

**MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRİYOJEL DİSKLERDEN
KURKUMİNİN KONTROLLÜ SALIMI**

**CONTROLLED DELIVERY OF CURCUMIN FROM
MOLECULARLY IMPRINTED CRYOGEL DISCS**

Gözde DERELİ

PROF. DR. Adil DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRİYOJEL DİSKLERDEN KURKUMİNİN KONTROLLÜ SALIMI

Gözde DERELİ

Doktora, Biyomühendislik Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Temmuz 2021, 113 sayfa

İlaç ile ilgili araştırmalarda, hastalıkların tedavisi için yeni moleküller geliştirmek kadar bu ilaçların hastalara verilmiş şekilleri de önemlidir. Son yıllarda ilaç dozunu minimuma indirmek, dozlama periyodunu uzatmak, hastanın yan etkilerden etkilenmemesini sağlamak amacıyla kontrollü ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir. Kontrollü salım sistemlerini hazırlamakta kullanılan biyomalzemeler, doğal veya sentetik olarak elde edilebilen polimerik sistemlerdir. Bu sistemlerden birisi olan kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan üç boyutlu, makro gözenekli, ağ yapılı ve çapraz bağlı jel matrislerdir. Kriyojeller, yüksek hidrofilitiklik, suda çözünmeden önemli ölçüde şişebilme, biyoyumluluk, esneklik ve yüksek mekanik kararlılığa sahip olma gibi avantajlarıyla kontrollü ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılan malzemelerdir. Moleküler baskılama teknolojisi, doğal ya da sentetik bir bileşikten oluşan kalıp moleküle özgün tanıma bölgelerine sahip akıllı polimerik sistemler oluşturma yöntemidir. Moleküler baskılanmış polimerlerin yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılıkları, geri besleme kontrol mekanizmaları ve kalıp moleküle özgü üç boyutlu boşlukları sayesinde enantioseçicilik gibi benzersiz avantajları, ilaç salım sistemlerinde kullanılmasına neden olur. Kurkumin, zencefil ailesinin bir üyesi olan zerdeçal olarak bilinen Doğu Hindistan bitkisi *Curcuma longa*'dan izole

edilmektedir. Kurkumin, antioksidan, antikanser, antimikrobiyal, antidiyabetik ve antiinflamatuvar aktiviteler gibi birçok uygulamada sıklıkla yer almaktadır.

Sunulan tezde, suda çözünmeyen bir polifenol olan kurkuminin in vitro salımını incelemek için farklı monomer oranları, farklı çapraz bağlayıcı oranları ve farklı ilaç miktarları ile kurkumin baskılı kriyojel diskler hazırlanmıştır. Bu disklerin polimerizasyon verimi %93 olarak bulunmuştur. Farklı pH ve sıcaklık ortamlarında salım davranışları incelenmiş ve pH 7.4 ve 37 °C en uygun salım koşulları olarak belirlenmiştir. Disklerin şişme özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla 4 °C, 25 °C, 37 °C ve 42 °C olmak üzere dört farklı sıcaklıkta deneyler gerçekleştirilmiş; buradan şişme ve makrogözenek oranları verilerine ulaşılmıştır. Monomer oranı ve çapraz bağlayıcı oranı arttıkça kriyojel disklerin şişme oranları azalmıştır. Kurkumin baskılanmış PHEMA temelli kriyojel disklerin yapısal karakterizasyonu FTIR, SEM, BET, DSC, XRD ve Micro-CT ile yapılmıştır. FTIR spektrumunda yapıdaki kurkuminin varlığı değerlendirilmiştir. Kriyojel disklerin SEM görüntülerinde monomer oranı ve farklı çapraz bağlayıcı oranı arttıkça gözenek çaplarının küçüldüğü gözlemlenmiştir. BET cihazı ile gerçekleştirilen yüzey alanı ölçümlerinde, yapıdaki monomer oranı arttıkça kriyojel disklerin yüzey alanlarının arttığı; kriyojel disklerin içerdiği çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça yüzey alanlarının azaldığı görülmüştür. DSC termogramları incelendiğinde termal kararlılık, XRD spektrumlarında ise polimerik yapının amorf olduğu; ancak kurkuminin kristalin yapısını polimerik yapı içerisinde koruduğu, ilacın polimerik yapı içerisinde homojen olarak dağıldığı bilgilerine ulaşılmıştır. Micro-CT ile anlık görüntüleri alınan kriyojel disklerde daha az monomer oranına sahip kriyojel disklerin daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu yorumlanmıştır. Monomer oranı ve çapraz bağlayıcı oranı arttıkça salım hızı ve miktarında düşüş gözlenmiştir. Polimerik yapıya yüklenen ilaç miktarı arttıkça derişim farkının artması ile sürücü kuvvet artmakta ve buna paralel olarak da salınan ilaç miktarı önemli ölçüde artmaktadır. Fare fibroblast hücre hattı L929 kullanılarak yapılan sitotoksikite çalışmalarında kurkumin yüklenmiş kriyojel diskler sitotoksik olarak değerlendirilmemiştir. MDA MB 231 meme kanser hücre hattı ile yapılan hücre canlılığı çalışmalarında ölü hücreler özel boyama yöntemiyle görüntülenmiş ve kurkumin yüklü kriyojel disklerin bu hücre hattı üzerinde canlılığı %75-80 oranında azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Antibakteriyel özelliğın

incelenmesi için yapılan incelemede kurkumin içermeyen PHEMA ve NIP disklerin etrafında herhangi bir zon oluşumu gözlenmezken kurkumin yüklenmiş MIP disk etrafındaki zon oluşumu kurkuminin antibakteriyel özelliğine işaret etmektedir. Floresan ataçmanlı mikroskop altında yapılan görüntüleme kurkuminin floresan özelliği nedeniyle ışımaya yaptığı, yapıdaki kurkumin miktarı arttıkça da bu ışımamanın arttığı gözlenmiştir. Salım kinetiği hesaplamalarında difüzyon üsteli olan n değeri genel olarak 0,5'ten büyük bulunmuş; bu doğrultuda difüzyon mekanizmasının Fickian olmayan (non-Fickian) difüzyon olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kurkumin, Kontrollü İlaç Salımı, Moleküler Baskılama, Kriyojeller

ABSTRACT

CONTROLLED DELIVERY OF CURCUMIN FROM MOLECULARLY IMPRINTED CRYOGEL DISCS

Gözde DERELİ

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

July 2021, 113 pages

In the drug research area, the way these drugs are administered to patients is as important as developing new molecules for the treatment of diseases. In recent years, controlled drug release systems have been developed in order to minimize the drug dose, extend the dosing period, and ensure that the patient is not affected by side effects. Biomaterials used to prepare controlled release systems are polymeric systems that can be obtained naturally or synthetically. Cryogels as one of these systems are three-dimensional, macroporous, networked and cross-linked gel matrices prepared using partially frozen monomer or polymer solutions. Cryogels are a widely used material in controlled drug release systems with their advantages such as high hydrophilicity, swelling without dissolving in water, biocompatibility, flexibility and high mechanical stability. Molecular imprinting technology is a method of creating intelligent polymeric systems with specific recognition sites for the template molecule, consisting of a natural or synthetic compound. The unique advantages of molecularly imprinted polymers such as their high physical and chemical stability, their feedback control mechanism, and their enantioselectivity thanks to their three-dimensional cavities specific to the

template molecule cause to use in the drug release systems. Curcumin is isolated from the East Indian plant *Curcuma longa*, known as turmeric, which is a member of the ginger family. Curcumin is frequently involved in many applications such as antioxidant, anti-cancer, anti-microbial, anti-diabetic and anti-inflammatory activities.

In the presented thesis, curcumin-imprinted cryogel discs are prepared with different monomer ratios, different crosslinker ratios, and different drug amounts in order to examine the *in vitro* release of curcumin, a water-insoluble polyphenol. The polymerization efficiency of these discs is found to be 93%. The release behavior at different pH and temperature environments are investigated and pH 7.4 and 37°C are determined as the most suitable release conditions. In order to determine the swelling properties of the discs, experiments are carried out at four different temperatures: 4 °C, 25 °C, 37 °C and 42 °C. The swelling and macropore ratios data are calculated. The swelling ratio of the cryogel discs are decreased with increasing the monomer ratio and crosslinker ratio. Structural characterization of curcumin-imprinted PHEMA-based cryogel discs are performed using FTIR, SEM, BET, DSC, XRD and Micro-CT. The presence of curcumin in the structure of cryogels are evaluated in the FTIR spectrum. In the SEM images of the cryogel discs, it is observed that the pore diameters decreased as the monomer ratio and different crosslinker ratio are increased. In the surface area measurements performed with the BET device, it was observed that as the monomer ratio in the structure increased, the surface area of the cryogel discs increased; as the amount of crosslinker contained in the cryogel discs increased, their surface area decreased. When the DSC thermograms are examined, it is showed that the thermal stability and the polymeric structure are amorphous in the XRD spectra; however, it is found that curcumin preserves its crystalline structure in the polymeric structure and that the drug is homogeneously dispersed in the polymeric structure. It has been interpreted that the cryogel discs with less monomer ratio in the cryogel discs whose snapshots were taken with micro-CT have a more porous structure. As the monomer ratio and crosslinker ratio are increased, the release rate and amount are decreased. The release rate is increased with increasing the amount of the monomer ratio and crosslinker ratio. With the increase of the drug-loaded amount on the polymeric structure, the driving force is increased. Therefore, with the increase of the

concentration difference, the releasing amount of the drug is significantly increased. Curcumin-loaded cryogel discs are not evaluated as cytotoxic in cytotoxicity studies using the mouse fibroblast cell line L929. In cell viability studies with MDA MB 231 breast cancer cell line, dead cells are visualized by special staining method. It is concluded that cryogel discs loaded with curcumin is reduced the viability on this cell line by 75-80%. In the examination carried out to examine the antibacterial property, no zone formation is observed around the PHEMA and NIP discs without curcumin, while the formation of the zone around the curcumin-loaded MIP disc is indicated the antibacterial property of curcumin. In the imaging performed under the microscope with fluorescent attachment, it is observed that curcumin radiated due to its fluorescent property and this radiation is increased as the amount of curcumin in the structure increased. In the emission kinetic calculations, the value of n , which is the diffusion exponent, is generally found to be greater than 0.5. Accordingly, it is concluded that the diffusion mechanism is non-Fickian diffusion.

