi dokсорubisin üzerinde bulunan pozitif değere sahip amin gruplarıdır. Poli-L-histidinin R-grubunda yer alan amin grupları sahip olduğu pKa değeri sebebiyle üzerinde elektron çiftleri bulundurur. Poli-L-lizin de ise R-grubunda bulunan amin grupları sahip olduğu pKa değeri sebebiyle pozitif yüklüdür. Poli-L-histidin ve poli-L-lizinden oluşan interpolimerik yapıların zeta potansiyeli ise 0,071 mV olarak ölçülmüştür. Buradaki sebep ise poli-L-lizinde yer alan pozitif yüklü amin gruplarının negatif yüklü gruplar ile arasında oluşan elektrostatik etkileşimler olarak açıklanabilir.

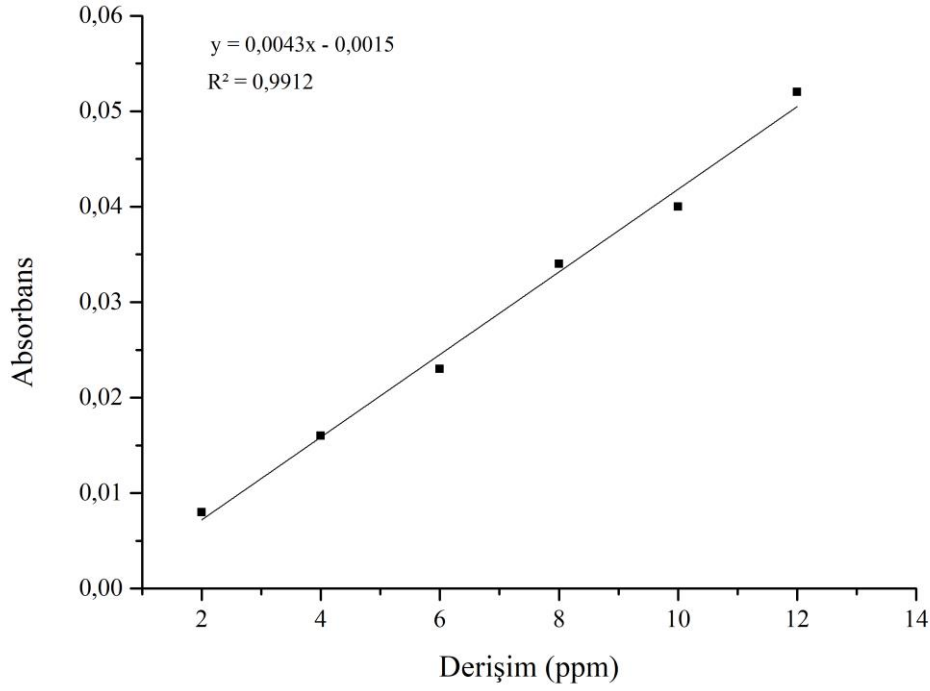
4.2. İlaç Yükleme Verimi

Genişletilmiş perlite yüklü olan dokсорubisin miktarını bulmak için ilaç yüklü yapıların hazırlanışı esnasında, dokсорubisin çözeltisinin adsorpsiyon öncesi, adsorpsiyon sonrası ve yıkama çözeltilerinin derişimi Uv spektrofotometre ile 478 nm 'de ölçülmüştür. İlaç yükleme verimi, başlangıçta konulan dokсорubisin miktarı ve ilaç yüklü yapıların

hazırlanış sonrası oluşan çözeltideki miktarı belirlenerek hesaplanmıştır. İlaç yükleme verimi %97,18 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Doksorubisin molekülüne ait UV-Vis Spektrumu.



Şekil 4.12. Doksorubisin çözeltisine ait kalibrasyon grafiği.

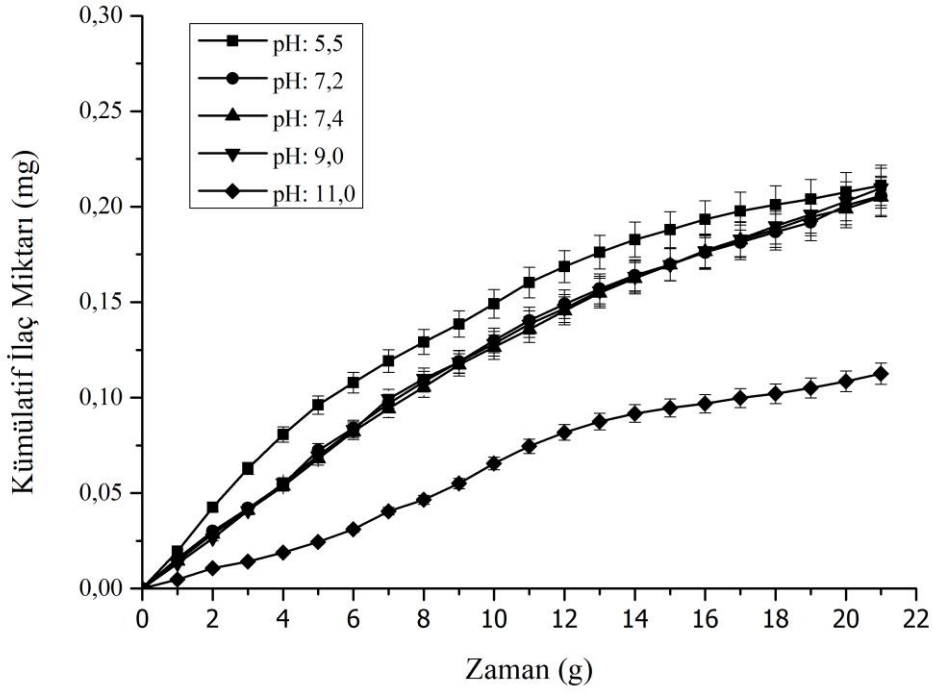
4.3. İlaç Salım Çalışmaları

İlaç salım çalışmaları kapsamında doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılar için farklı pH, derişim ve sıcaklıklarda ilaç salım profilleri incelenmiştir.

4.3.1. Genişletilmiş Perlit Partikülleri İçin İlaç Salım Davranışının İncelenmesi

4.3.1.1. pH'nın İlaç Salım Hızına Etkisi

pH'nın ilaç salım üzerindeki etkisini belirlemek için doksorubisin yüklü genişletilmiş perlitlerde farklı pH'larda (pH:5,5; 7,2; 7,4; 9,0; 11,0) ve 21 gün boyunca salım çalışmaları yapılmıştır.

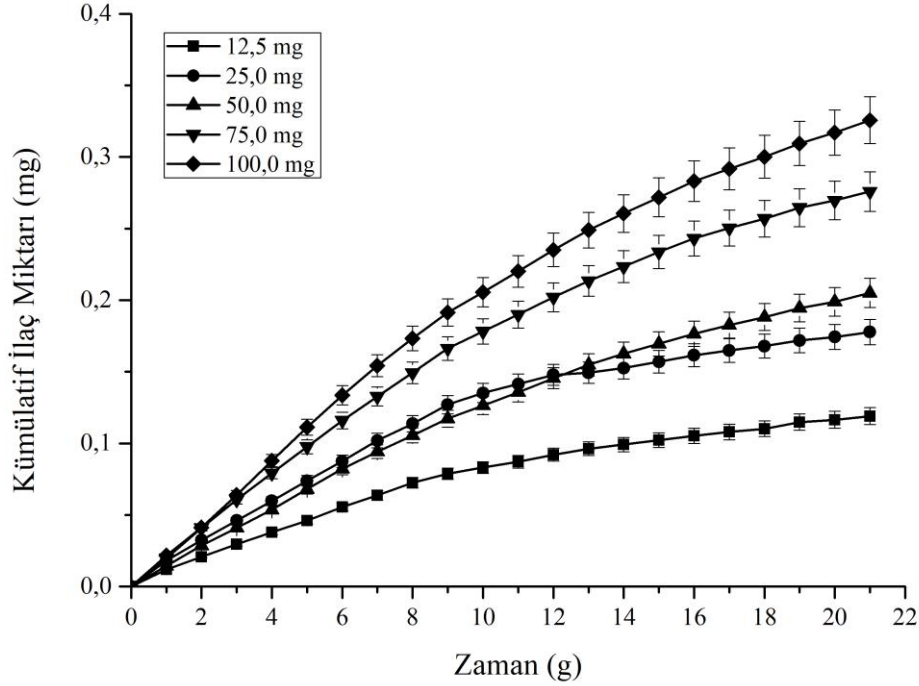


Şekil 4.13. İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinde ilaç salım profilinin pH duyarlılıklarının incelenmesi. Partikül miktarı: 50 mg; Sıcaklık: 37°C.

Yapılan salım çalışması sonucunda en yüksek salım miktarı pH:5,5 de gerçekleştiği görülmüştür. Salımın altıncı gününe kadar salım hızı yüksek iken 16. günden sonra bu hızın azaldığı fark edilmiştir. Toplam salınan ilaç miktarının pH:7,2, 7,4 ve 9,0'da neredeyse aynı olduğu gözlemlenmiştir. İlaç salım hızı on dördüncü güne kadar yüksek iken sonraki zamanlarda salım hızının azaldığı fark edilmiştir. En az salımın ise pH:11,0'de gerçekleştiği ve pH:11,0'de doksorubisin molekülünün bozulduğu görülmüştür. pH:11,0'da hazırlanan doksorubisin moleküllerine ait UV-Vis spektrumu Şekil 4.50. ve Şekil 4.51. ile gösterilmiştir. Hazırlanan çözeltinin UV-Vis spektrumu Şekil 4.50.'de görüldüğü gibi doksorubisin molekülünün 478-480 nm arası karakteristik piki 552 nm'de çıkmıştır. Şekil 4.51.'de görüldüğü gibi pH:11,0'da hazırlanan doksorubisin çözeltisinin Uv-Vis spektrum taraması çözelti hazırlandıktan 24 saat sonra tekrar yapılıncı 300-1000 nm dalga boyu arasında pik vermediği görülmüştür.

4.3.1.2. Derişimin İlaç Salım Hızına Etkisi

Derişimin ilaç salım üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla 5 farklı derişimde (12,5-100,0 mg) doksorubisin yüklü genişletilmiş perlitler için salım çalışmaları yapılmıştır. İlaç salım sonuçları Şekil 4.14.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. İlaç yüklü genişletilmiş perlit partiküllerinde ilaç salım profilinin farklı derişimlerde incelenmesi. pH: 7,4; Sıcaklık: 37,0°C.

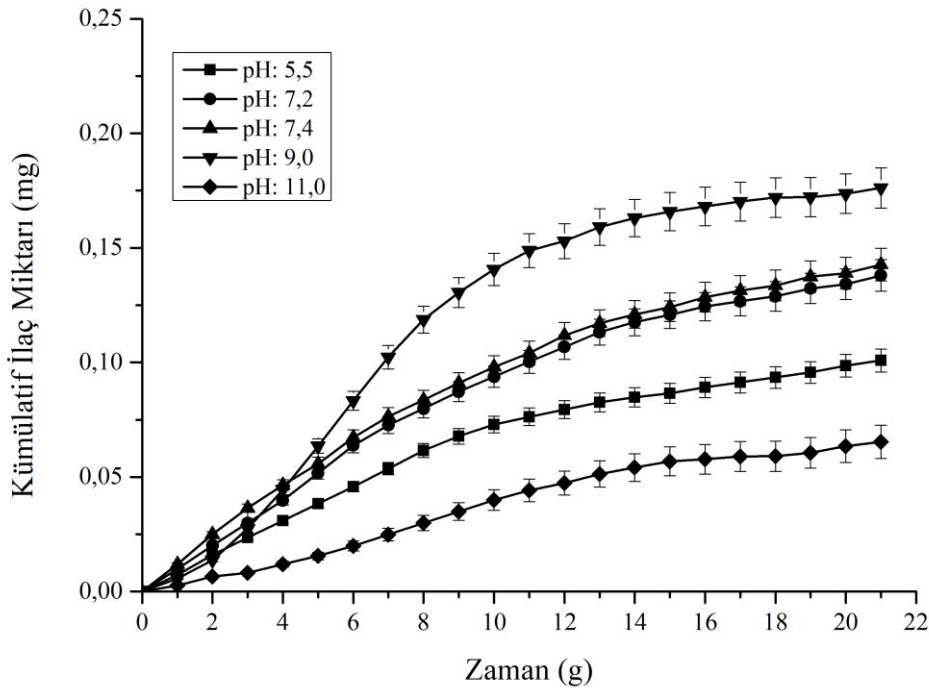
Şekil 4.14.'de görüldüğü gibi 12,5 mg ilaç yüklü genişletilmiş perlit partikülleri içeren salım çalışmasında ilaç salım hızı sekizinci güne kadar yüksek iken sekizinci günden itibaren bu hızda azalış olduğu görülmüştür. 25 ve 50 mg ilaç yüklü genişletilmiş perlit içeren salım çalışmasında salım hızı onuncu güne kadar yüksek iken o on dördüncü günden itibaren bu hızın azalışa geçtiği gözlemlenmiştir. 75 ve 100 mg ilaç yüklü genişletilmiş perlit içeren salım çalışmasında ise ilaç salım hızının onuncu günden sonra azaldığı görülmüştür. Her bir derişimde için salım profilleri incelendiğine genişletilmiş perlit partiküllerinin derişimi arttıkça ilaç salım hızının da arttığı görülmüştür. Ayrıca

derişimin artmasıyla ilaç yüklü perlit partiküllerinin ortamda bulunan doksorubisin moleküllerinin desorbe etmediği fark edilmiştir.

4.3.2. İnterpolimerik Yapılardan İlaç Salım Davranışının İncelenmesi

4.3.2.1. pH'nın İlaç Salım Hızına Etkisi

Polielektrolit yapılar pozitif ve negatif yüklü polimerler arasında gerçekleşen elektrostatik etkileşimler sonucu oluşur. Bu yapıların iyonlaşma derecesi bulunduğu ortamın iyonik kuvvet, pH ve polimerlerin derişimine göre değişim göstermektedir [3]. Poli-L-histidin ve poli-L-lizin sahip olduğu amin ve karboksilik gruplar nedeniyle bulunduğu ortamın pH değerine göre pozitif veya negatif yüke sahiptirler. Sahip olduğu bu yükler sebebiyle iyonlaşma derecesi farklı pH değerlerinde değişiklik göstermektedir. İlaç yüklü interpolimerik yapılarda pH'nın ilaç salım üzerindeki etkisini incelemek için farklı pH'larda (pH: 5,5-11,0) ve 21 gün boyunca ilaç salım çalışmaları yapılmıştır.