Keywords: Curcumin, Controlled Drug Delivery, Molecular Imprinting, Cryogels.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvarını bana açan, tüm bilgi birikimini içtenlikle aktaran, her zaman beni bir baba şefkatiyle karşılayan çok değerli Hocam Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Doktora eğitimimde daha ilk ders dönemlerinde kendime rol model olarak belirlediğim, en az disiplinli kişiliği kadar sevgi dolu davranışlarıyla da bana birçok yol açan, içtenlikle, bıkmadan usanmadan tüm sorularıma yanıt veren çok kıymetli Hocam Doç. Dr. Nilay BERELİ'ye,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Dr. Monireh Bakhshpour'a, Bu süreçte en karamsar olduğum anlarda bana destek olan arkadaşlarım Dr. Mitra JALILZADEH, Dr. Ali ARAZ, Dr. Duygu ÇİMEN ve Dr. Semra AKGÖNÜLLÜ'ye,

Değerli BIOREG ailesi çalışma arkadaşlarıma,

Yıllardır çalışmalarım için beni destekleyen, bu süreçte her zaman maddi manevi yanımda olmaya çalışan canım arkadaşlarım Esra AKIN ve Sinem ÇELİK TÜRK'e,

Küçüklüğümde beri önümde bana mükemmel bir örnek olan, kişiliği ve başarılarına hayran olduğum ablam Dr. Gamze DERELİ CAN'a,

Beni sonsuz bir sevgiyle büyütüp bugünlere getiren, her başarımda mutlaka katkısı olan, tüm nahiflikleriyle bana her günümde destek olan çok kıymetli annem Aysel DERELİ ve babam Yaşar DERELİ'ye varlıklarına şükrederek,

Ve sevgiyle, şefkatle, merhametle; bir gün, bir yerde hayatıma dokunmuş olan herkese,

Gönülden teşekkür ederim.

Gözde DERELİ

Temmuz 2021, Ankara

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kontrollü İlaç Salımı.....	4
2.1.1. Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması.....	8
2.1.1.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler	9
2.1.1.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler	11
2.1.1.3. Çözücünün Harekete Geçirdiği Sistemler	12
2.1.1.4. Diğer Sistemler.....	16
2.1.1.5. Uygulama Yerine Göre Sistemler	17
2.2. KURKUMİN VE ZERDEÇAL.....	20
2.2.1. Tarihçe.....	21
2.2.2. Kimyasal ve Metabolik Yapısı, Biyoyararlanım, Eliminasyon.....	23
2.2.3. Kullanım Alanları.....	26
2.3. Moleküler Baskılama	32
2.4. Hidrojeller ve Kriyojeller	37
2.4.1. Hidrojeller	37
2.4.2. Kriyojeller	40
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	48
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
3.2. PHEMA Kriyojel Disklerin Hazırlanması	48

3.3. Kurkumin Baskılanmış Poli(HEMA-MAH-Cu ²⁺) Kriyojel Disklerin Hazırlanması	50
3.3.1. MAH-Cu ²⁺ Kompleksinin Hazırlanması	50
3.3.2. MAH-Cu ²⁺ : Kurkumin Kompleksinin Hazırlanması.....	51
3.3.3. Kurkumin Baskılanmış PHEMA Temelli Kriyojel Disklerin Hazırlanması	51
3.3.4. Polimerizasyon Veriminin Hesaplanması.....	53
3.4. Kurkumin Baskılanmış PHEMA Temelli Kriyojellerin Karakterizasyonu	53
3.4.1. FTIR ile Yapı Analizi	53
3.4.2. Yüzey Alanı ve Ölçümü	53
3.4.3. Şişme Özelliklerinin İncelenmesi	54
3.4.4. Yüzey Morfolojisi.....	54
3.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	55
3.4.6. X-Işınları Difraktometresi (XRD)	55
3.4.7. Bilgisayarlı Mikrotomografi (Micro-CT)	55
3.5. Kriyojel Disklerin In Vitro Sistotoksisite Testleri	56
3.6. Kriyojel Disklerin Hücre Canlılığı Testleri	56
3.7. Antibakteriyel Özelliğin İncelenmesi	57
3.8. In vitro Kurkumin Salım Çalışmaları	58
3.10. Kurkuminin Floresan Özelliğinin Gösterilmesi.....	58
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	59
4.1. MAH-Cu ²⁺ : Kurkumin Kompleksinin Karakterizasyonu	59
4.2. Kurkumin Baskılanmış PHEMA Temelli Kriyojel Disklerin Karakterizasyonu	60
4.2.1. FTIR ile Yapı Analizi	60
4.2.2. Şişme Deneyi	63
4.2.3. Yüzey Alanı Ölçümü	66
4.2.4. Yüzey Morfolojisi.....	68
4.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)	72
4.2.6. X-Işınları Difraktometresi (XRD)	74
4.2.7. Bilgisayarlı Mikrotomografi (Micro-CT)	76
4.3. Polimerizasyon Verimi	78
4.4. In Vitro Salım Kinetiğinin İncelenmesi.....	78

4.4.1. Farklı pH'ların Salım Davranışı Üzerine Etkisi.....	79
4.4.2. Monomer Oranının Salım Üzerine Etkisi.....	80
4.4.3. Çapraz Bağlayıcı Oranı Değişiminin Salım Üzerine Etkisi.....	82
4.4.4. Sıcaklık Parametresinin Salım Üzerine Etkisi	84
4.4.5. İlaç Yükleme Miktarının Salım Üzerine Etkisi.....	85
4.5. Sitotoksisite Çalışmaları.....	88
4.7. Hücre Canlılığı Çalışmaları.....	89
4.8. Antibakteriyel Özelliğin İncelenmesi.....	91
4.9. Kurkuminin Floresan Özelliği.....	92
5. YORUM.....	94
6. KAYNAKLAR.....	99
EKLER.....	112
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	112
ÖZGEÇMİŞ	113

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kontrollü salım ve terapötik pencere.....	4
Şekil 2.2. İlaç Salım Sistemleri.....	9
Şekil 2.3. <i>Curcuma longa</i> Linn bitkisi, zerdeçal ve kurkumin	21
Şekil 2.4. Kurkuminin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.5. Kurkumin biyoyararlanımını artırmak için potansiyel uygulama stratejileri .	25
Şekil 2.6. Kurkuminin çeşitli terapötik etkileri ve hedefleri [70].....	27
Şekil 2.7. Avantajları ile birlikte kurkuminin çeşitli olası formülasyonları [90].....	29
Şekil 2.8. Moleküler baskılanmanın şematik gösterimi.....	32
Şekil 2.9. Kriyopolimerizasyonun şematik gösterimi.....	42
Şekil 2.10. Farklı gözenek boyutu dağılımına sahip kriyojellerin şematik gösterimi	44
Şekil 2.11. Moleküler baskılanmış kriyojel hazırlanması.....	45
Şekil 3.1. Sentezlenen PHEMA kriyojel diskler.....	49
Şekil 4.1. UV-Spektrometre ile MAH-Cu ²⁺ : kurkumin kompleksinin analizi	59
Şekil 4.2. Örtüştürülmüş FTIR spektrumu.....	61
Şekil 4.3. Kurkuminin FTIR spektrumu	61
Şekil 4.4. NIP kriyojel disklerin FTIR spektrumu.....	62
Şekil 4.5. MIP kriyojel disklerin FTIR spektrumu	63
Şekil 4.6. Farklı özelliklerde hazırlanan kriyojel disklerin kurutma sonrası 25 °C'de suya daldırıldığında zamana bağlı kütle değişimleri.....	64
Şekil 4.7. Farklı özelliklerde hazırlanan kriyojel disklerin farklı sıcaklıklarda şişme oranları	66
Şekil 4.8. PHEMA kriyojel disklerin farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri; a) 400 büyütme b) 1000 büyütme c) 2000 büyütme	68
Şekil 4.9. NIP Kriyojel disklerin SEM görüntüleri; a) NIP1 kriyojel disk, 2000 büyütme, b) NIP2 kriyojel disk, 2000 büyütme, c) NIP1 kriyojel disk, 5000 büyütme, d) NIP2 kriyojel disk, 5000 büyütme	69
Şekil 4.10. n _{HEMA} /n _{MBAAm} =6 oranına sahip MIP kriyojel disklerin SEM görüntüleri; a) MIP1, 1000 büyütme, b) MIP2, 1000 büyütme c) MIP3, 1000 büyütme, d) MIP1, 5000 büyütme, e) MIP2, 5000 büyütme, f) MIP3, 5000 büyütme.....	70

Şekil 4.11. %8 monomer oranına sahip MIP kriyojel disklerin SEM görüntüleri; a) MIP1, 2000 büyütme, b) MIP1, 5000 büyütme, c) MIP5, 2000 büyütme, d) MIP5, 5000 büyütme e) MIP6, 2000 büyütme, f) MIP6, 5000 büyütme	71
Şekil 4.12. PHEMA kriyojel diskin DSC termogramı	72
Şekil 4.13. NIP kriyojel diskin DSC termogramı	72
Şekil 4.14. Kurkuminin DSC termogramı	73
Şekil 4.15. Kurkumin yüklenmiş kriyojel diskin DSC termogramı, derişim: 1 mg/mL	73
Şekil 4.16. PHEMA kriyojel disklerin XRD desenleri	74
Şekil 4.17. NIP kriyojel disklerin XRD desenleri	74
Şekil 4.18. Kurkuminin XRD desenleri	75
Şekil 4.19. 1.0 mg kurkumin yüklü MIP kriyojel disklerin XRD desenleri	76
Şekil 4.20. Farklı monomer oranına sahip kriyojel disklerin mikro-CT çıktılarının anlık görüntüleri, a) MIP1 kriyojel disk, b) MIP2 kriyojel disk, c) MIP3 kriyojel disk	77
Şekil 4.21. Ortam pH'sının kurkumin salım hızına etkisi (T: 37°C, %12 monomer oranı)	79
Şekil 4.22. Farklı monomer oranlarının kurkumin salım hızına etkisi (pH: 7.4, T: 37°C)	81
Şekil 4.23. $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$ oranının toplam salıma etkisi (pH: 7.4, T: 37 °C).....	83
Şekil 4.24. Sıcaklığın toplam ilaç salımına etkisi (pH:7.4, $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=6$)	84
Şekil 4.25. MIP3 kriyojel disklerde kurkumin yükleme oranının toplam salıma etkisi (pH: 7.4, T:37 °C, $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=6$)	86
Şekil 4.26. MIP1 kriyojel disklerde kurkumin yükleme miktarının toplam salıma etkisi (pH: 7.4, T: 37 °C, $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=6$)	87
Şekil 4.27. 12 ve 24 saat sonra MIP, NIP ve PHEMA kriyojel diskler ile muamele edilen hücre hatlarının canlılığı	89
Şekil 4.28. MTT testinde 48 saat sonunda kontrol PHEMA, NIP ve MIP gruplarında hücre canlılığı ölçümü	90
Şekil 4.29. NIP ve MIP kriyojel diskler ile propidium iyodür boyama ve ışık mikroskobu görüntüleri	91
Şekil 4.30. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel özelliğın incelenmesi ve kurkumin baskılanmış kriyojel disklerin etrafında oluşan zonlar	92

Şekil 4.31. Floresan mikroskop altında kurkumin yüklenmiş MIP kriyojel disklerin görüntüleri..... 93

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kontrollü Salım Sistemleri.....	8
Çizelge 2.2. Kurkuminin fiziksel ve kimyasal özellikleri	23
Çizelge 2.3. Hidrojeller için Karakterizasyon Parametreleri [123].....	40
Çizelge 3.1. Farklı tipte hazırlanmış kriyojel disklerin polimerizasyon reçeteleri.	52
Çizelge 4.2. Farklı özelliklerde hazırlanan kriyojel disklerin 25 °C’de gerçekleştirilen şişme deneylerinde zamana bağlı kütle değişimleri.....	64
Çizelge 4.3. Kriyojel disklerin 25°C’de şişme ve makrogözeneklilik oranları.....	65
Çizelge 4.4. Kriyojel disklerin farklı sıcaklarda şişme yüzdeleri.	66
Çizelge 4.1. Kriyojel disklerin yüzey alanı ölçümleri.....	67
Çizelge 4.5. Hesaplanmış net ıslak/kuru polimer ağırlıkları ve polimerizasyon verimi.	78
Çizelge 4.6. Farklı pH’larda kriyojeller için kurkumin salım kinetik verileri.	80
Çizelge 4.7. Farklı monomer oranında hazırlanmış kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.	81
Çizelge 4.8. Farklı çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak hazırlanmış kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.....	83
Çizelge 4.9. Farklı sıcaklıklarda kriyojel disklerden kurkumin salımı kinetik verileri... ..	85
Çizelge 4.10. Farklı miktarlarda kurkumin yüklenmiş MIP3 kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.....	87
Çizelge 4.11. Farklı miktarlarda kurkumin yüklenmiş MIP1 kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

M_t	t zamanında salınan ilaç kütlesidir
M_∞	salınan ilacın toplam kütlesi
k	kinetik sabit
n	difüzyon üsteli

Kısaltmalar

5-FU	5-florourasil
APS	Amonyum Persülfat
BET	Brunauer–Emmett–Teller Yüzey Alanı Analizi
COX	Sikloksijenaz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
ELISA	Otomatik Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Tahlili
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FTIR	Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
Gd-DOTA	Gadolinium-DOTA
GI	Gastrointestinal
HÜNİTEK Merkezi	Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi
IF	Baskılama Faktörü
MAH	N-metakriloil-(L)- histidin metil ester
MBAAm	N',N'-metilen-bisakrilamid

MED	Minimum Etkili Derişim
MHA	Mueller Hinton Agar
MIP	Moleküler Baskılanmış Polimer
MIT	Moleküler Baskılama Teknolojisi
Micro-CT	Bilgisayarlı Mikrotomografi
MMC	Mitomisin C
MTD	Minimum Toksik Derişim
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
NIP	Moleküler Baskılanmamış Polimer
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS	Phosphate Buffered Saline-Fosfat Tuz Tamponu
PEG	polietilenglikol
PHEMA	polihidroksietil metakrilat
PLGA	poli(laktik-ko-glikolik asit)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TEMED	N, N, N', N' tetrametiletildiamin
TGA	Termogravimetrik Analiz
XRD	X-Işınları Difraktrometresi

1. GİRİŞ

Hastalık süreçleri ve yaşlanma, patolojilerin günlük yaşam üzerindeki etkilerini ortadan kaldırmak veya iyileştirmek için terapötik müdahale gerektirmektedir. Yaşlanma, kademeli bir dejenerasyon ve daha sonra vücudun kontrol sistemlerinin dengesinin değişmesi ile ilişkilidir. İlaçlar, dozun ve erişimin yeterli olması şartıyla hücrel hedeflerle etkileşime giren; hücrel süreçleri seçimli olarak büyüten veya genellikle daha fazla bloke eden bir etki üretmek için yararlı terapötik maddelerdir. Bu, hasta konforunu artırmak için yaşlanma ve patoloji dengesini azaltır. Uygulama için hedef pencereyi hesaplamak amacıyla ilacın sunumu ve etkisi arasındaki ilişki matematiksel olarak tanımlanarak kullanılabilir; bununla birlikte hem patolojik süreçler hem de yaşlanma, vücudun işlev ve yapısında değişiklikler meydana geldikçe maruziyeti değiştirebilir ve bu da ilaç etkinliğinin kontrolünün zorlaşmasına neden olur [1].

Kontrollü ilaç salım sistemleri, ilacın belirli bir süre boyunca önceden kontrol edilen bir oranda etki alanına iletilmesini amaçlayan taşıma sistemi olarak kabul edilir. Uygun terapötik plazma-ilaç konsantrasyonunu korurken gerekli terapötik etkiyi elde etmek için kontrollü ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesinin gerekli olduğu bilinmektedir. Çalışmalar, daha iyi ilaca maruz kalma kontrolünün sağlanması, biyolojik bariyerler boyunca en iyi ilaç geçirgenliğinin değerlendirilmesi, ilacı istenen etki alanına ulaştırmanın garantisi gibi kontrollü ilaç salım sistemlerinin kullanımıyla elde edilebilecek çeşitli avantajların olduğunu göstermiştir [2].

Biyomoleküler tanıma, antijen-antikor etkileşimleri, sinyal iletimi, enzimatik kataliz, protein sentezi, DNA replikasyonu gibi doğal sistemlerin hayati işlevlerinde sıklıkla gözlenir. Moleküler baskılama teknolojisi (MIT), biyomoleküler tanımanın sentetik bir karşılığıdır. MIT, kalıba spesifik tanıma bölgelerine sahip polimerlerin, yani moleküler olarak baskılanmış polimerlerin (MIP'lar), şablon molekülün varlığında fonksiyonel monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların kopolimerizasyonu ile üretildiği bir işlemdir. MIP'lar, hedef moleküle yalnızca yüksek düzeyde seçici tanıma sunmakla kalmaz, aynı zamanda dikkate değer sağlamlık ve kararlılık da sunar. Bu nedenle MIP'lar

kromatografi, simüle enzim katalizi, biyosensörler, antikor mimikleri dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal ve biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca, MIP'ların fonksiyonel monomerleri ile kalıp molekül olan ilaç molekülleri arasındaki spesifik etkileşimler, ilaç salım hızını azaltabilir ve bu da MIP'ların ilaç salım sistemleri olarak avantajlı kullanımına izin verir [3].

Kriyojeller, bir başlatıcı/aktivatör sistemi kullanılarak, foto veya elektron ışını başlatma ile yarı donmuş halde yerinde serbest radikal polimerizasyonunda sentezlenen üç boyutlu mega gözenekli hidrojel matrisleridir. Polimerizasyon, donmuş suda çözünür monomer/polimer solüsyonunda meydana gelir, burada kriyojelasyon buz kristalleri arasındaki ara boşluklarda gerçekleşir. Oluşan buz kristalleri porojen görevi görür ve çözülmeden sonra birbirine bağlı gözeneklerden oluşan bir polimer ağı oluşur [29]. Kriyojellerin, büyük gözenek boyutları (100 µm'ye kadar), esneklik ve yüksek mekanik mukavemet, biyoyumluluk, kısa difüzyon yolu gibi parlak özellikleri, onları biyolojik ayırma ve saflaştırma prosesleri için vazgeçilmez kılmıştır. Kriyojellerin makro gözenekli yapısı, makro moleküler bileşiklerin etkin kütle taşınımını ve hücrelerin göçünü, yüksek biyoyumluluğu ve iyi mekanik özellikleri sağlar [4].

Doğal ürünler binlerce yıldır geleneksel ilaçlarda kullanılmaktadır ve yeni ilaçların geliştirilmesi için bir bileşen kaynağı olarak umut vaat etmektedir. Zerdeçal (*Curcuma longa* Linn), Zingiberaceae familyasının bir üyesidir ve yetiştirilmektedir. Hindistan, Güneydoğu Asya ve Endonezya kökenlidir [5]. Kurkumin [1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-hepta-1,6-dien- 3,5-dion] Hint bölgesinden elde edilen yaygın bir baharat olan zerdeçaldan elde edilen hidrofobik polifenolik bir bileşiktir. Zerdeçalın sarımsı turuncu rengi, kurkuminoidlerin (curcumin, demethoxycurcumin ve bisdemethoxycurcumin) aktif bileşiklerinden gelir. Kurkumin Hindistan'da bir halk ilacı olarak önemli bir rol oynamaktadır ve halen Ayurveda adı verilen bir macun formu olarak göz enfeksiyonlarını tedavi etmek, yaraları sarmak, ısırık, yanık, akne ve cilt hastalıklarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. Kurkuminin antioksidan aktivite, Alzheimer hastalığı tedavisi, inflamasyon, kemoprevensiyon, antimikrobiyal aktivite, antidiyabetik, hipoglisemik ve kolesterol düşürücü etkileri ve kemoterapi gibi sağlığa

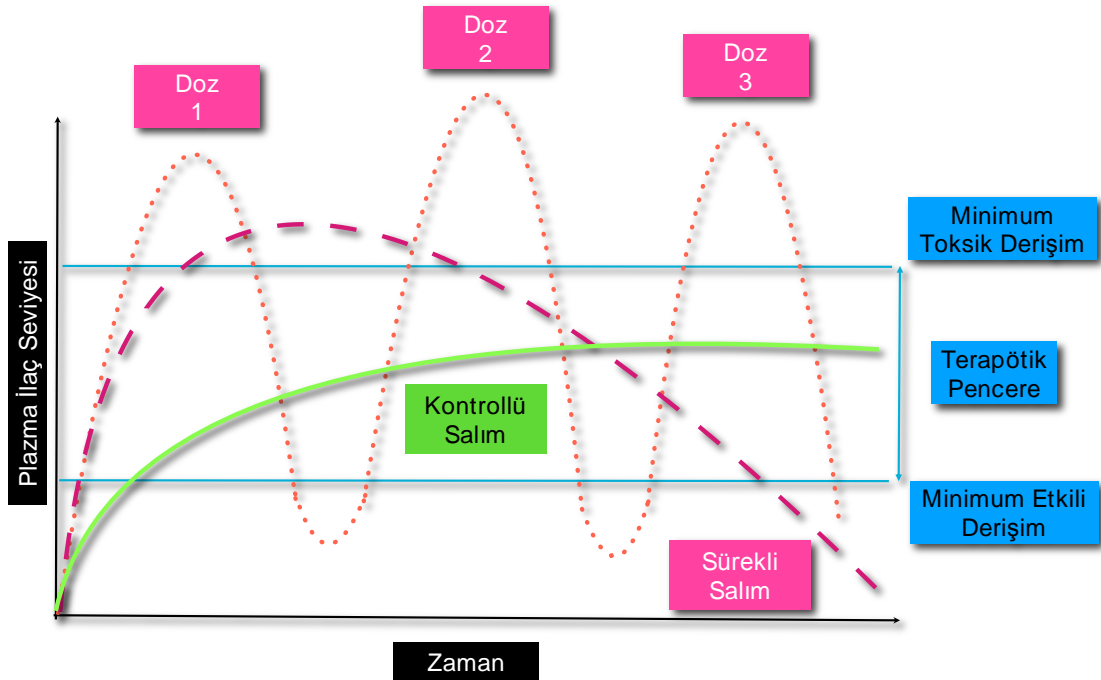
etkileri için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Antikanser potansiyeli in vitro çalışmalarla da gösterilmiştir [6].