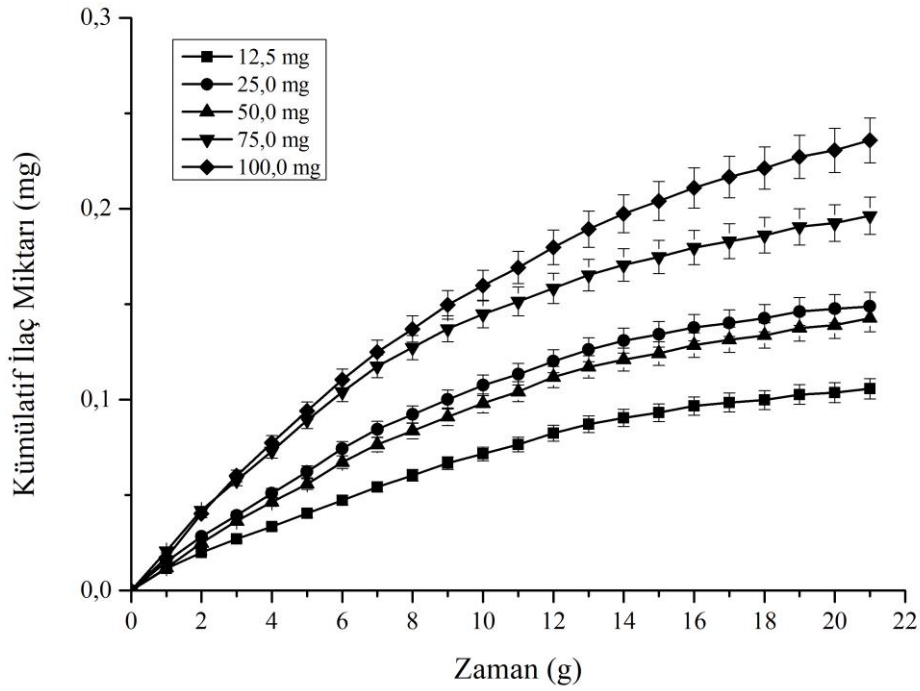


Şekil 4.15. İnterpolimerik yapılarda ilaç salım profillerinin pH duyarlılıklarının karşılaştırılması. Partikül miktarı: 50 mg; Sıcaklık: 37,0°C.

Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi pH 9,0'de yapılan salım çalışmasında salınan ilaç miktarı diğer pH'larda oluşan miktara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. pH:9,0'da poli-L-histidinde bulunan amin grupları kısmi negatif, poli-L-lizin'in sahip olduğu amin grupları ise pozitif yüklere sahip olduğu için iyonlaşma derecesi bulunduğu pH'da daha yüksektir ve bu sebeple salım miktarı diğer pH değerlerinde gerçekleşen ilaç salım miktarına göre daha fazladır. pH:5,5'te pH:9,0'a göre ilaç salım miktarı daha azdır. pH:5,5'te poli-L-histidin ve poli-L-lizin'in sahip olduğu amin grupları zıt yüklü halde olmadığı için iyonlaşma derecesi daha düşüktür ve bu nedenle polimerik yapıların açılması daha zordur. pH:11,0 da ise salım miktarının en az olduğu görülmüştür. pH:5,5'teki duruma benzer şekilde pH:11,0'de poli-L-histidin ve poli-L-lizin'in iyonlaşma derecesi daha düşük olduğu için polimerik yapıların iyonlaşarak açılması daha zordur. Bu sebeple salınan ilaç miktarı daha azdır. pH:7,2 ve 7,4'te ise poli-L-histidinin sahip olduğu amin grupları kısmi negatif, poli-L-lizin'in sahip olduğu amin grupları pozitif yüklü olduğu için polimerik yapılar açılarak ilaç salımı gerçekleşmiştir.

4.3.2.2. Derişimin İlaç Salım Hızına Etkisi

Derişimin ilaç salım üzerindeki etkisini belirlemek için 5 farklı derişim (12,5-100,0 mg) için interpolimerik yapılarda salım çalışmaları yapılmıştır.

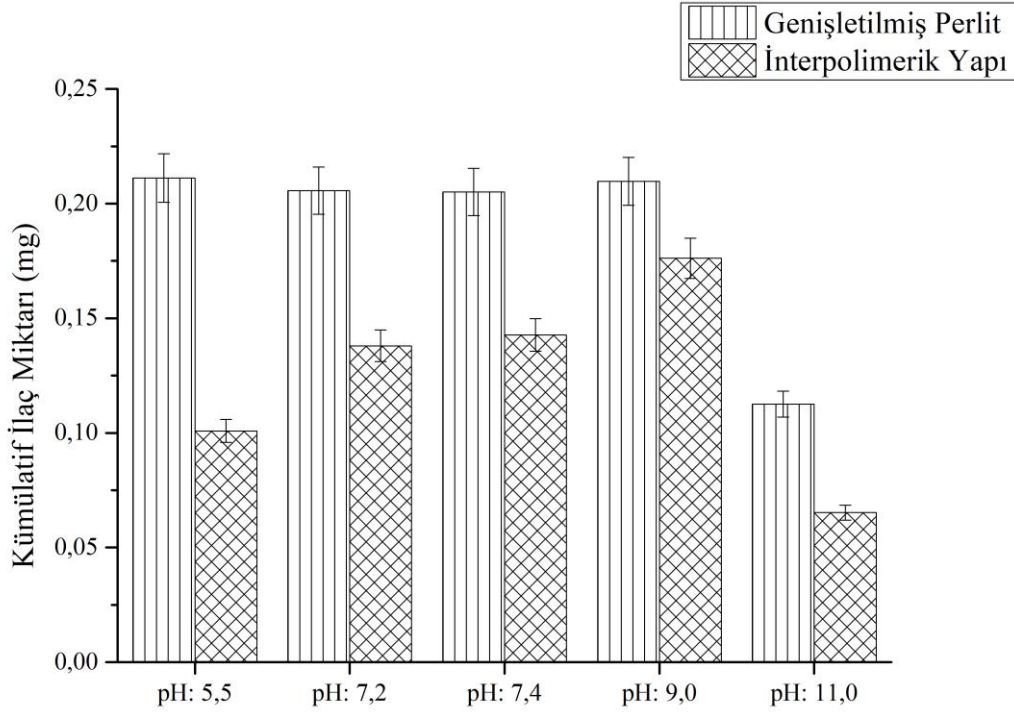


Şekil 4.16. İnterpolimerik yapılarda ilaç salım profilinin farklı derişimlerde incelenmesi.
pH: 7,4, Sıcaklık: 37,0°C.

Şekil 4.16.'da görüldüğü gibi derişim arttıkça ilaç salım miktarının da arttığı görülmüştür. 100 mg ve 75 mg interpolimerik yapı içeren salım çalışmasında ilk üç boyunca hemen hemen aynı miktarda ilaç salımı gerçekleşmiştir. Sekizinci güne kadar artan bir salım hızı görülürken onuncu günden sonra salım hızında azalma görülmüştür. 50 mg ve 25 mg interpolimerik yapı içeren ilaç salım çalışmasında ise ilk üç gün boyunca yaklaşık olarak aynı oranda ilaç salım hızı görülürken yedinci günden itibaren salım hızında yavaşlama olmuştur. 12,5 mg interpolimerik yapı içeren ilaç salım çalışmasında ise salım hızı ilk on iki gün boyunca artan bir eğilim gösterirken on üçüncü günden itibaren ilaç salım hızında azalış meydana geldiği görülmüştür. Değişik miktarlarda (12,5-100 mg) interpolimerik yapı içeren ilaç salım çalışmaları incelendiğinde artan derişim ile ilaç salım miktarının doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Derişim artması nedeniyle interpolimerik yapıların salınan ilacı desorbe etmediği anlaşılmıştır.

4.3.2.3. İnterpolimerik Yapıların Salım Hızına Etkisi

Poli-L-histidin ve poli-L-lizin'den oluşan interpolimerik yapıların kontrollü ilaç salımındaki etkisini incelemek için 5 farklı pH'da (5,5-11,0) salım çalışmaları yapılmıştır.



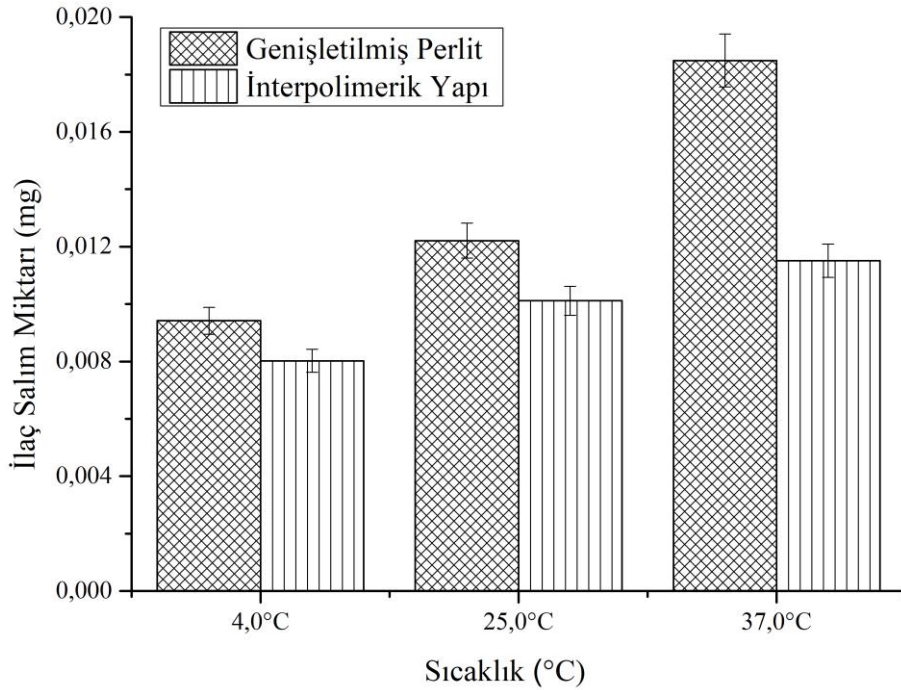
Şekil 4.17. Genişletilmiş perlit partiküllerinde ve interpolimerik yapılarda ilaç salım profillerinin pH duyarlılıklarının karşılaştırılması. Partikül miktarı: 50 mg, Sıcaklık: 37°C.

Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapılarda gerçekleşen ilaç salım miktarları karşılaştırıldığında interpolimerik yapılar pH'a duyarlı bir ilaç salım profili göstermiştir. Genişletilmiş perlit partiküllerinden salınan ilaç miktarları incelendiğinde pH: (5,5-9,0) arası aynı miktarda salım yaptığı görülmüştür. İnterpolimerik yapılardan gerçekleşen salım miktarları incelendiğinde ise bulunduğu ortamın pH değerlerine bağlı olarak gösterdiği iyonlaşma derecesine göre her bir pH da farklı miktarlarda ilaç salımı yaptığı görülmüştür. Doksorubisin molekülleri pH: 11,0'de yapısal olarak bozulduğu için hem genişletilmiş perlit partiküllerinde hem de interpolimerik yapılarda pH: 11,0'de gerçekleşen salım miktarı diğer pH değerlerinde

gerçekleşen salım miktarları ile karşılaştırıldığında ilaç salım miktarlarının pH: 11,0'de daha az olduğu görülmüştür.

4.3.2.4. Sıcaklığın İlaç Salım Hızına Etkisi

Sıcaklığın ilaç salım hızı üzerindeki etkisini belirlemek için 3 farklı sıcaklıkta (4-37°C) ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Şekil 4.18.'de görüldüğü gibi hem genişletilmiş perlit partiküllerinde hem de interpolimerik yapılarda gerçekleşen ilaç salım hızının sıcaklık artışıyla yükseldiği görülmüştür. Genişletilmiş perlit partikülleri ile doksorubisin arasında bulunan bağlar sıcaklığın artışı ile zayıfladığı için salım miktarı sıcaklığın yükselmesi ile artmıştır. İnterpolimerik yapılarda ise poli-L-histidin ile poli-L-lizin arasında bulunan etkileşimler sıcaklığın artmasıyla azaldığı için polimerik yapılar daha hızlı açılarak içinde bulunan ilaç moleküllerini bulunduğu ortama daha hızlı salmıştır.



Şekil 4.18. Genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılarda ilaç salım profillerinin sıcaklık duyarlılıklarının karşılaştırılması. Partikül miktarı: 30 mg, pH: 7,4.

4.4. Sitotoksosite Çalışmaları

İlaç salım çalışmalarında kullanılan genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılar için sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Her bir örnek fibroblast hücreleri ile 24 saat boyunca bekletilmiştir. Sitotoksosite çalışmaları sonucu Çizelge 4.3.'de belirtilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda genişletilmiş perlit, doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılar için hücre canlılığı sırasıyla $85,28 \pm 2,57$, $68,43 \pm 8,86$ ve $67,86 \pm 4,77$ olarak gözlenmiştir. Bu çalışmada ilaç taşıyıcı partikül olarak kullanılan genişletilmiş perlit yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahip olması ve sitotoksik etki göstermemesi nedeniyle birçok biyolojik uygulamada avantaj sağladığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Sitotoksosite sonuçları.

	% Canlılık		
	Genişletilmiş Perlit	Dokсорubisin Yüklü Genişletilmiş Perlit	İnterpolimerik Yapı
6 mg/mL	$85,28 \pm 2,57$	$68,43 \pm 8,86$	$67,86 \pm 4,77$
Pozitif Kontrol	$38,83 \pm 3,09$	$36,20 \pm 2,63$	$24,75 \pm 4,24$
Negatif Kontrol	$94,42 \pm 2,06$	$95,82 \pm 1,04$	$82,04 \pm 3,24$

4.5. Kinetik Hesaplamalar

Genişletilmiş perlit partiküllerinde ve interpolimerik yapılarda gerçekleşen salım sonuçları sıfıncı derece, birinci derece ve Korsmeyer-Peppas modeli ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.'de ifade edilen n ve R² değerleri ilaç salım verilerinin Korsmeyer-Peppas denklemi ile analizi sonucu elde edilmiştir. Denklemden yer alan n

değeri ilaç salım sistemlerinde gerçekleşen difüzyon hakkında bilgi verir. 'n' değeri 0,5 olduğu durumlarda salınan ilacın difüzyonu Fickian difüzyonuna uyumlu olduğunu ifade eder. $0,45 < n < 0,89$ durumunda ilaç salımı Fickian difüzyonuna uymayan difüzyon ile oluştuğunu; n değeri 0.89 veya bu değerden daha büyük ise ilaç salımı durum II ya da süper durum II mekanizmalarına ile gerçekleştiği ifade edilir. Sıfıncı derece ve birinci derece kinetik hesaplamalar sonucunda elde edilen doğrusallık katsayıları karşılaştırıldığında pH 5,5-11,0 arasında hem ilaç yüklü genişletilmiş perlit de hemde interpolimerik yapılarda gerçekleşen ilaç salımlarının sıfıncı derece modele uyduğu belirlenmiştir. Korsmeyer-Peppas modeli ile yapılan kinetik hesaplamalar sonucu elde edilen doğrusallık katsayıları doğrultusunda her iki yapının bu modele uyduğu görülmüştür. Korsmeyer-Peppas modeline ait kinetik hesaplamalarından elde edilen salım kuvveti (n) parametreleri incelendiğinde pH (5,5-9,0) aralığında genişletilmiş perlite ve pH (5,5-7,4) aralığında interpolimerik yapılara ait ilaç salım kuvveti $0,45 < n < 0,89$ aralığında olduğu için bu yapıların fick yasasına uymayan ilaç salımı yaptığı belirlenmiştir. Bu sonuç salımın difüzyon kontrollü olduğunun göstergesidir.

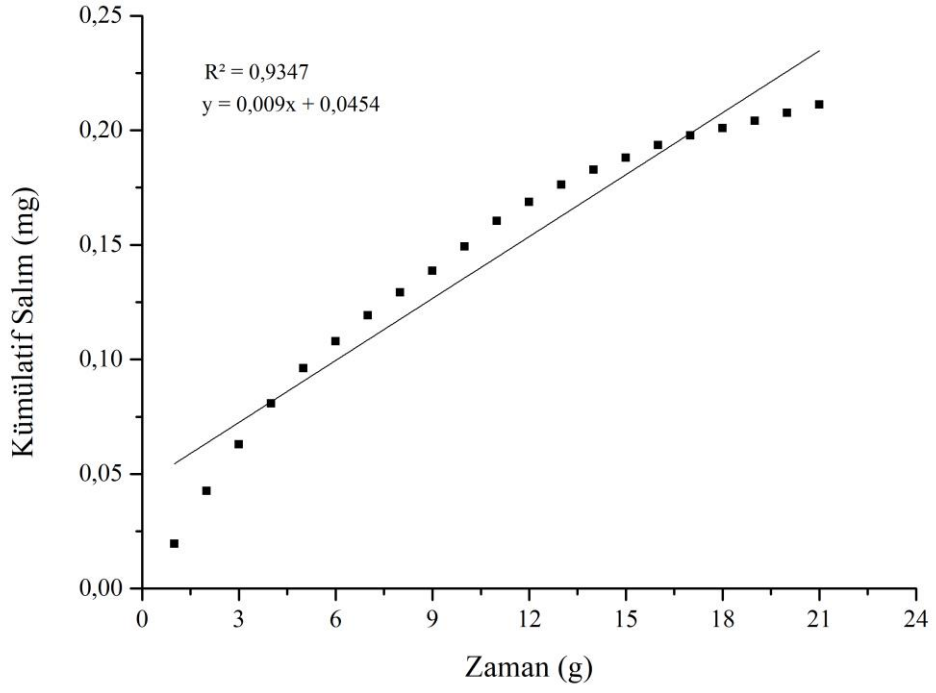
İlaç yüklü genişletilmiş perlit için pH: 9,0'da ki ilaç salım verilerine göre yapılan Korsmeyer-Peppas modeli hesaplamalarından elde edilen salım kuvveti 1,0'dan büyük çıkmıştır. Nedeni ise pH: 9,0 da polimer zincirleri daha fazla açılması sonucu ilaç difüzyonunun artmış olmasıdır. Şekil 4.50. ve Şekil 4.51.'de görüldüğü gibi pH:11,0'da doksorubisin molekülleri yapısal olarak bozulduğu için hem ilaç yüklü genişletilmiş perlit hemde interpolimerik yapılar için pH:11,0'da yapılan salım çalışmalarına göre Korsmeyer-Peppas modelinden elde edilen salım kuvveti 1,0'dan büyük çıkmıştır.

Çizelge 4.3. Doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partiküllerine ait kinetik analiz sonuçları. (K-P): Korsmeyer-Peppas, n: salım kuvveti

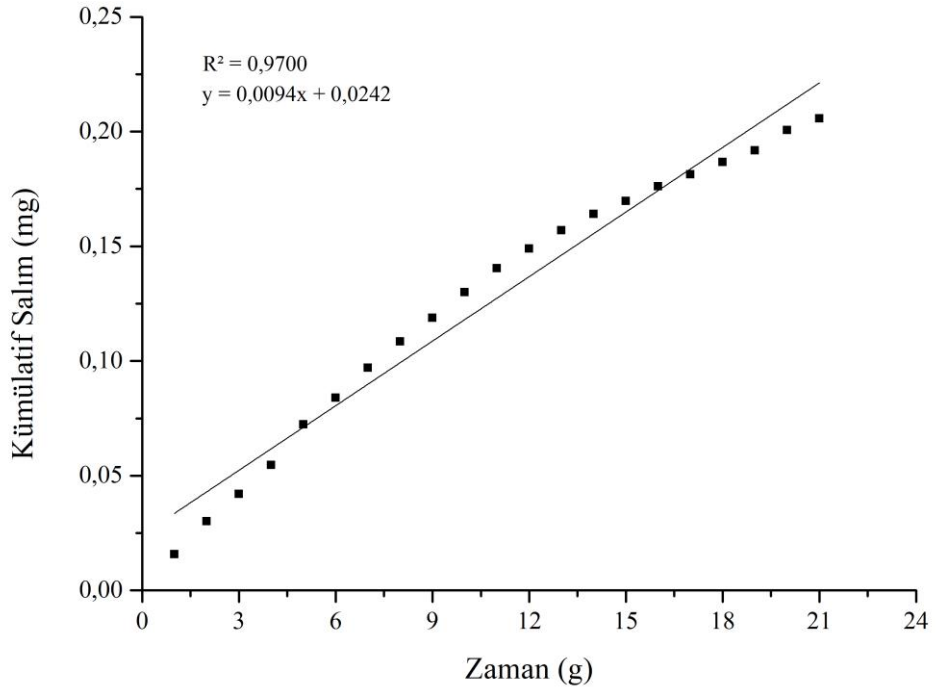
pH	n	Doğrusallık Katsayısı, R ²		
		Korsmeyer-Peppas	Sıfırıncı	Birinci
5,5	0,733	0,971	0,935	0,734
7,2	0,845	0,991	0,97	0,8
7,4	0,869	0,993	0,976	0,804
9,0	0,894	0,988	0,974	0,785
11,0	1,079	0,987	0,968	0,827

Çizelge 4.4. İnterpolimerik yapılara ait kinetik analiz sonuçları. (K-P): Korsmeyer-Peppas, n: salım kuvveti.

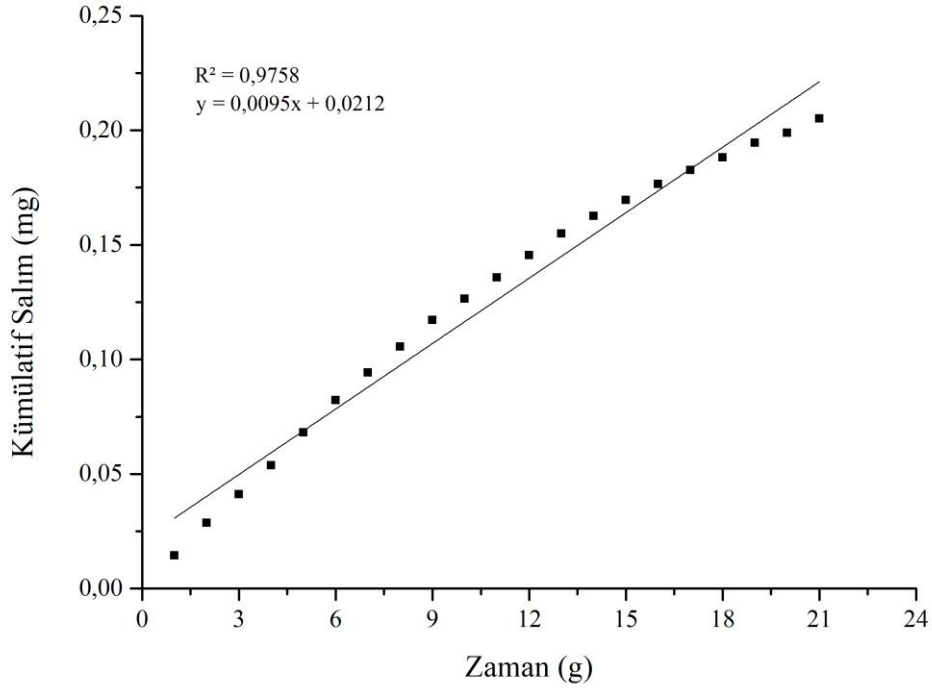
pH	n	Doğrusallık Katsayısı, R ²		
		Korsmeyer-Peppas	Sıfırıncı	Birinci
5,5	0,832	0,973	0,929	0,736
7,2	0,856	0,979	0,947	0,753
7,4	0,788	0,981	0,946	0,759
9,0	1,113	0,933	0,866	0,65
11,0	1,065	0,984	0,962	0,804



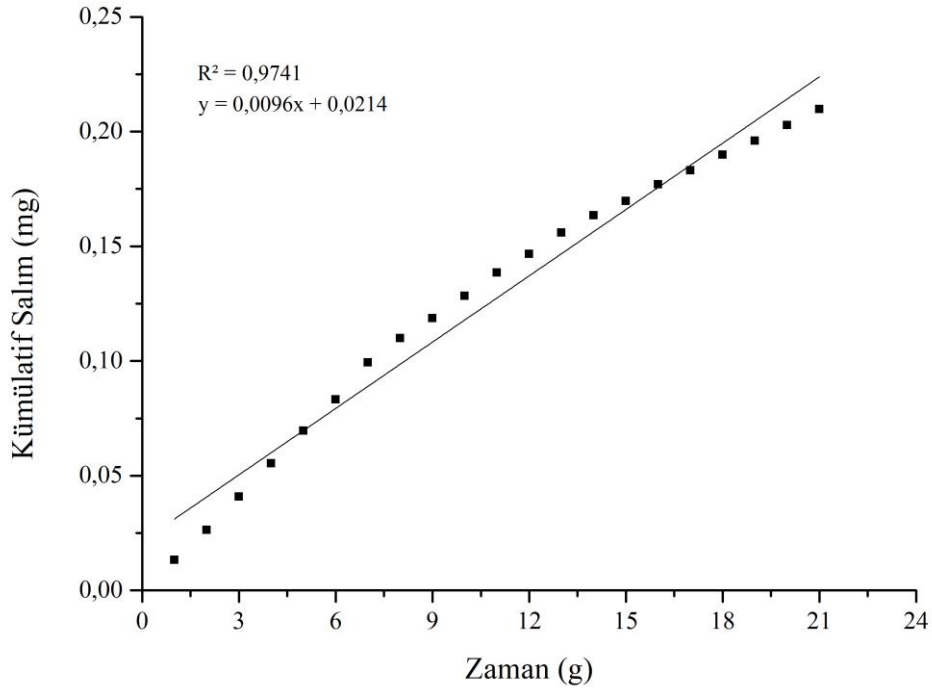
Şekil 4.19. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 5,5.



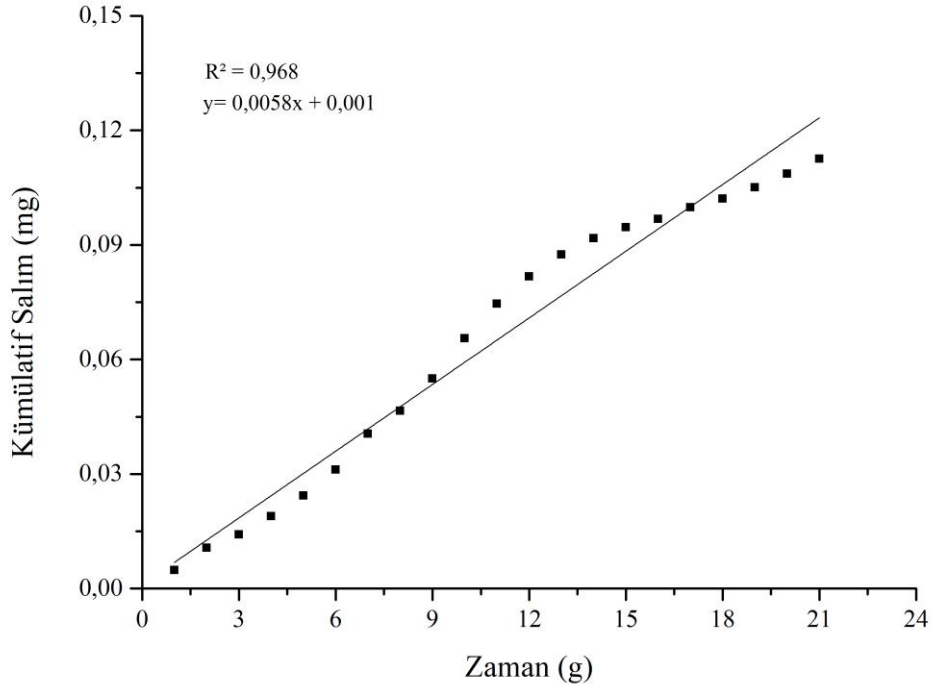
Şekil 4.20. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,2.



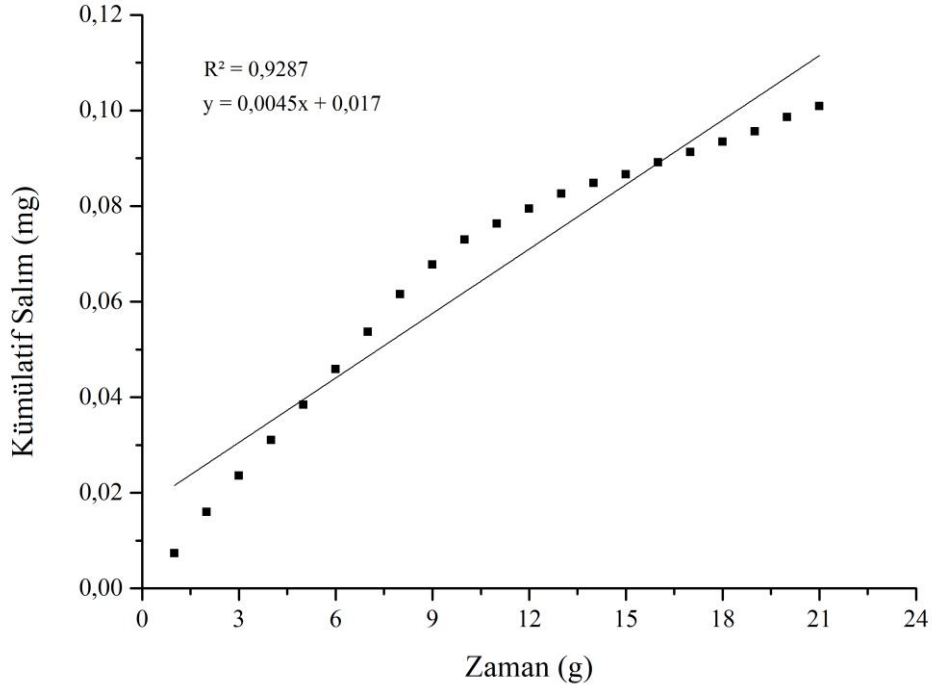
Şekil 4.21. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,4.