Sunulan tez çalışması kapsamında, kontrollü ilaç salım sistemi olarak tasarlanmış olan hacimce farklı monomer oranlarına, molce farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip ve farklı ilaç miktarları içeren kurkumin baskılanmış poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) kriyojel disklerin hazırlanması ve bu disklerden kurkuminin salımı farklı koşullar altında incelenmiştir. Amino asit türevi olan N-metakriloil-(L)- histidin metil ester (MAH) monomeri fonksiyonel monomer olarak seçilmiş ve metal şelat yöntemi ile bakır (II) aracılığıyla kalıp molekül olan kurkumin ile kompleks oluşturmuştur. Kriyopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanan farklı monomer oranı, farklı çapraz bağlayıcı ve ilaç miktarlarına sahip bu polimerik disklerin salım davranışlarının değerlendirilmesi amacıyla farklı sıcaklık ve pH ortamlarında salım kinetiği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kontrollü İlaç Salımı

Tıbbi ilaç tedavisinin temel amacı enfeksiyon, inflamasyon, yaralanma etkilerini yavaşlatmak ve bazen tersine çevirmek ve bazı hastalıklarda genetik yatkınlığa karşı koymaktır. Geleneksel yöntemlerde ilaç uygulaması, enjeksiyon ya da tablet veya kapsüllerin ağızdan alımı şeklindedir; ki bu yöntemler tekrarlanan ve sık dozlarda ilaç alımını gerektirmektedir. Plazmadaki ilaç derişimi başlangıçta bir süre artar, sonra çok kısa bir süre sabit kalır ve daha sonra hızla azalır. Etkin düzeyin altındaki ve toksik düzeydeki bölgeler boşa harcanmış ilaç miktarlarını ifade eder. Etkin düzey ile ifade edilen kısım minimum etkili derişim (MED) ile minimum toksik derişim (MTD) arasında yer alan terapötik pencere olarak adlandırılır ve terapötik bir ajanın plazma konsantrasyonu bu aralıkta tutulmalıdır. İlaç salım sistemleri bu iki ana derişim noktasına odaklanır [7].



Şekil 2.1. Kontrollü salım ve terapötik pencere.

Kontrollü ilaç salımı bir ilacın doğru dozda, doğru yerde ve doğru zamanda kullanılarak hastalıkların tedavi edilmesini amaçlamaktadır. Yeni bir ilaç geliştirildiğinde, bu ilaç genellikle amaçlanan hastalığın tedavisinde etkili olabilecek en basit dozaj formunda formüle edilmektedir. Farklı ilaçlar, farklı formülasyonlar gerektirebilecek farklı fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir [8]. İlaç salım sistemlerinin özellikleri de ilacın bu özelliklerine ve amaçlanan uygulama yoluna ulaşmak üzere uyarlanabilir.

Hastalıkları tedavi etmek veya bu hastalıkların semptomlarını hafifletmek için farmakolojik etkileri olan yeni bir kimyasal varlığın keşfi, ilaç geliştirme sürecindeki ilk adımdır. Yeni bir ilaç geliştirilirken, istenen miktarda terapötik ajanın belirli bir zaman içinde hedefe verilmesi de keşfi kadar önemlidir. Terapötik ajanın uygulama yöntemi, etkinliğini önemli ölçüde etkilediğinden en uygun terapötik sonuçların elde edilebilmesi, önceden belirlenmiş bir hız ve istenen yerde optimal ilaç derişimi elde edilebilmesi, iyi tasarlanmış bir uygulama sistemini gerektirmektedir [9].

İyi tasarlanmış bir ilaç salım teknolojisi, doz sıklığında azalma, ilacın salım zamanı içinde daha homojen etki, ilaç yan etkilerinin azaltılması, dolaşım sistemi içerisindeki ilaç seviyelerinde istenmeyen dalgalanmaların azaltılması ve bir ilacın veya formülasyonun ticari değerinin artırılması gibi avantajlar sağlamaktadır. İlaç salım sistemlerinin dezavantajları arasında ise yüksek maliyetler ve bazen klinisyen veya hastanın dozajları ayarlama kabiliyetinin düşük olması bulunmaktadır [1].

İdeal kontrollü salım sistemlerinin aşağıdaki özelliklere sahip olması beklenir:

- (1) İlaç derişimini etkili terapötik pencere içinde tutmak;
- (2) Hedef bölge dışındaki yan etkileri azaltmak ve etkiyi arttırmak için terapötik ajanı istenen hedefe lokalize etmek;
- (3) Gerekli doz sayısını azaltarak geliştirilmiş uyum;
- (4) Kendi başlarına uygulandığında plazmadan tamamen temizlenebilme veya bozunma kabiliyeti [10].

İlaç salım mekanizmalarında özellikle oral ve transdermal dozaj formları hakkındaki temel anlayışın çoğu, 1950'den 1980'e kadar olan ilk nesil gelişme aşamasında elde edilmiştir. Bu dönemde çok sayıda oral ve transdermal kontrolün gelişimini hızlandıran dört ilaç salım mekanizması tanımlanmıştır. İlk nesil salım sistemlerinde amaç salım sistemlerinin fizikokimyasal özelliklerini kontrol etmeyi başarmaktır ve 1950-1980 yılları arasında kontrollü salımın temelleri olarak anılmıştır [8].

İkinci nesil salım sistemlerinde amaç biyolojik bariyerlerin üstesinden gelmektir ve 1980-2010 yılları arasında akıllı salım sistemleri olarak anılmaktadır. Birinci nesil ilaç salım formülasyonlarıyla karşılaştırıldığında, ikinci nesil teknolojiler, üretilen klinik ürün sayısı ile ölçüldüğünde daha az başarılı olmuştur. Bunun nedenlerinden biri, ikinci nesil teknolojilerinin daha zor formülasyonlarla uğraşmasıdır. Örneğin, biyolojik olarak bozunabilir poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)'dan yapılan enjekte edilebilir depo formülasyonları, bir ay veya daha uzun süre peptit ve protein ilaçları verecek şekilde tasarlanmıştır. Çoğu depo formülasyonu, ilk veya ikinci günde toplam ilacın %50'sini serbest bırakan ilk ani salımı kontrol etmekte zorlanır [11].

İkinci nesil boyunca insülin için pulmoner iletim sistemleri de geliştirilmiştir. Pulmoner insülin verme sistemi geliştirilmiş; ancak daha düşük biyoyararlanımı, parenteral enjeksiyonun gerektirdiğinden birkaç kat daha fazla ilacın verilmesini gerektirmiştir. Bu da diğer faktörlerle birlikte ürünün pazardan çekilmesine neden olan beklenmedik yan etkilere neden olmuştur [12]. İkinci nesil periyodu ayrıca vücuda implantasyondan sonra peptit/protein ilaçlarının sürekli salım formülasyonlarını da geliştirmiştir. İn vivo bir formülasyondan ilaç salımı, sadece formülasyon özelliklerine değil, aynı zamanda implante edilen formülasyonu çevreleyen biyolojik ortama da bağlıdır. Bu, in vivo ilaç salım kinetiğinin tahminini ve dolayısıyla biyoyararlanımı daha zor hale getirir [13].

Günümüzde geliştirilmeye devam etmekte olan üçüncü nesil salım sistemlerindeki amaç hem fizikokimyasal hem de biyolojik bariyerlerin üstesinden gelmektir ve modüle edilmiş salım sistemleri olarak anılırlar. İlaçların zayıf suda çözünürlüğü, bugün hala devam eden ilaç geliştirmedeki en önemli sorunlardan biridir. Çözünürlüğü düşük ilaçlarla ilgili tartışma, ilaç çözünürlüğünün ne anlama geldiğinin anlaşılmasını gerektirmektedir. Birçok yeni ilaç adayının suda çözünürlüğü düşüktür ve bu nedenle

aday ilaçların büyük bir kısmı klinik olarak faydalı formülasyonlara dönüştürülemez. Oral olarak uygulanan 200 ilaç ürününün analizi, pratik olarak çözünmeyen ilaçların, toplam ilaçların yaklaşık %40'ını oluşturduğunu göstermiştir [14].

Bu ilaçların terapötik olarak etkili biyoyararlanımı için gastrointestinal (GI) yolla etkili bir şekilde verilmesi önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Pratik olarak çözünmeyen ilaçların çözünme oranı o kadar yavaş olabilir ki; çözünme, GI geçiş süresinden daha uzun sürer. Bu da terapötik olarak kabul edilemez biyoyararlanım ile sonuçlanır [15].

Suda az çözünür ilaçların daha yüksek çözünürlüğe ulaşması için teknolojiler on yıllardır incelenmiştir ve bazı yöntemler belirlenmiştir. Çözünürlüğü düşük ilaçlar doğal olarak düşük su çözünürlüğüne sahiptir ve bu nedenle çözünürlüğü arttırmak için sisteme, sürfaktanlar, polimer miseller, hidrotropik maddeler, kompleks yapıcılar (örneğin, siklodekstrinler ve proteinler), kosolventler ve lipit formülasyonları (örneğin, emülsifiye sistemleri) gibi uygun yardımcı maddeler eklenmektedir [16].

Zayıf asidik veya bazik ilaçlar için, ilacın çözünürlüğünü arttırmak amacıyla pH kontrol edilebilir. İlaç çözünürlüğünü arttırmaya alternatif olarak, ilaç çözünme kinetikleri, uygun polimorfun seçilmesi, katı dispersiyonların yapılması (yani, polimerler kullanılarak ilacın amorf yapısının korunması), ilaç partikül boyutunun azaltılması ve sürfaktanlarla ıslanmanın artırılması yoluyla artırılabilir. Bunlardan katı dispersiyon yaklaşımı, hazırlama kolaylığı ve etkinliği açısından yaygın olarak kullanılmaktadır [17].

Yüzey alanı, ilaç partiküllerinin boyutundaki azalma ile orantılı olarak artar. İlaç çözünürlüğü doğal bir özelliktir ve bu nedenle çözünme kinetikleri arttıkça değişmemelidir. Ancak çözünme kinetiklerinin artırılması, oral formülasyonların biyoyararlanımının artmasına neden olabilir. İlacın gelişmiş çözünürlüğü, çözünmüş ilacı gastrointestinal kanaldan emilen ilaçların yerini alacak kadar hızlı bir şekilde üretebilir, böylece biyoyararlanımı geliştirebilir [8].