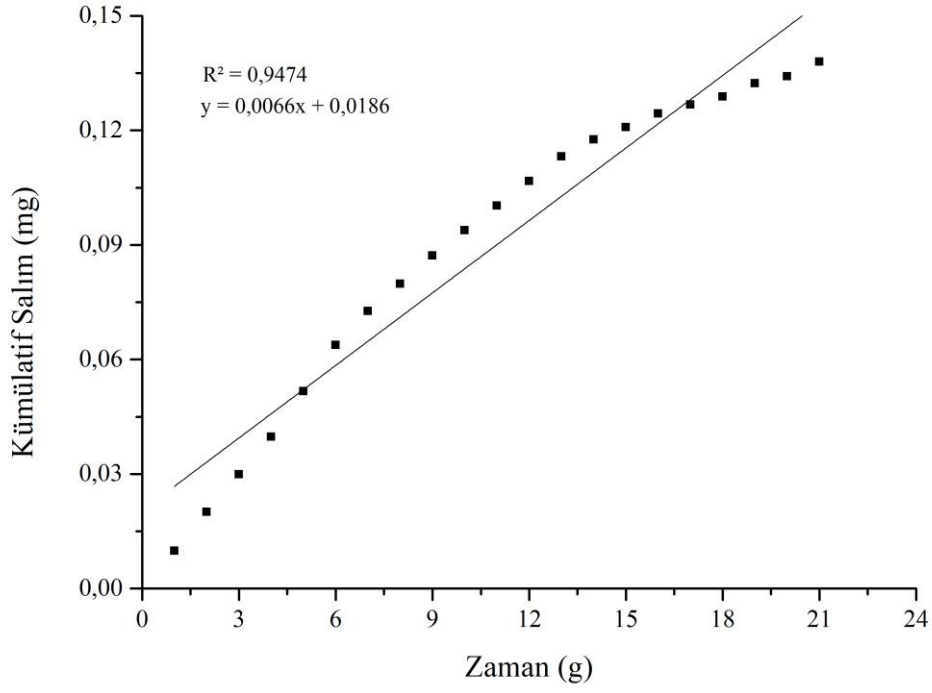
Şekil 4.22. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 9,0.



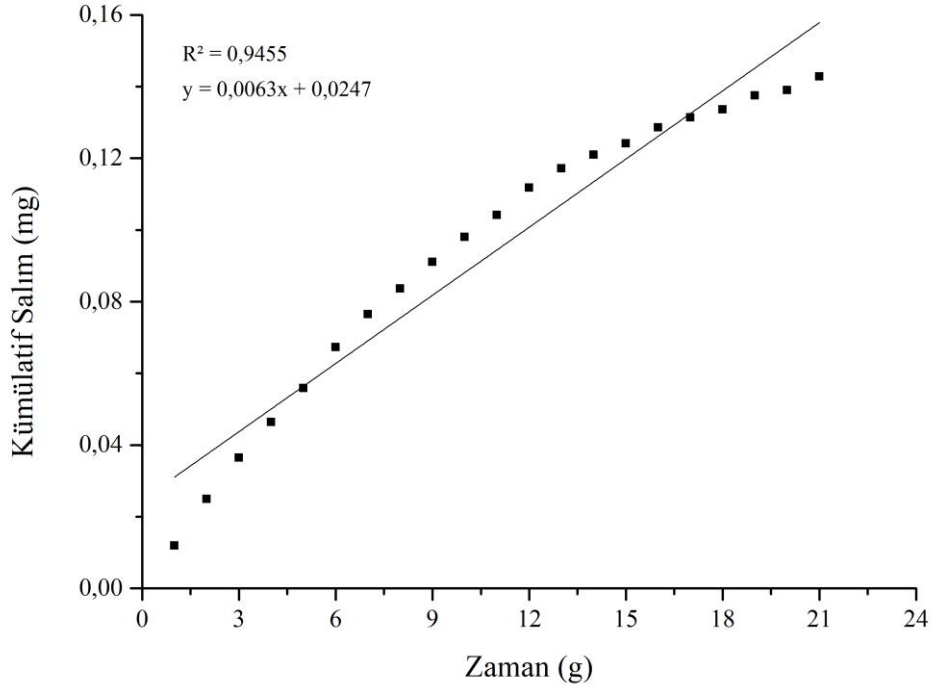
Şekil 4.23. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin sıfır derece salım kinetiği. pH: 11,0.



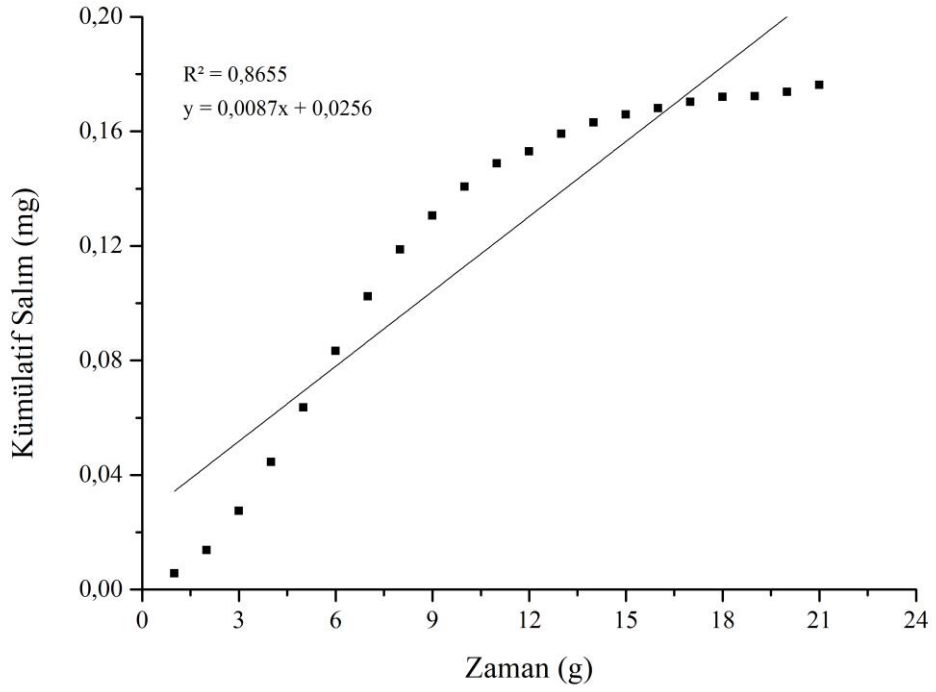
Şekil 4.24. İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 5,5.



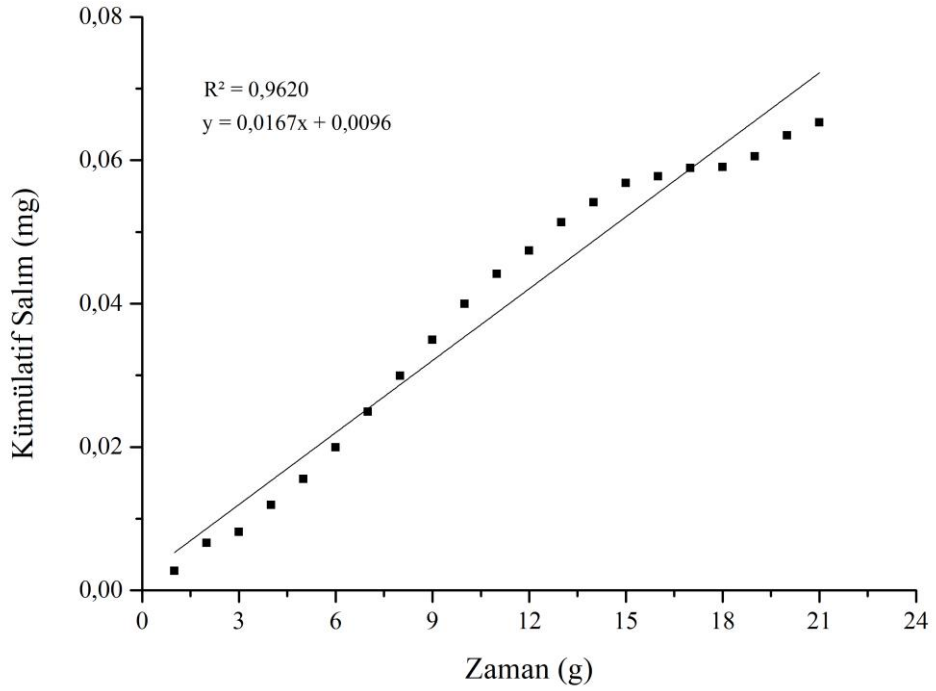
Şekil 4.25. İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,2.



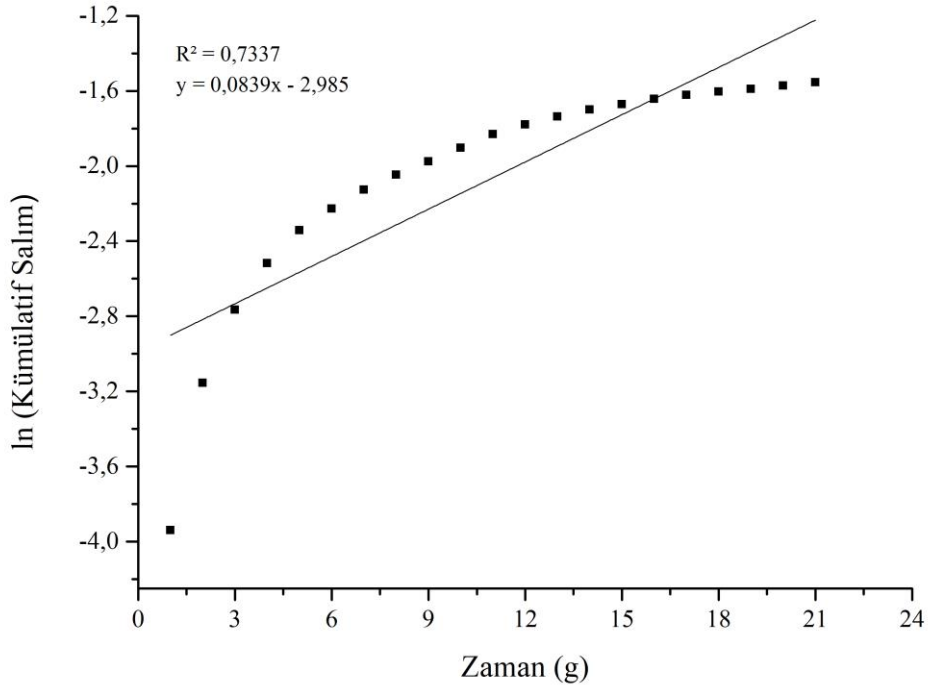
Şekil 4.26. İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 7,4.



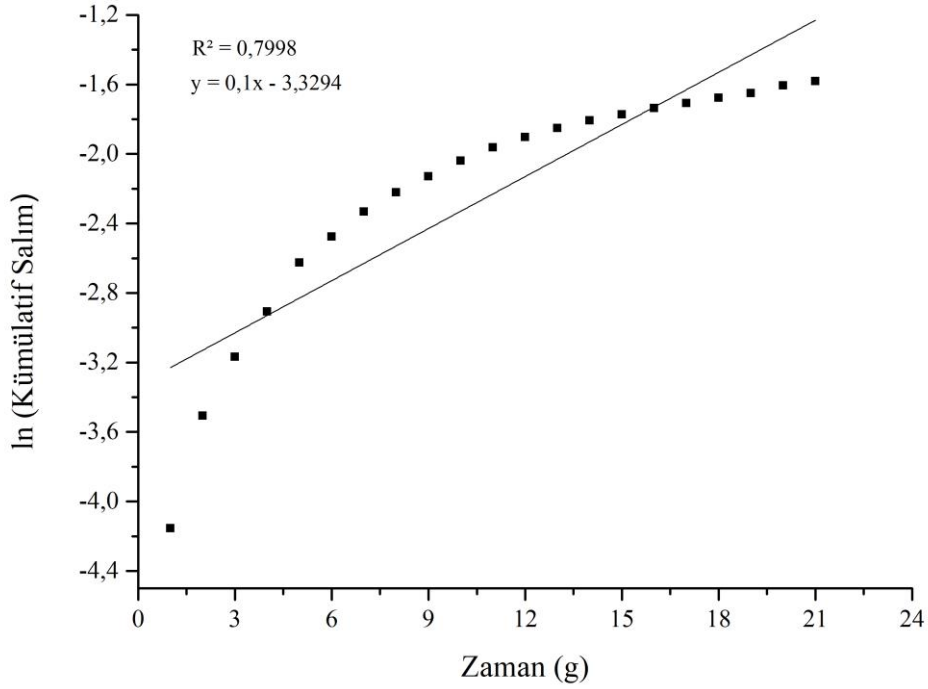
Şekil 4.27. İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 9,0.



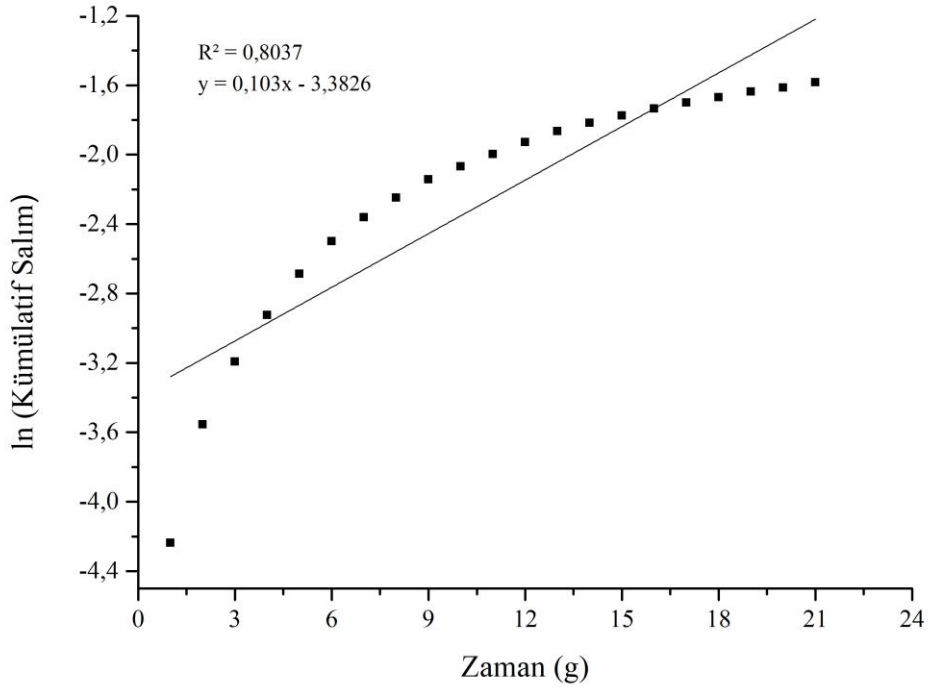
Şekil 4.28. İnterpolimerik yapıların sıfır derece salım kinetiği. pH: 11,0.



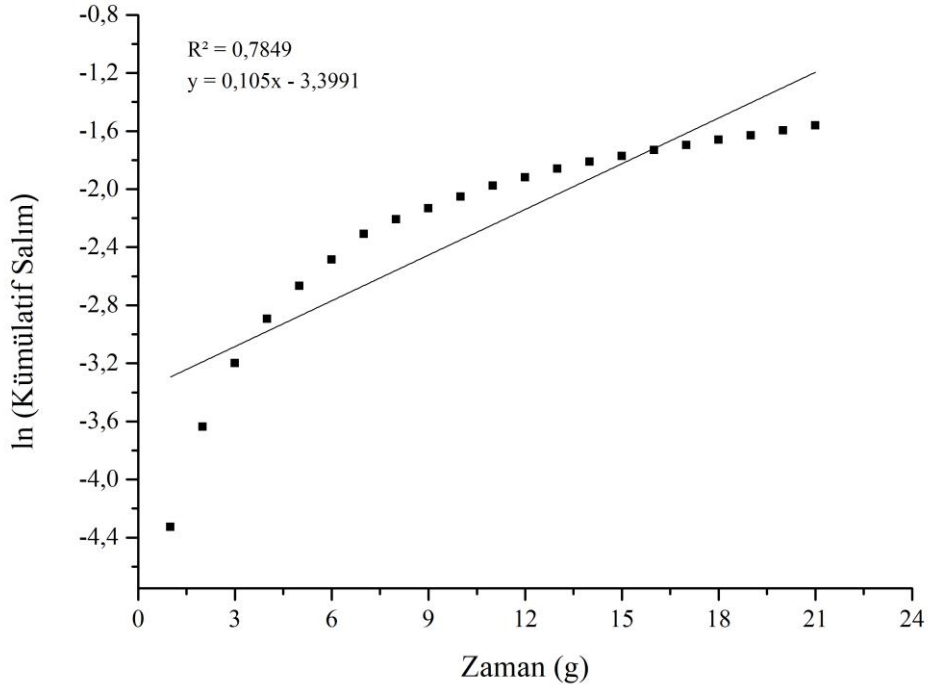
Şekil 4.29. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 5,5.