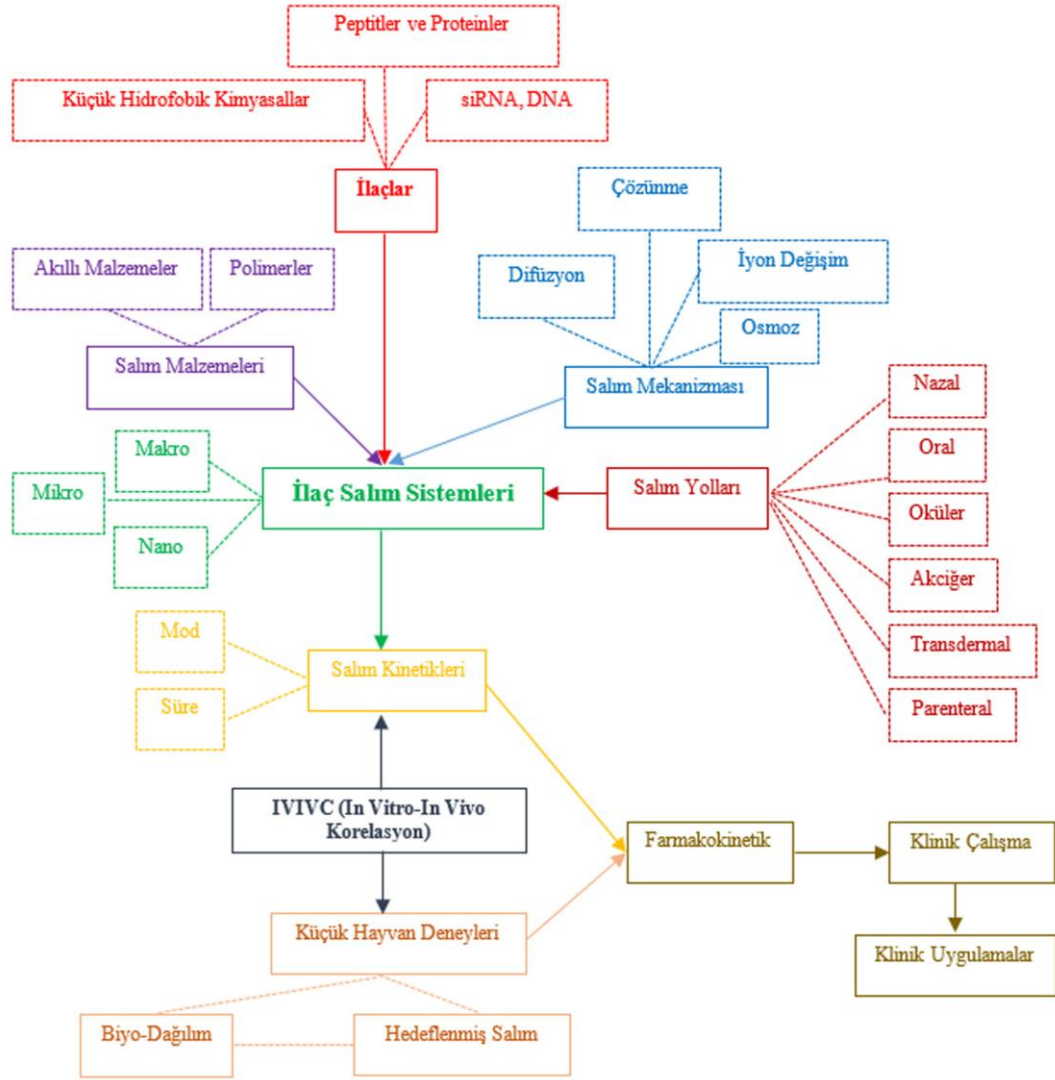
Son zamanlarda araştırmacılar, hedef maddeye özgü mekanizmalara sahip olan çevreye duyarlı akıllı malzemelerden geliştirilebilecek ilaç salım sistemlerine odaklanmaktadır. İlaç salım sistemleri, bir analitin pH, sıcaklık, iyonik güç, elektrik alanı veya konsantrasyon farklılıkları gibi çevresel faktörlerle uyarılmasıyla etkinleştirilebilir. Ayrıca, ilaç salım sistemlerinin salım mekanizmaları, bir polimer matriksinin şişme derecesi veya bozunması ile kontrol edilebilir. İlaç salım sistemlerinin ana konsepti, terapötik ajanı istenen yerde, uygun dozda ve gereken süre boyunca salgılama kabiliyetine sahip olmalarıdır. Vücutta herhangi bir toksik etkiye neden olmamak için biyouyumlu ve biyobozunur olması tercih edilir [18].

2.1.1. Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

Bu sistemler salım mekanizması ve uygulama alanlarına göre iki gruba ayrılabilir:

Çizelge 2.1. Kontrollü Salım Sistemleri

Salım Mekanizmasına Göre	Uygulama Yerine Göre
Difüzyon Kontrollü Sistemler <ul style="list-style-type: none"> • Membran Sistemler • Matriks Sistemler 	Oküler Sistemler Nazal Sistemler Oral Sistemler
Kimyasal Kontrollü Sistemler <ul style="list-style-type: none"> • Vücutta Aşınan Sistemler • Zincire Takılı Sistemler 	Bukkal Sistemler Transdermal Sistemler İmplant Sistemler
Çözücünün Harekete Geçirdiği Sistemler <ul style="list-style-type: none"> • Şişme Kontrollü Sistemler • Ozmotik Kontrollü Sistemler 	Vajinal, Servikal, İntrauterin Sistemler
Diğer Sistemler <ul style="list-style-type: none"> • Manyetik Kontrollü Sistemler • Ultrason Kontrollü • Çevreye Duyarlı Sistemler 	



Şekil 2.2. İlaç Salım Sistemleri

2.1.1.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler

Difüzyon kontrollü salımda, sulu bir çözelti içindeki ilaç molekülü difüzyonu, ilaç moleküllerinin cihazdan çıkmak için kıvrımlı yollardan geçmesi gereken çözünmeyen polimer matriksi tarafından inhibe edilir. Çapraz bağlı bir hidrojelde olan polimer zincirleri difüzyon bariyerini oluşturur. Difüzyona karşı bariyer, örneğin jel yapısında boşluklar yaratan hidrojelin şişmesi ile azaltılabilir. Bu tür hidrojellerin, onların gastrointestinal sistem içinde daha uzun süre kalmalarına izin veren biyoadeziv özelliklerinden de yararlanılabilir. Difüzyon kontrollü salım için kullanılan polimerler

ya ilacın muntazam bir şekilde dağıtıldığı matriksler olarak ya da ilaç rezervuarını yaşam ortamından koruyan bir hız sınırlayıcı membran olarak üretilebilirler [19].

Membran sistemlerde ilaç, şişen veya şişmeyen polimer filmle çevrili bir rezervuara yüklenir. İlacın bu filmde difüzyonu serbestleşme hızını kontrol eden basamaktır. Bu sistemler için membran hazırlanmasında çeşitli sentetik ve doğal polimerler kullanılmaktadır. Bunların başında silikon, polihidroksietil metakrilat (PHEMA) gibi çeşitli hidrojel etilen-vinil asetat kopolimerleri gelir. Bu polimerler inerttir, biyolojik olarak parçalanmazlar, doku uyusabilirlikleri iyidir ve düşük molekül ağırlıklı maddelere karşı geçirgendirler [20].

Membran sistemlerde ilaç salım hızı, kullanılan membranın kalınlığı ve/veya geçirgenliği kontrol edilerek ayarlanabilir. Rezervuar sistemlerine dayanan ilaç salım sistemleri, ilacı oldukça sabit bir oranda salar; ancak hız kontrol membranının yırtılması üzerine tüm ilacın bir anda salınması riski vardır [21].

Membran sistemlerin en önemli üstünlüğü sıfırıncı dereceden kinetiğe (sabit serbestleşme hızına) kolayca ulaşabilmesidir. Sıfırıncı dereceden serbestleşme için ilacın rezervuar bölümünde her zaman sabit, doyumluk derişiminde kalması sağlanır. Dezavantajları ise; vücutta parçalanamadıklarından kullanım sonrası cerrahi işlem ile uzaklaştırılmaları, büyük moleküllü ilaçların uzun süreli salımı için uygun olmamaları ve membranda oluşacak çatlak veya yırtılmalarla ilacın yerel olarak aşırı yüklenmesidir.

Matriks sistemlerde ilaç katı polimer içerisinde çözülür veya dağıtılır. Salım hızını kontrol eden basamak yine ilacın polimer matriks içindeki difüzyonudur. Bu polimer yapıdaki dağılım nedeniyle matriks sistemler sıfırıncı dereceden serbestleşme kinetiğini yakalayamazlar. Böyle bir matriksten önce yüzeye yakın daha sonra merkeze yakın moleküller salınacağından matriksin sabit serbestleşme hızına ulaşması için geometrik tasarımı önemlidir [20].

Matriks sistemlerin başlıca avantajları, imalat kolaylığı, yüksek moleküler ağırlığa sahip ilaçları yükleme yeteneği ve yırtılmış rezervuardan sızıntıya kıyasla sistem sızıntısı

durumunda ciddi sorunların olmamasıdır. En büyük dezavantaj, ilaç salım oranının zamanla azalmasıdır [21].

Bir matriks (veya monolit) cihazının formüle edilmesi kolaydır ve bir rezervuar cihazından daha yüksek bir ilk salım hızı verir. Bu cihazlar neredeyse sabit bir hızda salım için tasarlanabilir. Monolitik bir çözelti cihazı, polimer içinde ilaç çözeltisi içerirken monolitik bir dispersiyon, bir matriks sistemi olarak adlandırılan, hız sınırlayıcı bir polimer matriksinde dağılmış katı ilaç içerir [22].

Khan ve Zhu, ibuprofen ve karbopol® 934P'nin kontrollü salımlı matriks tabletlerini ve doğrudan sıkıştırma yoluyla farklı ilaç-polimer oranlarında Karbopol® 934P ve 971P reçinelerinin karışımlarını hazırlamışlardır. Araştırmaları, matriks materyali oranının ve kullanılan bazı katkı maddelerinin (laktöz, mikrokristalin selüloz ve nişasta) ilacın tabletlerden salım mekanizması ve salım hızı üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Salım kinetikleri, matriks malzemeleri olarak karbopol® 934P ve 971P reçinelerinin harmanlanmış karışımları kullanılarak modifiye edilmiştir [23].

2.1.1.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler

Kimyasal olarak aktifleştirilen zincire takılı sistemlerle oluşturulan ilaç salım mekanizması, ilacın bir polimer zincire kimyasal olarak bağlanması yoluyla elde edilir. Bu bağın hidrolitik veya enzimatik yollarla kopması sonucu ilaç serbestleşir. Polimer çözünen veya çözünmeyen tipte olabilir. Genellikle kısa süreli uygulamalar için tercih edilirler. İlaç polimer zincirine doğrudan takılabilir veya serbestleşme hızı ve hidrofilik özelliği ayarlamak amacıyla bir ara grup üzerinden de bağlanabilir [20]. Bu yöntem yüksek ilaç yüklemelerine izin verir (sistemin ağırlıkça çoğunluğu ilaçtır); ancak yeni polimer-ilaç sisteminin sitotoksitesi hakkında daha fazla araştırma gerektirir [21].

Yapılan bir çalışmada poli(metil metakrilat-ko-maleik anhidrit)'in farklı yüzdelerde anhidrit grubu içeren bir yüzeye sahip matriksi, çözelti polimerizasyonu ile hazırlanmış ve karakterize edilmiştir [24]. Bir amid bağı vasıtasıyla ampisilinin amin grubunu, matriksin anhidrit grubuna bağlayarak ampisilinin makromoleküler bir ön ilacı

sentezlenmiştir. Matrikse kovalent olarak bağlanan ampisilin miktarı spektroskopik olarak karakterize edilmiş ve zayıf bazik bir ortamda in vitro salım hızı antimikrobiyolojik aktivitesi ile incelenmiştir. Ön ilacın, ilacın uzun süreli salınmasına (7-8 gün) izin verdiği görülmüştür.

Kimyasal olarak kontrol edilen ikinci ilaç salımı, biyobozunur polimer matriksin, genellikle su veya enzimatik hidroliz ile aşınması yoluyla elde edilir. Bunlar vücutta aşınan sistemler olarak adlandırılır. Eğer kullanılan polimerin vücutta aşınma kinetiği biliniyorsa sistem matematiksel olarak tanımlanabilir. İdealde, ilacın salımını kontrol eden parametre yalnızca yüzey aşınmasıdır. Sıfırıncı dereceden kinetiği yakalamak için yüzey alanı zamanla değişmeyen geometride tasarlanmış sistemler gereklidir [20].

Biyolojik olarak aşınabilir matrikslerin avantajları, aşınmayan matrikslerin avantajlarına benzer, ayrıca ilacın salınmasından sonra vücuttan çıkarılması gerekmez. Bozunma işlemi yüzey aşınması veya yığın aşınması olabilir [21].

Lu ve Anseth, yüksek moleküler ağırlıklı, hidrofilik çözünenlerin salınımını kontrol etmek için bozunabilir hidrojellere fotopolimerize edilmiş hidrolize edilebilir bir alfa-hidroksi asidin oligomerik bloklarını içeren suda çözünür PEG (polietilenglikol) bazlı makromerler geliştirmişlerdir. Bozunma işlemi sırasında ağ gözenek büyüklüğü ve hacim şişme oranı, hidrojel bozunma kinetiklerinin ve daha sonra ağ yapısındaki değişikliklerin çözünen salımı üzerindeki etkisini incelemek üzere karakterize edilmiştir. Salım davranışı incelenmiş ve hidrojellerin şişmesi ve yapısal özellikleri ile ilişkilendirilmiştir. Son olarak, yaklaşık bir sıfırıncı dereceden salım profili elde etmek için çok katmanlı biyolojik olarak bozunabilir hidrojellerden salımın uyarlanması yeteneği teorik olarak incelenmiştir [25].

2.1.1.3. Çözücünün Harekete Geçirdiği Sistemler

Temel ozmotik salım sistemi, ilaç içeren bir ozmotik çekirdek ve gerektiğinde, porları olan yarı geçirgen bir zar ile çevrelenmiş bir osmojenden oluşur. Sabit iç hacme sahip bir sistem, belirli bir zaman aralığında çözücü hacmine eşit bir doymuş çözelti hacmi

salar. Bir sistem içinde bulunan fazla katı maddeler, çözünen maddenin sabit bir şekilde verilmesini sağlar. Uygulama hızı genellikle sıfırdan kinetikleri takip eder ve çözünen derişim doygunluğun altına düştükten sonra düşer. Sistemden çözünen madde çıkış hızı, yarı geçirgen zardan solvent akışı ile kontrol edilir [9].

Ozmotik kontrollü salım sistemlerinin tasarımını etkileyen anahtar parametreler por genişliği, çözünürlük, ozmotik basınç ve yarı geçirgen zar olarak sıralanabilir [26].

Şişme kontrollü sistemlerde ilaç bir polimer çözeltisinde çözülerek dağıtılır. Çözücü uzaklaştırıldığında camsı polimer matriks elde edilir. Bu bileşim çözünme ortamına bulunduğu çözücü polimer matriks içine geçer ve polimer şişmeye başlar. Camsı geçiş sıcaklığı ortam sıcaklığının altına düşer ve ilaç polimer içinde difüze olarak dışarı doğru serbestleşir. "Şişme kontrollü ilaç salım sistemi" terimi, kabaca sadece bir şişme basamağının salım hızını kontrol eden tek fenomen olduğu cihazlara atıfta bulunarak tanımlanabilir. Alternatif olarak, "şişme kontrollü ilaç salım sistemi" terimi, daha geniş anlamda, bir şişme basamağının önemli olduğu, fakat aynı zamanda diğer kütle transfer işlemlerinin rol oynayabileceği (örneğin, ilaç çözünmesi, ilaç difüzyonu ve polimer çözünmesi) cihazları kapsayacak şekilde tanımlanabilir [1].

Peppas ve arkadaşları tarafından (1) su difüzyonu, (2) ilaç difüzyonu, (3) polimer şişmesi, (4) hareketli bir şişme yüzeyi ve (5) hareketli bir "yığın sıvı-tablet" yüzeyi göz önünde bulunduran, polimerik tabletler için ilginç bir teori sunmuşlardır. Model, düzgün bir şekilde yüklenmiş, düzlemsel bir dozaj formunun bir düzlemsel yüzey boyunca salımı ile açığa çıkmasını takiben, belirli zamanlarda ilaç ve su derişimleri pozisyon profillerinin kantitatif tahminine izin verir [27].

Hidrojeller, ilaçların tuzaklanması için bir matriks sağlayan karışık bir ağ yapısı oluşturmak için çapraz bağlanmış makromoleküler zincirlerden oluşur. Bu tür hidrojeller termodinamik olarak uyumlu bir çözücü ile temas ettiğinde, polimer zincirleri gevşer [28].

Yukarıda tanımlanan durum, polimerin karakteristik camsı geçiş sıcaklığı deney sıcaklığının altında olduğunda gerçekleşir. Şişme, bu geçişin makroskopik kanıtıdır. Çözünmüş ilaç, dış ortama difüze olur ve hidrojel etrafında oluşan şişmiş polimerik tabakayı geçer. Hidrojel salım ortamına temas ettiğinde, nüfuz eden su molekülleri hidrojel yüzeyini kaplar ve böylece ön taraftaki çözünmemiş camsı polimer bölgesini arkasındaki şişmiş ve kauçuğumsu hidrojel fazından açıkça ayıran hareketli bir yüzey gözlenir. Bu yüzeyin hemen önünde, çözücünün varlığı polimeri plastikleştirir ve camdan kauçuğa geçişine neden olur [29].

- (i) Polimerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g), deney sıcaklığının çok altındaysa polimer kauçuk halindedir ve polimer zincirleri, çözücünün yüklü hidrojele daha kolay nüfuz etmesini ve daha sonra ilaç moleküllerinin salım ortamına serbest bırakılmasını sağlayan yüksek bir hareketliliğe sahip olacaktır [30]. Bu, açıkça bir çözücü (veya ilaç) difüzyon hızının polimer zinciri gevşeme hızından daha yavaş olmasıyla ($R_{diff} \ll R_{relax}$) karakterize edilen Fickian difüzyonu (Durum I) ile sonuçlanır.
- (ii) Deney sıcaklığı T_g 'nin altındaysa, hidrojellerin polimer zincirleri, çözücünün polimer içerisine hemen nüfuz etmesine izin verecek kadar hareketli değildir. İkinci durum, sırasıyla göreceli difüzyon ve zincir gevşeme hızlarına bağlı olarak durum II ve anormal difüzyon içeren Fickian olmayan bir difüzyon sürecine yol açar (Durum II, $R_{diff} \gg R_{relax}$ ve anormal difüzyon için $R_{diff} \sim R_{relax}$).

Salım kinetiğine ilişkin deneysel veriler tipik olarak zamanın bir fonksiyonu olarak salınan ilaç miktarı olarak sunulur. Genel salım profilleri deneysel bir Ritger-Peppas denklemi ile açıklanabilir [31]:

$$M_t / M_\infty = k.t^n$$

Burada M_t , t zamanında salınan ilaç kütesidir, M_∞ , salınan ilacın toplam kütesi, k kinetik sabittir ve n, difüzyon üssüdür. Bu denklemde, zamanla salınan ilacın kütle fraksiyonu bir güç yasası ilişkisini izler. Güç, n değerine, taşıma tipine, hidrojel

geometrisine ve polimer polidispersitesine bağlıdır. İlaç Fickian difüzyonu ile salınırsa $n=0.5$ ve yüzey erozyonu salıma hakim olduğunda $n=1.0$ olur. Birçok sistemde, n değeri 0.5 ile 1.0 arasındadır, çünkü birçok bir sistemde birden fazla mekanizma salımı kontrol eder.

Yukarıda yer alan denklem, literatürde bulunan çok çeşitli deneysel verileri yeniden analiz etmemize izin verir. Ritger-Peppas denklemini çözmek için, bir çift parametrenin belirlenmesi gerekir: bir zaman biriminde (örneğin, 1 gün) salım fraksiyonunun ölçülmesiyle belirlenen ve başlangıç kinetiğinin bir göstergesini sağlayan k değeri ilaç salımı (aynı zamanda ani salım olarak da bilinir); ve salgılanan ilacın kütle fraksiyonunun (M_t/M_∞) %50'ye eşit olduğu ve belirli bir ilaçta uzatılmış ilaç salımının bir göstergesini sağlayan salım yarı ömrü ($t_{1/2}$). Bu iki parametre, farklı sistemlerin ilaç salım özelliklerini karşılaştırmamızı sağlar [32].

Yapılan bir çalışmada çapraz bağlanmış polimerik malzemede suda çözünür ilaç taşınması, polimer morfolojisi, bileşimi ve çözünen özellikleri, bunların salım davranışı üzerindeki etkisini belirlemek için araştırılmıştır. Su geçişi ve salım deneylerini incelemek için iki çapraz bağlı polimer sistemi, poli(HEMA-co-MMA) ve PVA (poli vinil alkol) kullanılmıştır. Çözünen geçişini karakterize etmek için ilaç salım oranları, ilaç difüzyon katsayıları ve şişme arayüz sayısı kullanılmıştır. Salım deneyleri sekiz farklı çözünmüş madde kullanılarak gerçekleştirilmiştir [33].

Yapılan başka bir çalışmada poli(dietilaminoetil metakrilat-ko-hidroksi etil metakrilat), poli(dietilamino etil akrilat-ko-hidroksi metakrilat) ve poli(metakrilamin propil amonyum klorür-ko-hidroksietil metakrilat) ve poli(metakrilamin propil amonyum klorür-ko-hidroksietil metakrilat) serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiş ve bu polimerlerde anormal taşıma davranışı analiz edilerek şişme yüzeyi hızı belirlenmiştir. Geçiş, polimer ağlarının iyonize olduğu asidik pH değerlerinde anormal bulunmuştur. İnsülin, miyogloblin ve albüminin salımı araştırılmış ve polimer ağının ağ boyutuna büyük ölçüde bağlı olduğu bulunmuştur [34].