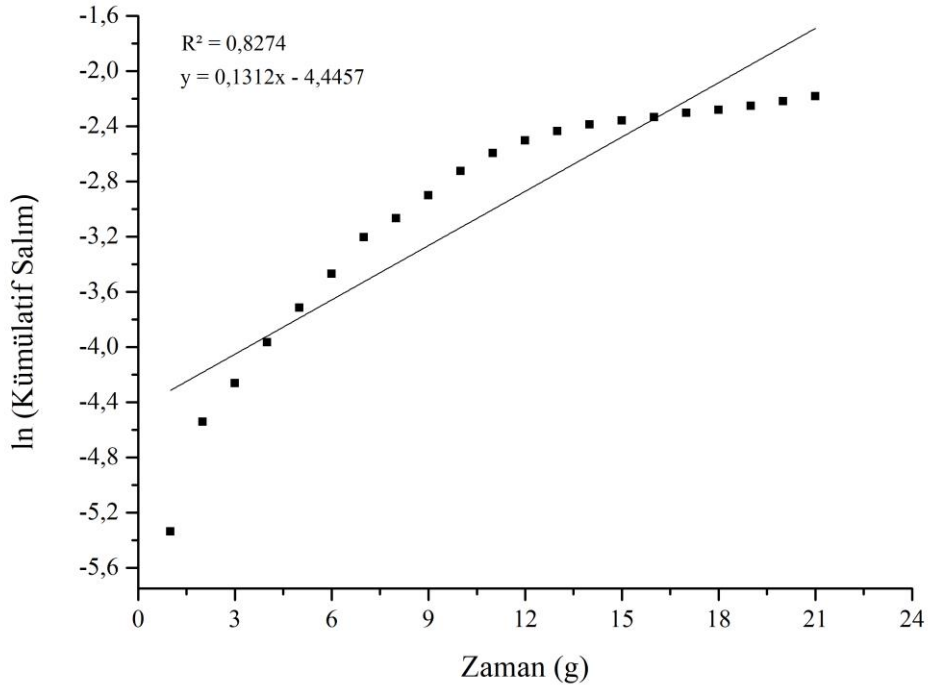
Şekil 4.30. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 7,2.



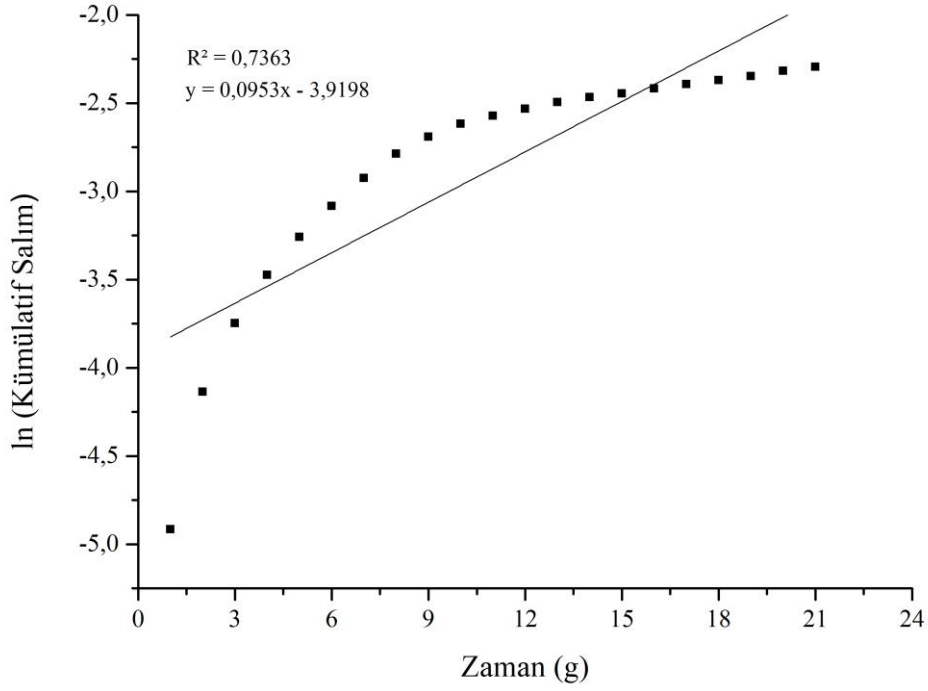
Şekil 4.31. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 7,4.



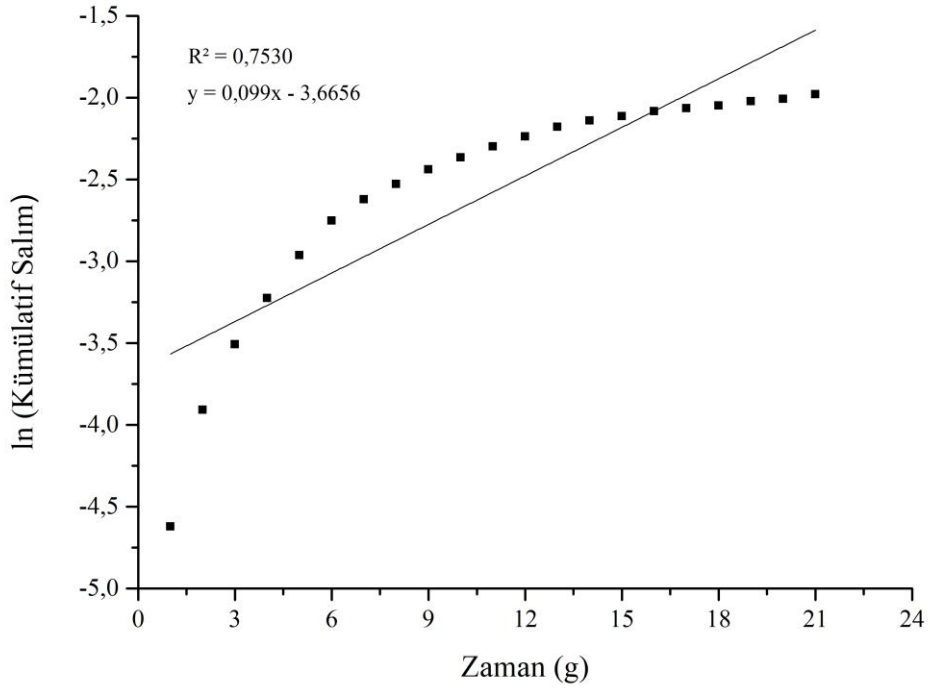
Şekil 4.32. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 9,0.



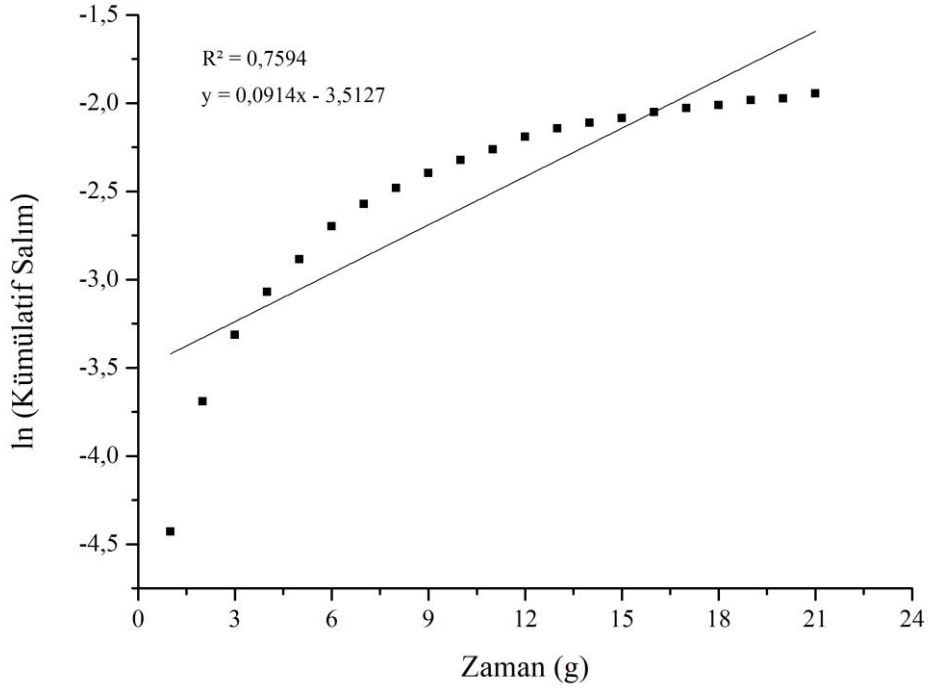
Şekil 4.33. İlaç yüklü genişletilmiş perlitin birinci derece salım kinetiği. pH: 11,0.



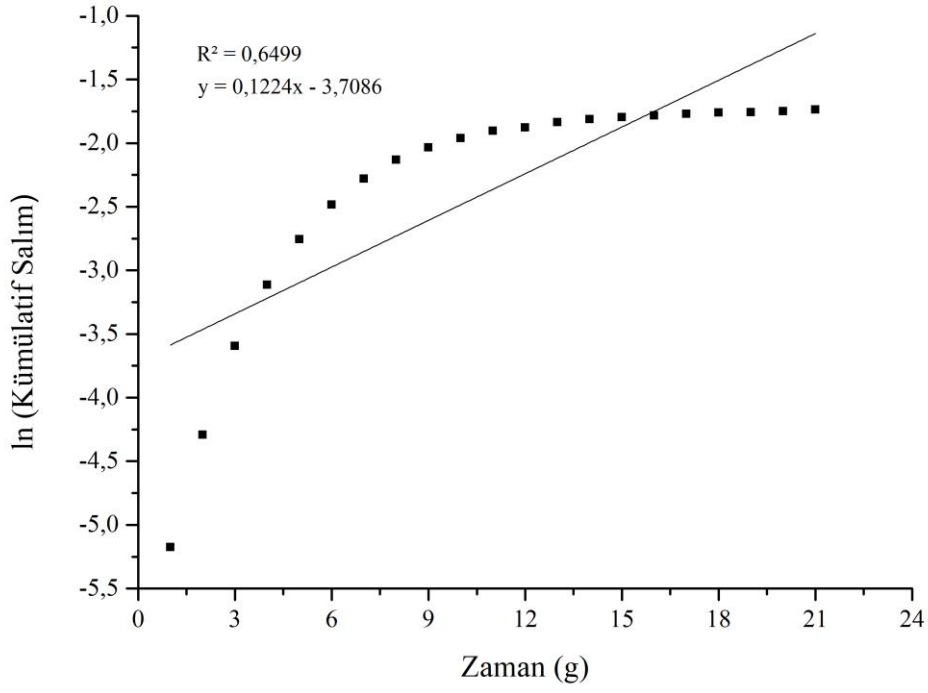
Şekil 4.34. İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 5,5.



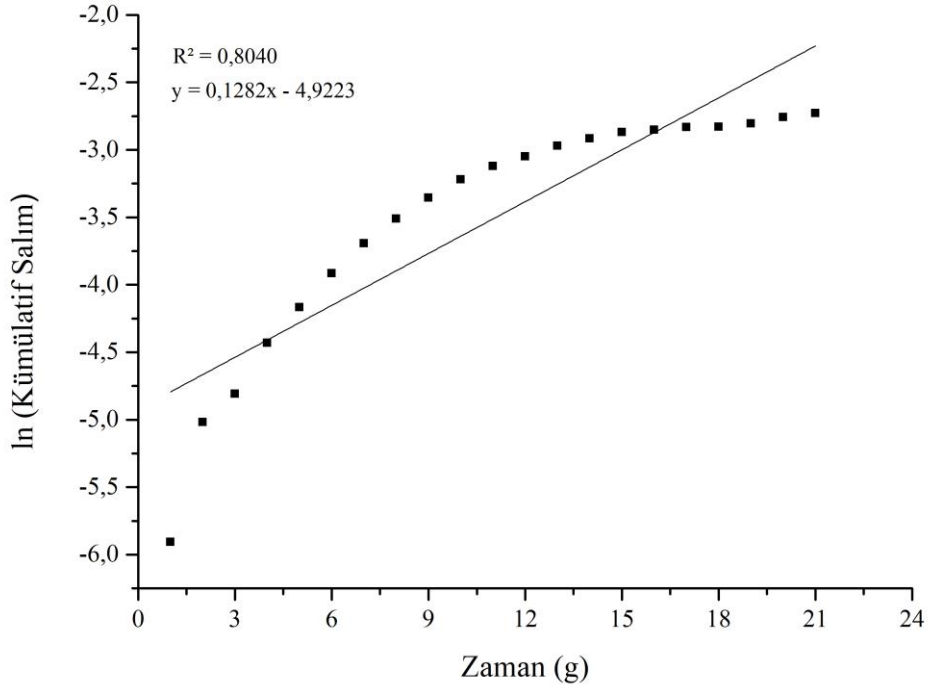
Şekil 4.35. İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 7,2.



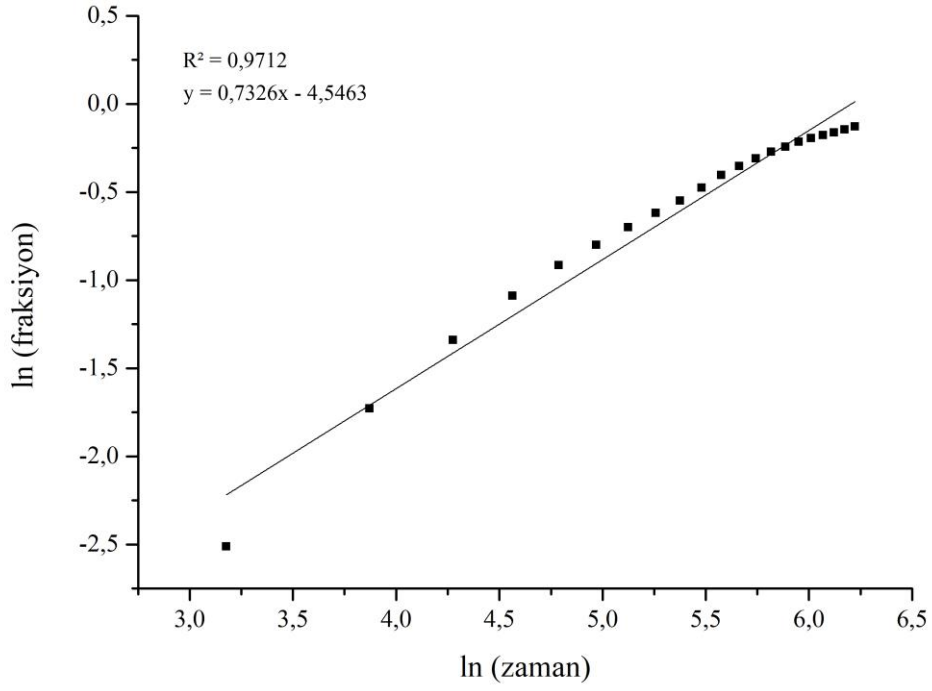
Şekil 4.36. İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 7,4.