2.1.1.4. Diğer Sistemler

Duyarlı ilaç salım kavramı, bir sensörün ve iletim cihazının birleştirilebildiği herhangi bir ilaç tedavisi için kullanılabilir. İlaç salımını tetiklemek için kullanılan sinyaller Langer tarafından incelenmiştir ve aşağıdakileri içermektedir:

- Manyetik boncukların bir polimer matriksi içinde dağıtıldığı ve bir manyetik alan uygulandığında bu matriksin yeniden düzenlenmesine neden olan manyetik sinyaller;
- Gözenek boyutu, geçirgenlik ve diğer faktörlerin elektrikle uyarılan polimer şişmesi ile kontrol edildiği elektrik sinyalleri;
- Ultrasonun şiddetinin, frekansının ve süresinin hem bozunur olmayan hem de biyobozunur polimerik sistemler için salımı arttırdığı ultrasonik sinyaller;
- Polimer jelleri içindeki iyonlaşabilir grupların polimer zinciri etkileşimlerini kontrol ettiği pH sistemleri;
- Isıya duyarlı hidrojellerin sıcaklık değişimlerine tepki olarak şişip çöktüğü sıcaklık sistemleri [35].

Sıcaklığa duyarlı hidrojeller, birçok terapötik ajanın kapsüllenmesi ve sürekli salımı için çekici ilaç salım sistemi platformları olarak işlev görür [36]. Pasif difüzyon, erozyon ve şişme gibi farklı mekanizmalar, ilaçların bu termo-duyarlı hidrojellerden salımını belirler [37].

Xi ve diğ., poli(trimetilen karbonat) 15- F127-poli(tri-metilen karbonat) 15 (PTMC15-F127-PTMC15) kopolimerine dayanan biyolojik olarak bozunabilen ısıya duyarlı hidrojel hazırlığını bildirmişlerdir. Çalışma, hazırlanan hidrojellerin iyi mekanik özellikler, daha düşük çalışma konsantrasyonu, yüksek biyoyumluluk ve iyi suda çözünürlük gösterdiğini doğrulamıştır. Hidrojeller, Mitomisin C (MMC) ile yüklenmiş; in vitro ilaç salım çalışmalarından hidrojellerin ilacın uzun süreli etkinliği ve arttırılmış stabilitesi ile sürekli salım gösterdiği gözlenmiştir. MMC yüklü hidrojellerin in vivo davranışı oküler glokom cerrahisi tavşan modellerinde analiz edilmiş ve fonksiyonel ve kalıcı kabarcıklar göstermiştir. Sonuçlar, bu hidrojellerin uygulanmasının güvenli

olduğunu ve oküler glokom cerrahisi için etkili enjekte edilebilir implantlar olarak işlev görebileceklerini göstermiştir [38].

pH'a duyarlı temel polimerler kullanılarak hazırlanan hidrojeller, biyouyumluluklarından dolayı tıbbi alanda çok önemli uygulamalara sahiptir. Bazik veya asidik omurga polimerinin yük yoğunluğu pH'a bağlı olduğundan çevresel pH'taki değişiklik, bu hidrojellerin şişmesine veya büzülmesine neden olur. Bu durum, polimerin hidrasyonu, monomer bileşimi, iyonik yük ve çapraz bağlama yoğunluğu ile yönetilir [39].

Sahu ve diğ., 5-florourasilin (5-FU)'un sürekli salımı için okalıptüs yağı ile kaplanmış çift duvarlı pH'a duyarlı PLGA esaslı nanojel geliştirilmesini bildirmiştir. İlaç, "çözücü buharlaştırma emülsifikasyonu" adı verilen bir teknik kullanılarak PLGA içinde kapsüllenmiştir. Kapsülasyonu hemen bir katyonik kitosan kaplaması izlemiş ve hazırlanan pH'a duyarlı nanojelin okalıptüs yağı ile yüzey modifikasyonu epidermise penetrasyon etkinliğini arttırmıştır. Domuz derisi kullanılarak yapılan birçok in vitro ve ex vivo çalışma, 5-FU'nun sürekli salım sistemi ile yüzey modifikasyonu yapılmış PLGA-kitosan çift duvarlı nanojelin etkin penetrasyonunu göstermiş ve bu da cilt kanseri tedavisinde umut verici potansiyelini göstermiştir [40].

2.1.1.5. Uygulama Yerine Göre Sistemler

Oküler Sistemler

Göz, yerel veya sistemik ilaç verme formülasyonları için önemli ölçüde erişilebilirliği ile öne çıkan özel fotoresepsiyon duyu organıdır [41]. Gözdeki ilaç etkisinin süresini uzatmak için kullanılan iki yaygın yaklaşım vardır, bunlar:

- (1) Viskoziteyi arttırıcı ajan, süspansiyon, emülsiyon, merhemler ve de aşınabilir veya aşınmaz matrisler kullanılarak elde edilen yavaşlatılmış drenaj;

(2) Nanoparçacıklara veya nanokapsüllere ve ön ilaçlara ek olarak iyonoforlar, iyon çiftleri, lipozomlar kullanılarak ilacın kornea penetrasyonunun iyileştirilmesidir [42-45].

Nazal Sistemler

İlaç salım sistemlerinde nazal uygulama yolu, zengin kan desteği, erişilebilirliği, invaziv olmama, düşük doz aşımı riski ve kendi kendini tedavi etme olasılığı nedeniyle avantajlıdır [46,47].

Nazal ilaç salım yolunun, hepatik degradasyonlarına ek olarak küçük dozlarda verilmesi ve hızlı bir şekilde harekete geçmesi amaçlanan ilaçlar için kullanımı daha uygundur ve genellikle kronik hastalıklar için kullanılırlar [48].

Oral Sistemler

Oral uygulama en çok tercih edilen ilaç uygulama yoludur; bununla birlikte, genellikle büyük zorlukları, yani ilacın sınırlı çözünürlüğünü ve gastrointestinal yolda zayıf geçirgenliği beraberinde getirir. Oral ilaç dağıtımının temel amacı, genellikle presistemik metabolizmadan (ilk geçiş ve bağırsak veya bağırsak zarı metabolizmasının toplamı) ve gastrointestinal kanalda yetersiz ilaç emiliminden etkilenen oral biyoyararlanımı arttırmaktır [9].

Doğal yeme döngüleri, ilaçla etkileşime giren lipitler, karbonhidratlar ve sindirim enzimleri konsantrasyonlarını aniden yükselterek ilaç iletimini de engelleyebilir [49]. Tipik oral uygulama ilacın herhangi bir maddenin ağızdan anüse geçmesi gereken süre olan yaklaşık 30 saat içinde serbest bırakılmasını gerektirir. Biyoterapötiklerin oral biyoyararlanımını arttırmak için yapılan erken çalışmalar, enzimatik bozunmayı en aza indirmek için proteaz inhibitörleri ve transepitelyal taşınmayı arttırmak için geçirgenliği arttırıcıların eklenmesine dayanmaktadır [50].

Uyumsuzluğu azaltma stratejileri, uzun süre salımlı oral uygulama teknolojilerine odaklanmıştır. Bir yaklaşımda bağırsak epitel duvarına yapışan ilaç salım sistemi kullanılmış ve bu mukozaya yapışan yamalar ve parçacıklar bağırsaktaki farklı bölgeleri hedefleyecek şekilde tasarlanmıştır [51].

Başka bir örnekte, mukozaya yapışan bir tabaka, ilaç içeren orta tabaka ve enzimatik aktiviteyi önleyen bir dış tabakadan oluşan üç katmanlı bir yama, granülosit koloni uyarıcı faktörü serbest bırakmak için tasarlanmıştır. Oluşturulduktan sonra, cihaz bağırsakta parçalanarak ve mukoadesifleri salan enterik bir kapsüle yüklenmiştir [52].

Bukkal Sistemler

Oral mukoza yoluyla oral yoldan verilen ilaçlar için dil altında ve bukkal (yanak ve dişeti arasında) olmak üzere iki temel emilim yolu vardır. Bu iki yoldan ilaç salımı, kolay bir uygulama yolu sağladığından ve oldukça zengin kan ve lenfatik damar desteği nedeniyle umut verici bir süreç olarak kabul edilir. Ayrıca, bukkal/dilaltı uygulama yoluyla ilaç salımı, yüksek geçirgenlik özelliklerine ve iyi tekrarlanabilirliğe sahip ilaçlara da olanak sağlar [2].

Bukkal mukoza yoluyla emilmesi amaçlanan ilaçların, juguler ven ile sistemik dolaşıma doğrudan girdiği gözlenmiştir. Bu salım yolunun, oldukça hızlı bir etki başlangıcı ve hepatik ilk geçiş metabolizmasının etkisine, mide asidinin hidroliz etkisine ve ayrıca bağırsak enzimatik bozunmasına karşı bir koruma sağladığı bildirilmiştir [53].

Transdermal Sistemler

İlacın cilt yoluyla verilmesi, daha kolay erişilebilirlik, daha fazla kolaylık, daha geniş yüzey alanına uygulanan uzun süreli tedavi ve ayrıca ilk geçiş metabolizmasından kaçınma avantajlarına sahiptir. Transdermal ilaç uygulamasının, diğer kontrollü salım formülasyonlarına kıyasla daha avantajlı olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, vücut cildinin farklı bölgelerinde emilim etkinliğindeki değişiklik, belirli cilt tipleriyle ilgili

yapışma zorluğu ve amaçlanan yamanın gerekli olduğu zaman dilimi de dahil olmak üzere bu yolla ilgili bazı sınırlamalar vardır [54].

Vajinal, Servikal, İntrauterin Sistemler

Vajinal sıvı 4 ila 5 arasında bir pH'a sahiptir. Vajinal yolla verilmesi amaçlanan ilaçlar çoğunlukla lokal etkiler için kullanılır. Bununla birlikte, vajinal absorpsiyon aynı zamanda hızlı ve etkili sistemik iletim sağlayabilmektedir. Verimli sistemik emilim ile birlikte kontrollü ilaç salım cihazlarını tutma kabiliyeti nedeniyle, özellikle steroid kontraseptifler için birçok vajinal terapötik formüle edilmiştir. Biyolojik olarak bozunabilir mikroküreler ve vajinal halkalar gibi yakın zamanda mevcut olan çok sayıda vajinal kontrollü salım formülasyonu vardır [55-57].

Yeni gelişmeler arasında uzun etkili kontraseptif formülasyonları bulunmaktadır: Hormonal intrauterin cihaz (Mirena-intrauterin kontrasepsiyon veya intrauterin sistem olarak da bilinir) veya bakırlı hormonal olmayan intrauterin cihaz bunların arasındadır [58].

Rektal Sistemler

Rektal formülasyonların, belirli bir ilaç dozunun oral yoldan uygulanmasına kıyasla daha düşük bir emilim oranına sahip olduğu gösterilmiştir. Rektal yol uzun süre sadece lokal anestezikler, kurt düşürücü ilaçlar, antihemoroidal ve müşil ajanları içeren spesifik terapötikler için kullanılmıştır [59,60].