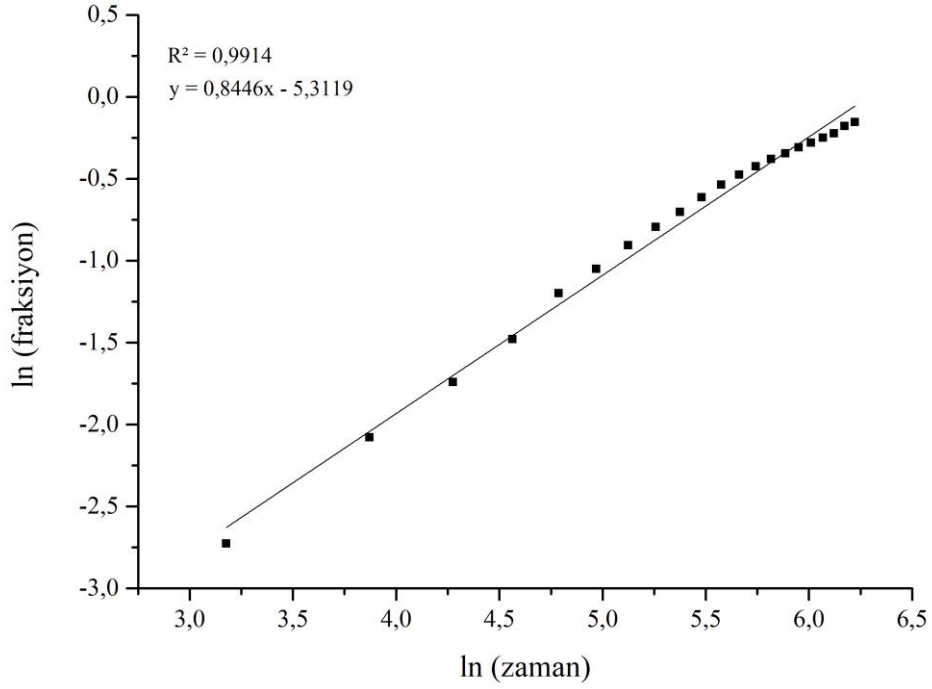
Şekil 4.37. İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 9,0.



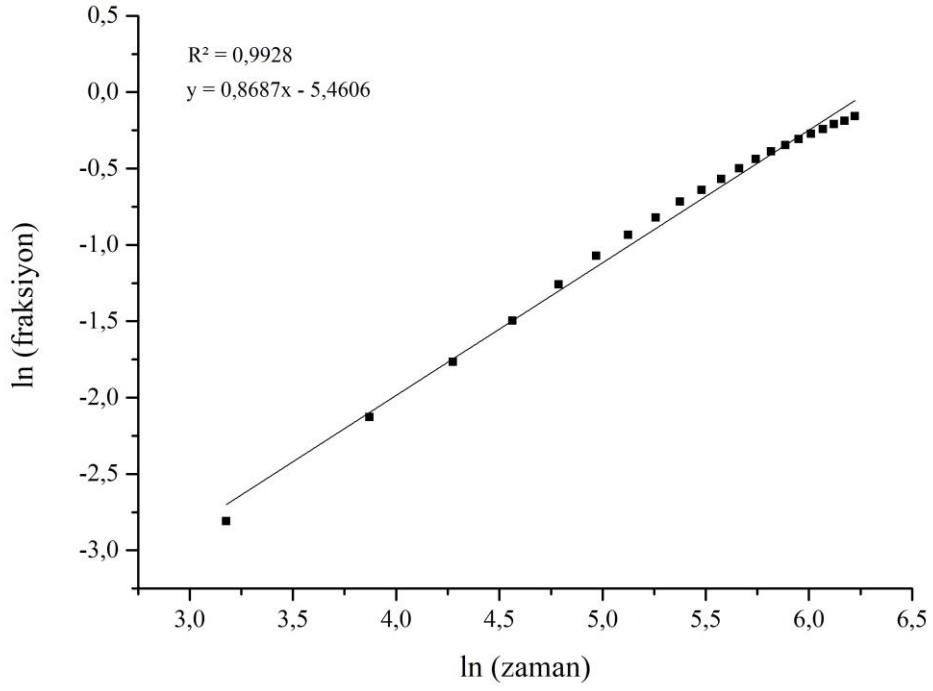
Şekil 4.38. İnterpolimerik yapıların birinci derece salım kinetiği. pH: 11,0.



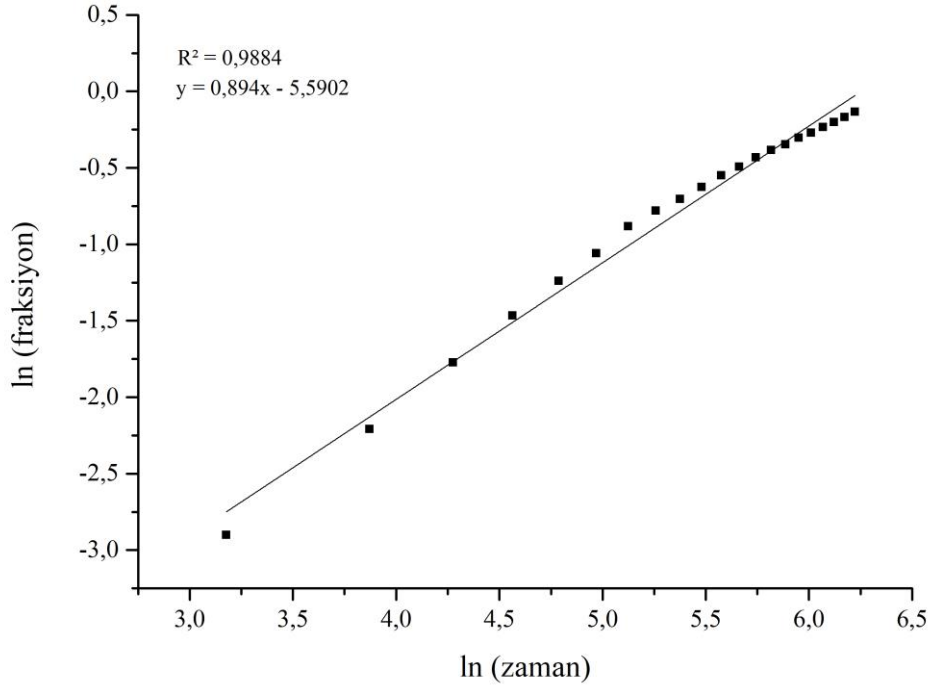
Şekil 4.39. İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 5,5.



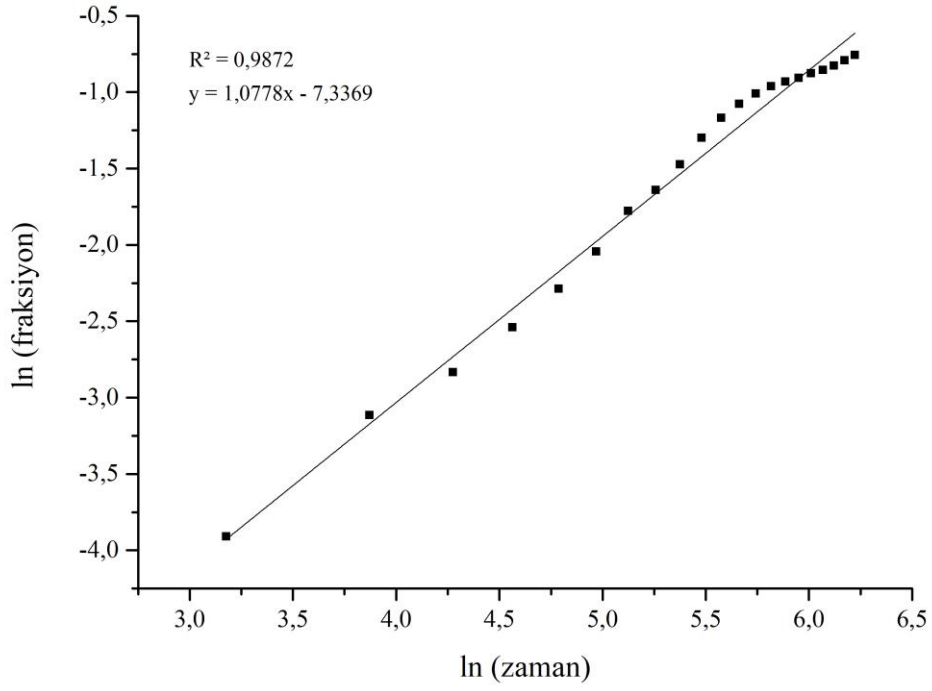
Şekil 4.40. İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,2.



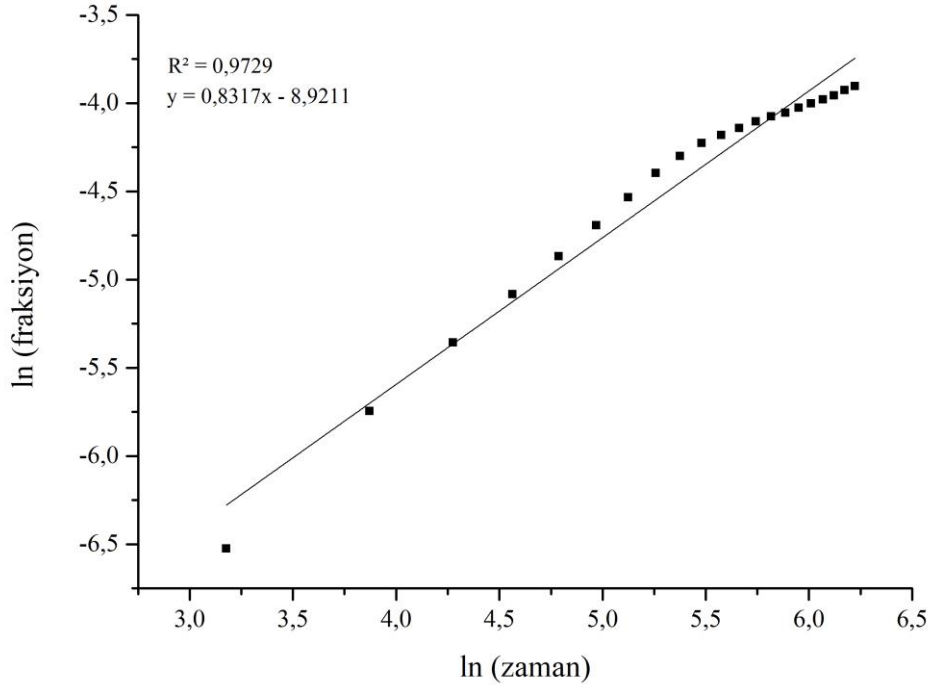
Şekil 4.41. İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,4.



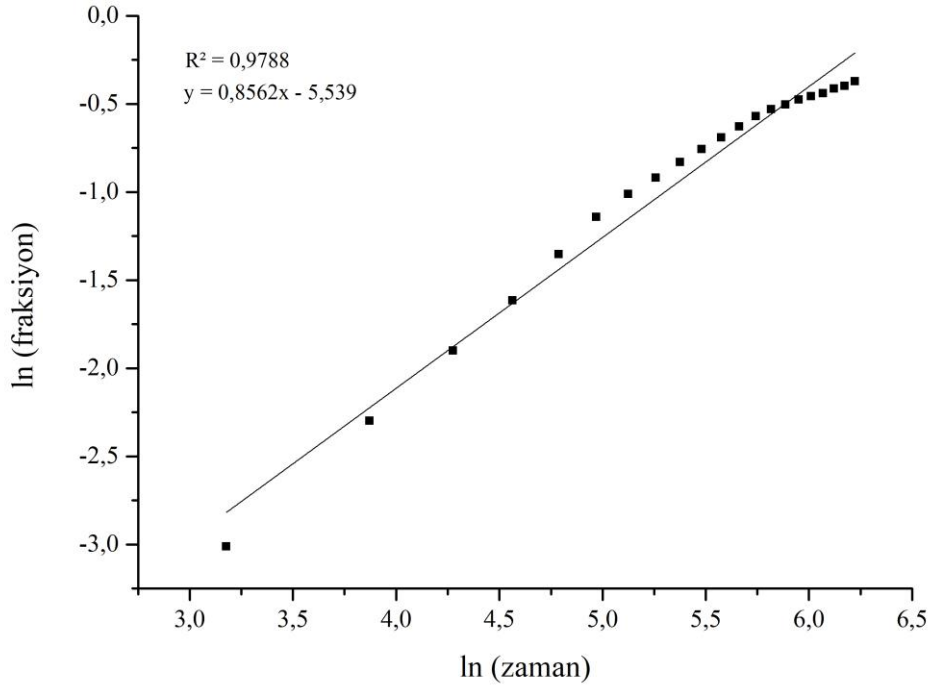
Şekil 4.42. İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 9,0.



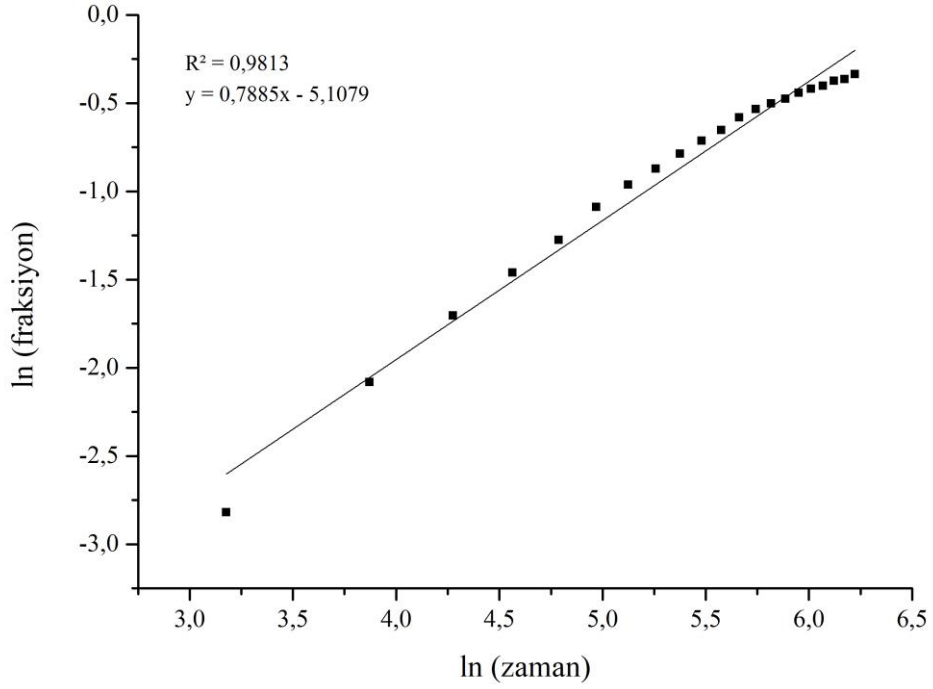
Şekil 4.43. İlaç yüklü perlitin Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 11,0.



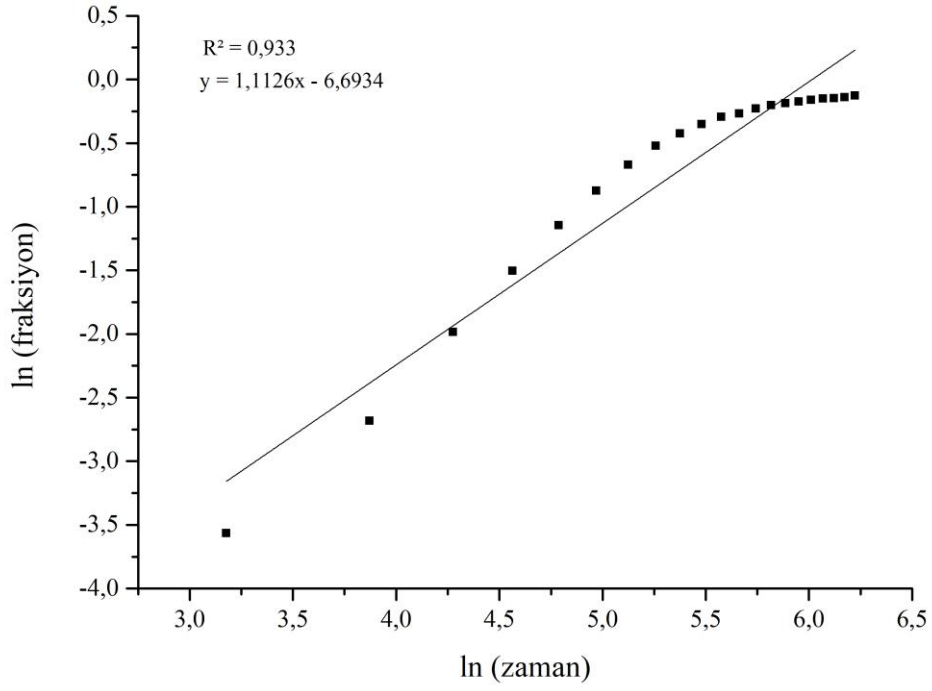
Şekil 4.44. İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 5,5.



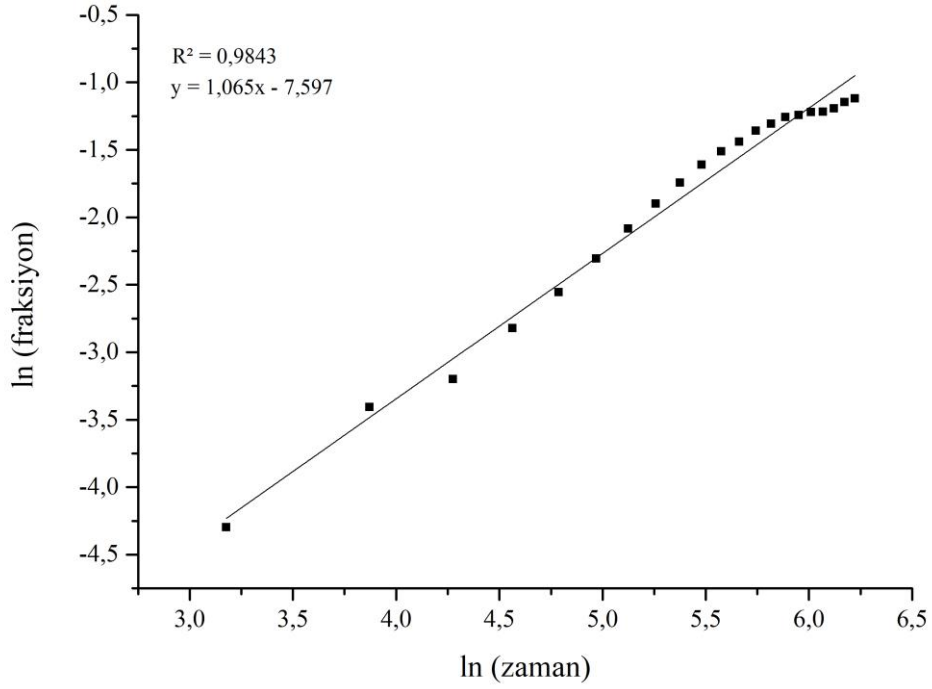
Şekil 4.45. İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,2.



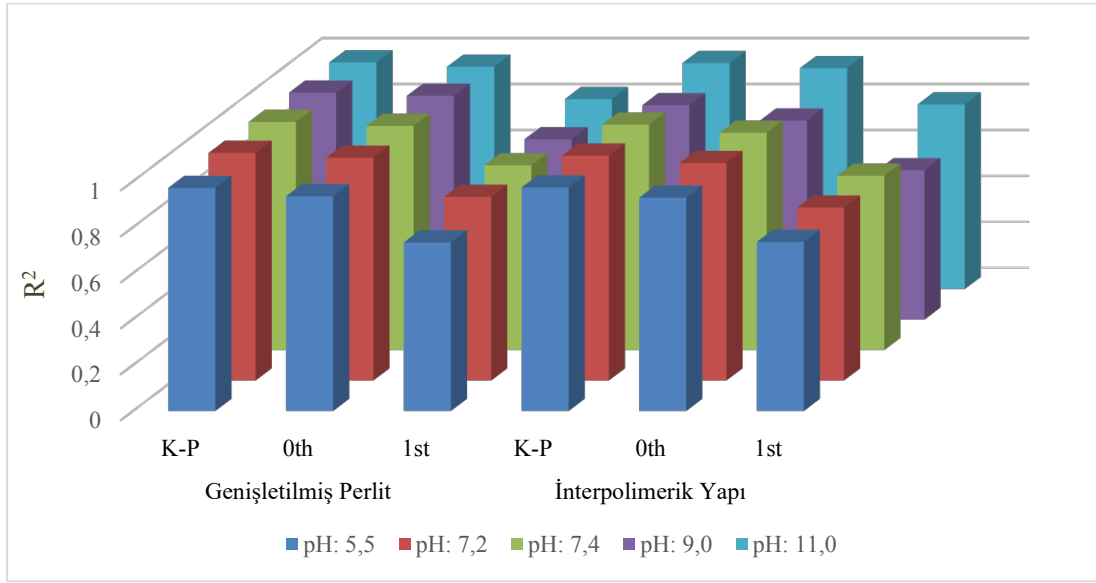
Şekil 4.46. İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 7,4.



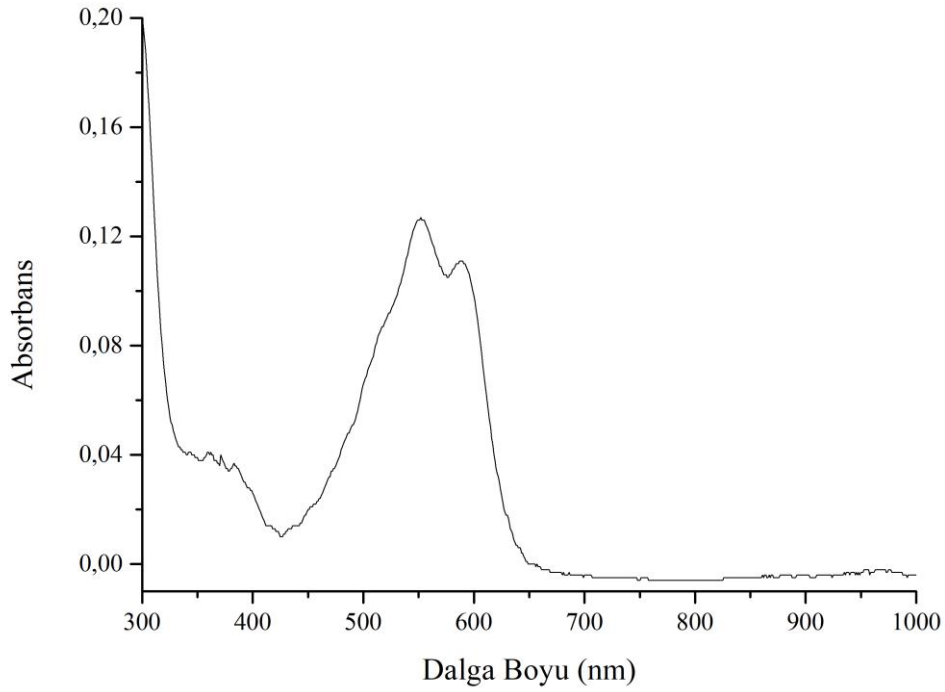
Şekil 4.47. İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 9,0.



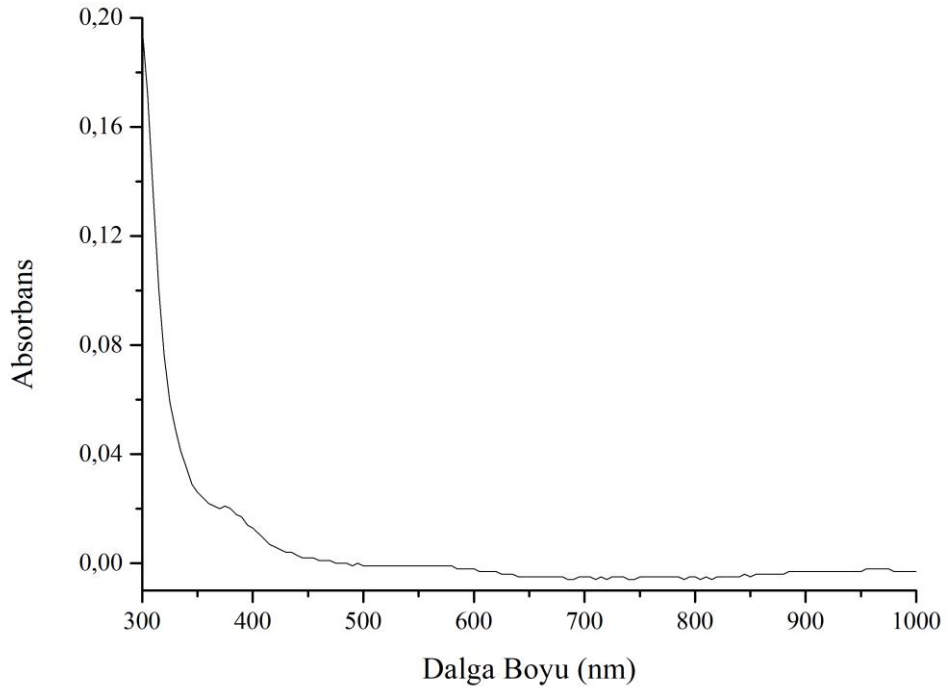
Şekil 4.48. İnterpolimerik yapıların Korsmeyer-Peppas salım kinetiği. pH: 11,0.



Şekil 4.49. Korsmeyer-Peppas (K-P), sıfır derece (0th), ve birinci derece (1st) kinetik parametreleri.



Şekil 4.50. Doksorubisin çözeltisinin UV-Vis spektrumu. pH: 11,0.



Şekil 4.51. Dokсорubisin çözeltisinin UV-Vis spektrumu. pH: 11,0; çözelti hazırlandıktan 24 saat sonra.

5. YORUM

Tez çalışması kapsamında doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri içeren interpolimerik yapılar sentezlenmiştir. Sentezlenen her iki yapının karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve ilaç salım profilleri farklı pH, sıcaklık ve derişim aralıklarında incelenmiştir.

Genişletilmiş perlit partiküllerine yüklenen doksorubisin miktarı UV-Vis spektrofotometre ile belirlenmiştir. İlaç yükleme verimi %97,18 olarak hesaplanmıştır. İnterpolimerik yapıların oluşumunu göstermek için zeta potansiyel analizi yapılmıştır. Ölçülen zeta potansiyeli değerleri incelendiğinde genişletilmiş perlit ve ilaç yüklü genişletilmiş perlite ait zeta potansiyeli negatif değerlere sahip iken interpolimerik yapılara ait zeta potansiyeli pozitif değerlere sahip olduğu görülmüştür. İnterpolimerik yapılarda bulunan pozitif zeta potansiyel değeri iki zıt yükün bir araya gelmesiyle oluşan interpolimerik yapıların varlığının kantıdır. Genişletilmiş perlit, ilaç yüklü genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapıların termal kararlılıklarını ölçmek için TGA analizleri gerçekleştirilmiştir. 100-200°C aralığında genişletilmiş perlit partiküllerinde bulunan hidratize olmuş su moleküllerinin uzaklaşması nedeniyle kütle kaybı oluşmuştur. 200-500°C aralığında genişletilmiş perlitte bulunan doksorubisin moleküllerinin; interpolimerik komplekslerde ise polimerik yapıların bozularak kütle kaybına neden olduğu belirlenmiştir. TGA sonuçlarından anlaşılacağı üzere genişletilmiş perlite yüklü halde bulunan doksorubisin molekülleri ve interpolimerik yapıları oluşturan poli-L-histidin ve poli-L-lizin molekülleri genişletilmiş perlitin termal dayanımını etkilemediği görülmüştür. İlaç yüklü perlit partiküllerinin ve interpolimerik yapıların yüzey morfolojilerini görüntülemek için SEM analizi yapılmıştır. SEM analiz sonuçlarına göre doksorubisin ve interpolimerik yapıları oluşturan polimerlerin genişletilmiş perlit partiküllerinin yüzey morfolojisini negatif yönde etkilemediği görülmüştür.

Salım çalışmaları kapsamında doksorubisin yüklü genişletilmiş perlit partikülleri ve interpolimerik yapıların salım performansı 21 gün boyunca gözlemlenmiştir.

pH'nın ilaç salım hızına etkisini belirlemek amacıyla interpolimerik yapılar ve polimer kaplı olmayan genişletilmiş perlit partikülleri için beş farklı pH'da (5,5-11,0) ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Perlit partiküllerinde gerçekleşen ilaç salım miktarları incelendiğinde pH 5,5-9,0 arası salınan ilaç miktarı neredeyse aynı olduğu pH: 11,0'de ise diğer pH değerlerine göre ilaç salım miktarının daha az olduğu görülmüştür. Nedeni ise doksorubisin molekülünün pH 11,0'da bir süre sonra yapısal olarak bozulması olarak belirtilmiştir.

İnterpolimerik yapılarda gerçekleşen salım miktarları incelendiğinde bu yapıyı oluşturan poli-L-histidin ve poli-L-lizinin pKa değerlerine bağlı olarak sahip olduğu iyonlaşma derecesine göre her bir pH değerinde farklı salım miktarları gözlemlenmiştir. Bu çalışmada en yüksek salım miktarı pH 9,0'da en az salım miktarı ise pH 11,0'da gerçekleşmiştir. En az salım miktarının pH 11,0'de olmasının sebebi doksorubisin molekülünü bu pH'da bozulmasıdır. pH 5,5'te ise salım oranının pH 7,2-9,0 aralığına göre daha az olduğu görülmüştür.

Derişimin ilaç salım hızı üzerine etkisini belirlemek için 5 farklı değerde (12,5-100 mg) ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Hem genişletilmiş perlit partiküllerinde hem interpolimerik yapılarda gerçekleşen salım miktarları incelendiğinde derişim arttıkça salınan ilaç miktarında arttığı görülmüştür. Ayrıca derişimin artmasıyla ilaç yüklü perlit partiküllerinin ve interpolimerik yapıların ortamda bulunan doksorubisin moleküllerinin desorbe etmediği fark edilmiştir.

Sıcaklığın salım hızı üzerine etkisini belirlemek için genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapılarda 3 farklı sıcaklıkta (4,0-37,0°C) ilaç salım çalışmaları yapılmıştır. Sıcaklığın artmasıyla her iki yapıda gerçekleşen ilaç salım miktarı artmıştır. Bunun sebebi ise sıcaklığın artmasıyla doksorubisin molekülleri ile genişletilmiş perlit ve interpolimerik yapıları oluşturan polielektrolit yapılar arasındaki etkileşimin zayıflaması olarak belirtilmiştir.

Yapılan sitotoksisite çalışmaları kapsamında genişletilmiş perlit partikülleri için L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Sitotoksisite testi sonuçlarına göre genişletilmiş perlit partiküllerinin sitotoksik etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir.

Korsmeyer-Peppas, sıfır ve birinci derece modellere göre yapılan kinetik hesaplamalar sonucunda ilaç yüklü perlit partiküllerde ve interpolimerik yapılarda gerçekleşen ilaç salım profilinin Korsmeyer-Peppas ve sıfır derece salım kinetiğine uyduğu belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] A. Aghabegi Moghanjoughi, D. Khoshnevis, A. Zarrabi, A concise review on smart polymers for controlled drug release, *Drug Delivery and Translational Research*, 6 (2016) 333-340.
- [2] C. Carvalho, R.X. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P.J. Oliveira, M.S. Santos, P.I. Moreira, Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect, *Curr Med Chem*, 16 (2009) 3267-3285.
- [3] B.C. Mohanta, M.N. Javed, M.S. Hasnain, A.K. Nayak, Chapter 12 - Polyelectrolyte complexes of alginate for controlling drug release, in: A.K. Nayak, M.S. Hasnain (Eds.) *Alginates in Drug Delivery*, Academic Press 2020, pp. 297-321.
- [4] S. Chandra, L. Berntsson, *Lightweight aggregate concrete*, Elsevier 2002.
- [5] D. Pal, A.K. Nayak, Alginates, blends and microspheres: controlled drug delivery, *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, 11 Volume Set, CRC Press 2015, pp. 89-98.
- [6] D.X. Kong, X.J. Li, H.Y. Zhang, Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future, *Drug Discov Today*, 14 (2009) 115-119.
- [7] B. Schmidt, D.M. Ribnicky, A. Poulev, S. Logendra, W.T. Cefalu, I. Raskin, A natural history of botanical therapeutics, *Metabolism*, 57 (2008) S3-9.
- [8] A. Persidis, Antibacterial and antifungal drug discovery, *Nat Biotechnol*, 17 (1999) 1141-1142.
- [9] H. Rosen, T. Aribat, The rise and rise of drug delivery, *Nat Rev Drug Discov*, 4 (2005) 381-385.
- [10] *Fundamentals of Drug Delivery*, *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery* 2013, pp. 1-28.
- [11] H. Rosen, T. Aribat, The rise and rise of drug delivery, *Nature Reviews Drug Discovery*, 4 (2005) 381-385.

- [12] D.-X. Kong, X.-J. Li, H.-Y. Zhang, Where is the hope for drug discovery? Let history tell the future, *Drug Discovery Today*, 14 (2009) 115-119.
- [13] A.S. Hoffman, The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems, *J Control Release*, 132 (2008) 153-163.
- [14] M. Yokoyama, Drug targeting with nano-sized carrier systems, *Journal of Artificial Organs*, 8 (2005) 77-84.
- [15] J.H. Lee, Y. Yeo, Controlled Drug Release from Pharmaceutical Nanocarriers, *Chem Eng Sci*, 125 (2015) 75-84.
- [16] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems, *Acta Pol Pharm*, 67 (2010) 217-223.
- [17] 5 - Mathematical models of drug release, in: M.L. Bruschi (Ed.) *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing 2015, pp. 63-86.
- [18] P. M. Padmaa, J. Preethy Ani, S. Cm, C. G.V. Peter, RELEASE KINETICS – CONCEPTS AND APPLICATIONS, *IJPRT*, 8 (2018) 12.
- [19] T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52 (1963) 1145-1149.
- [20] J.W. Mauger, D. Chilko, S. Howard, On the Analysis of Dissolution Data, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 12 (1986) 969-992.
- [21] R.W. Baker, *Controlled release of biologically active agents*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- [22] B. Philipp, H. Dautzenberg, K.-J. Linow, J. Kötzi, W. Dawydoff, Polyelectrolyte complexes — recent developments and open problems, *Progress in Polymer Science*, 14 (1989) 91-172.

- [23] G.S. Macleod, J.H. Collett, J.T. Fell, The potential use of mixed films of pectin, chitosan and HPMC for bimodal drug release, *Journal of Controlled Release*, 58 (1999) 303-310.
- [24] I. Genta, P. Perugini, T. Modena, F. Pavanetto, F. Castelli, R. Muzzarelli, C. Muzzarelli, B. Conti, Miconazole-loaded 6-oxychitin–chitosan microcapsules, *Carbohydrate polymers*, 52 (2003) 11-18.
- [25] S. Lankalapalli, V.R.M. Kolapalli, Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology, *Indian J Pharm Sci*, 71 (2009) 481-487.
- [26] D. Burgess, Practical analysis of complex coacervate systems, *Journal of colloid and interface science*, 140 (1990) 227-238.
- [27] J. Joanny, M. Castelnovo, *Multilayer Thin Films*, KGaA: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, (2003) 87-97.
- [28] L. Webster, M.B. Huglin, I.D. Robb, Complex formation between polyelectrolytes in dilute aqueous solution, *Polymer*, 38 (1997) 1373-1380.
- [29] L. Webster, M.B. HUGLIN, Observations on complex formation between polyelectrolytes in dilute aqueous solution, *European polymer journal*, 33 (1997) 1173-1177.
- [30] X. Châtellier, J.-F. Joanny, Adsorption of polyelectrolyte solutions on surfaces: a Debye-Hückel theory, *Journal de Physique II*, 6 (1996) 1669-1686.
- [31] M. Voorn, Phase separation in polymer solutions, *Fortschritte Der Hochpolymeren-Forschung*, Springer 1959, pp. 192-233.
- [32] J.T.G. Overbeek, M. Voorn, Phase separation in polyelectrolyte solutions. Theory of complex coacervation, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49 (1957) 7-26.
- [33] E. Tsuchida, Formation of polyelectrolyte complexes and their structures, *Journal of Macromolecular Science—Pure and Applied Chemistry*, 31 (1994) 1-15.

- [34] V.S. Meka, M.K.G. Sing, M.R. Pichika, S.R. Nali, V.R.M. Kolapalli, P. Kesharwani, A comprehensive review on polyelectrolyte complexes, *Drug Discovery Today*, 22 (2017) 1697-1706.
- [35] E.K. Harris, *Customer service: A practical approach*, Prentice-Hall, Inc.2002.
- [36] H. Sato, M. Maeda, A. Nakajima, Mechanochemistry and permeability of polyelectrolyte complex membranes composed of poly (vinyl alcohol) derivatives, *Journal of Applied Polymer Science*, 23 (1979) 1759-1767.
- [37] M. Senuma, S. Kuwabara, K. Kaeriyama, F. Hase, Y. Shimura, Polymer complex from copolymers of acrylonitrile and ionic vinyl benzyl compounds, *Journal of applied polymer science*, 31 (1986) 1687-1697.
- [38] H. Yamamoto, Y. Senoo, Polyion complex fiber and capsule formed by self-assembly of chitosan and gellan at solution interfaces, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201 (2000) 84-92.
- [39] J. Jendrisak, *Protein purification: micro to macro*. Alan R. Liss, Inc., New York, (1987).
- [40] R.M. Cordes, W.B. Sims, C.E. Glatz, Precipitation of nucleic acids with poly (ethyleneimine), *Biotechnology progress*, 6 (1990) 283-285.
- [41] P. Dubin, J. Gao, K. Mattison, Protein purification by selective phase separation with polyelectrolytes, *Separation and Purification Methods*, 23 (1994) 1-16.
- [42] H. Yoshida, T. Kataoka, Adsorption of BSA on cross-linked chitosan: The equilibrium isotherm, *The Chemical Engineering Journal*, 41 (1989) B11-B15.
- [43] J. Chen, S. Jo, K. Park, Polysaccharide hydrogels for protein drug delivery, *Carbohydrate Polymers*, 28 (1995) 69-76.
- [44] A. Bartkowiak, D. Hunkeler, Carrageenan–oligochitosan microcapsules: optimization of the formation process, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 21 (2001) 285-298.

- [45] R. Murakami, R. Takashima, Mechanical properties of the capsules of chitosan–soy globulin polyelectrolyte complex, *Food Hydrocolloids*, 17 (2003) 885-888.
- [46] H. Dautzenberg, J. Koetz, K. Linow, B. Philipp, G. Rother, of Book: *Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology*, Springer 1994.
- [47] A.H. Shojaei, Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J Pharm Pharm Sci*, 1 (1998) 15-30.
- [48] J. Kekkonen, H. Lattu, P. Stenius, Adsorption kinetics of complexes formed by oppositely charged polyelectrolytes, *Journal of colloid and interface science*, 234 (2001) 384-392.
- [49] L. Leclercq, M. Boustta, M. Vert, A physico-chemical approach of polyanion-polycation interactions aimed at better understanding the in vivo behaviour of polyelectrolyte-based drug delivery and gene transfection, *Journal of drug targeting*, 11 (2003) 129-138.
- [50] V. Kabanov, P. Dubin, J. Bock, J. Davies, D. Schulz, *Macromolecular complexes in chemistry and biology*, Dubin, P, (1994) 151-174.
- [51] L. Wang, K.-f. Ren, H.-b. Wang, Y. Wang, J. Ji, pH-sensitive controlled release of doxorubicin from polyelectrolyte multilayers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125 (2015) 127-133.
- [52] Y. Kawashima, T. Handa, A. Kasai, H. Takenaka, S. Lin, Y. Ando, Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan, *Journal of pharmaceutical sciences*, 74 (1985) 264-268.
- [53] S. Shiraishi, T. Imai, M. Otagiri, Controlled release of indomethacin by chitosan-polyelectrolyte complex: optimization and in vivo/in vitro evaluation, *Journal of controlled release*, 25 (1993) 217-225.
- [54] I.-C. Liao, A.C. Wan, E.K. Yim, K.W. Leong, Controlled release from fibers of polyelectrolyte complexes, *Journal of Controlled Release*, 104 (2005) 347-358.

- [55] P.P. Win, Y. Shin-Ya, K.-J. Hong, T. Kajiuchi, Formulation and characterization of pH sensitive drug carrier based on phosphorylated chitosan (PCS), *Carbohydrate Polymers*, 53 (2003) 305-310.
- [56] K. Erol, E. Yıldız, İ. Alacabey, M. Karabörk, L. Uzun, Magnetic diatomite for pesticide removal from aqueous solution via hydrophobic interactions, *Environmental Science and Pollution Research*, 26 (2019) 33631-33641.
- [57] P.A. Ciullo, *Industrial minerals and their uses: a handbook and formulary*, William Andrew 1996.
- [58] O. Sengul, S. Azizi, F. Karaosmanoglu, M.A. Tasdemir, Effect of expanded perlite on the mechanical properties and thermal conductivity of lightweight concrete, *Energy and Buildings*, 43 (2011) 671-676.
- [59] F. Koçyiğit, Investigation of Thermal and Strength Properties of a Novel Composite Developed for Insulation as Building Material, *International Journal of Thermophysics*, 41 (2020) 41.
- [60] P.A. Ciullo, Two - The industrial minerals, in: P.A. Ciullo (Ed.) *Industrial Minerals and Their Uses*, William Andrew Publishing, Park Ridge, NJ, 1996, pp. 17-82.
- [61] L. Maxim, R. Niebo, E. McConnell, Perlite toxicology and epidemiology - A review, *Inhalation toxicology*, 26 (2014).
- [62] J.A. Aguilar-Garib, V. García-Onofre, U. Ortiz Mendez, Z. Valdez-Nava, Microwave Energy for Expanding Perlite Ore, *Journal of Applied Research and Technology*, 11 (2013) 823-830.
- [63] J.E. Kogel, *Industrial minerals and rocks : commodities, markets, and users*, Society for Mining, Metallurgy, and Exploration, New York, 2006.
- [64] D. Gül, *Characterization and expansion behaviour of perlite*, Izmir Institute of Technology, 2016.

- [65] S.N. Hilmer, V.C. Cogger, M. Muller, D.G. Le Couteur, The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin, *Drug Metab Dispos*, 32 (2004) 794-799.
- [66] C. Cristina, X.S. Renato, C. Susana, C. Sonia, J.O. Paulo, S.S. Maria, I.M. Paula, Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect, *Current Medicinal Chemistry*, 16 (2009) 3267-3285.
- [67] Z. Zheng, P. Pavlidis, S. Chua, V.D. D'Agati, A.G. Gharavi, An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse, *J Am Soc Nephrol*, 17 (2006) 1796-1800.
- [68] O. Tacar, P. Sriamornsak, C.R. Dass, Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems, *J Pharm Pharmacol*, 65 (2013) 157-170.
- [69] X. Yang, X. Zhang, Z. Liu, Y. Ma, Y. Huang, Y. Chen, High-Efficiency Loading and Controlled Release of Doxorubicin Hydrochloride on Graphene Oxide, *The Journal of Physical Chemistry C*, 112 (2008) 17554-17558.
- [70] R. Akçan, M.Ş. Yildirim, H. İlhan, B. Güven, U. Tamer, N. Sağlam, Surface enhanced Raman spectroscopy as a novel tool for rapid quantification of heroin and metabolites in saliva, *Turkish journal of medical sciences*, 50 (2020) 1470-1479.
- [71] A.K. Yadav, P. Singh, A review of the structures of oxide glasses by Raman spectroscopy, *RSC Advances*, 5 (2015) 67583-67609.
- [72] Y. Cai, X. Piao, W. Gao, Z. Zhang, E. Nie, Z. Sun, Large-scale and facile synthesis of silver nanoparticles via a microwave method for a conductive pen, *RSC Advances*, 7 (2017) 34041-34048.
- [73] G. Das, A. Nicastri, M.L. Coluccio, F. Gentile, P. Candeloro, G. Cojoc, C. Liberale, F. De Angelis, E. Di Fabrizio, FT-IR, Raman, RRS measurements and DFT calculation for doxorubicin, *Microscopy Research and Technique*, 73 (2010) 991-995.

- [74] I. Ashikawa, K. Itoh, Raman spectra of polypeptides containing L-histidine residues and tautomerism of imidazole side chain, *Biopolymers*, 18 (1979) 1859-1876.
- [75] T.-J. Yu, J.L. Lippert, W.L. Peticolas, Laser Raman studies of conformational variations of poly-L-lysine, *Biopolymers*, 12 (1973) 2161-2176.