2.2. KURKUMİN VE ZERDEÇAL

Günümüzde hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ilaç araştırmaları birçok yeni molekül üzerinde odaklanmıştır. Ancak, ilaç araştırmalarında yeni keşfedilen jenerik ilaçların yüzyıllardır kullanılan birtakım moleküllerden daha etkili veya daha güvenli olup olmadığı büyük bir tartışma konusudur. Bu sebeple, özellikle son yıllarda bilim

camiası tıp tarihinin derinliklerine gömülü eski ilaçları insanlığın refahı için tekrar keşfe çıkmış ve onlara yeniden can kazandırma çalışmalarına başlamıştır.

2.2.1. Tarihçe

Kökeni Hindistan'ın Vedik kültürüne dayanan ve 5000 yıllık bir geçmişe sahip olan yaşam bilimi Ayurveda'nın temel konusu organizmanın homeostazını tespit etmek ve dengesizliği işaret eden biyokimyasal belirteçleri tespit ederek onları düzeltmek adına önerilerde bulunmaktır. Bu haliyle bakıldığında eski bir Hindistan tıbbi bilgisinin aslında günümüzde birçok tetkik ve analiz ile güçlkle tespit edilmeye çalışılan belirti ve bulgulara uzun yıllar önce odaklanmış olduğunu rahatlıkla görebiliriz.



Şekil 2.3. *Curcuma longa Linn* bitkisi, zerdeçal ve kurkumin

Curcuma longa Linn bitkisinin kök sapından türetilen zerdeçal, Hindistan halkı tarafından yüzyıllarca sofralarda bir gıda bileşeni olarak kullanılmanın yanında alternatif ve modern tıbbın içinde de yer almayı başarmıştır. Bir baharat ve boya maddesi olarak kullanımının ötesine geçerek tıbbın birçok alanında derman olarak değerlendirilen zerdeçal Marco Polo'nun 13. yüzyılda Çin ve Hindistan'a yapılan seyahat kayıtlarında yer almaktadır. Arabistan tüccarları tarafından bu dönemde Avrupa kıtasına getirilen zerdeçal hızla pazarlarda yerini almıştır. 15. yüzyılda Hindistan'ın İngiliz yönetimi sırasında, zerdeçal diğer baharatlar ile birleştirilerek köri tozu oluşturulmaya çalışılmıştır [61]. Susruta'nın M.Ö. 250 yılına dayanan Ayurveda özeti, zehirli yiyeceklerin etkilerini hafifletmek için zerdeçal içeren bir merhem önermiştir.

Latince *Curcuma* kelimesi, kökenini safranın orijinal ismi olan Arapça *Kourkoun'* dan almaktadır. *Curcuma longa* Linn bitkisi *Zingiber* cinsinin de ait olduğu *Zingiberaceae* ailesinin bir üyesidir [62]. Dünya çapında 133 kadar kurkumin türü tanımlanmıştır. Günümüzde zerdeçal, tropik bölgelerde yaygın olarak yetiştirilmektedir ve farklı kültürlerde ve ülkelerde farklı isimler ile adlandırılmaktadır. Zerdeçal bitkisinin gelişmesi için 20-30 °C sıcaklık ve önemli miktarda yıllık yağışa ihtiyaç vardır. Zerdeçal bitkisi 1 m yükseliğe kadar uzadıktan sonra uzun ve dikdörtgen şekilli yapraklarını açar. Bu yaprakların altında farklı büyüklüklere sahip rizomlar oluşur. Rizomlar donuk turuncu veya sarımsı kahve renktedir ve kurutulduğunda acı, hafif buruşuk, ancak tatlı bir tada sahip sarı bir toz haline getirilebilir. Kurutma yönteminde öncelikle rizomlar %0.05-0.1 alkalın su içeren büyük demir kaplarda belirli bir süre kaynatıldıktan sonra, nihai nem içeriği %8-10 olacak şekilde güneşte kurutulur. Kurutulduktan sonra paketlenen zerdeçal zamanla tat verme özelliğini yitirse dahi renk verme özelliğini yitirmez. Bu bozulmayı yavaşlatmak için zerdeçalın güneşten korunması gerekmektedir [63].

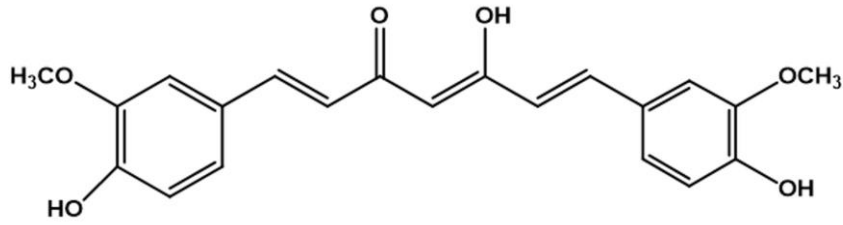
Hindistan, dünyanın zerdeçal gereksiniminin neredeyse tamamını üretmekte ve %80'ini tüketmektedir. Doğal nitelikleri ve önemli biyoaktif bileşik özelliği ile kurkumin içeriği yüksek olan Hint zerdeçalı, dünyanın en iyisi olarak kabul edilir. Güney Hindistan'ın Tamil Nadu eyaletinde yer alan Erode, zerdeçal için dünyanın en büyük üreticisi ve en önemli ticaret merkezidir ve “Sarı Şehir”, “Zerdeçal Şehri” veya “Tekstil Şehri” olarak da bilinir.

Kurkuminin kimyasal olarak keşfi ise yaklaşık iki yüzyıl öncesine dayanır. Vogel ve Pelletier 1815 yılında zerdeçal rizomlarından “sarı renklendirici madde” izolasyonunu bildirmişlerdir [64]. Bundan sonra saf bir kurkumin preparatının elde edilebilmesi ancak 1842 yılında Vogel tarafından gerçekleştirilebilmiştir. Kurkuminin kimyasal yapısı ise ancak 1910 yılında Milobedzka ve Lampe tarafından tanımlanabilmiştir [65]. Daha sonra *Curcuma longa* Linn bitkisindeki kurkuminoidler kromatografi yöntemi ile ayrıştırılmıştır [66]. 1930-1980 yılları arasında kurkuminin insan hastalıklarında olumlu etkilerine yönelik birçok çalışma yayımlanmıştır [67]. Kimyasal ve potansiyel tıbbi faydalarına ilişkin olarak kurkuminin terapötik kullanımına karşı ilgi yıllar içinde artmış

ve 1980'li yıllardan sonra in vitro çalışmalar ağırlık kazanarak anti-enflamatuvar ve anti-kanser etkiler üzerine yoğunlaşmıştır [68].

2.2.2. Kimyasal ve Metabolik Yapısı, Biyoyararlanım, Eliminasyon

Curcuma longa Linn ve diğer *Curcuma* türlerinde (yaklaşık 120'den fazla bilinen tür mevcuttur) doğal bir hidrofobik polifenolik bileşen olarak bulunan kurkumin (1,7-bis [4-hidroksi-3-metoksifenil] -1,6-heptadien-3,5-dion) (Şekil 2.4) bir diferuloilmetan'dır [69].



Şekil 2.4. Kurkuminin kimyasal yapısı

Kurkuminin moleküler formülü $C_{21}H_{20}O_6$ 'dır ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak $368.39 \text{ g mol}^{-1}$ 'dir. Solid fiziksel yapıda, nötral şartlarda sarı-turuncu ve kokusuz bir maddedir. Kaynama noktası $120-175 \text{ }^\circ\text{C}$ 'dir ve suda çözünmez [70]. Kurkumin'in kimyasal ve fiziksel özellikleri Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Kurkuminin fiziksel ve kimyasal özellikleri

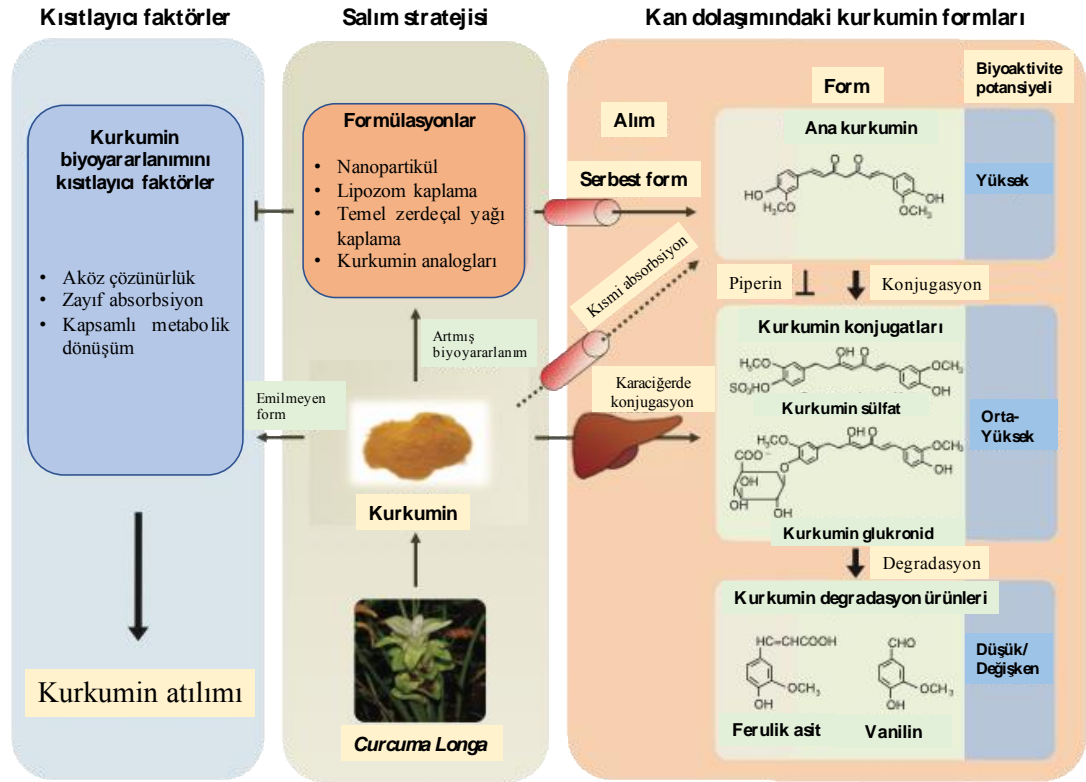
Fiziksel durum	Katı
Renk	Turuncu-sarı (nötr pH değerinde)
Koku	Kokusuz
Erime Noktası	$170-175 \text{ }^\circ\text{C}$
Yanıcılık	Yanıcı değil
Işık Hassasiyeti	Işığa duyarlı
Çözünürlük	Suda ve dietil eterde çözünmez, etanolde ve asetik asitte çözünür

Diferuloilmetan bileşikler doymamış diketon yapılar olarak asidik ve nötr çözeltilerde baskın bir keton formuna, alkali ortamda ise kararlı bir enol formuna sahip olan, kısaca keto-enol tautomerizm gösteren kimyasal yapılardır [71]. Tautomerik denge kısmen çözücünün polaritesine ve pH değerine bağlıdır. Polar olmayan çözücülerde, intramoleküler hidrojen bağ oluşumu nedeniyle kurkumin enol formunda bulunurken, polar çözücülerde diketo formunda bulunur [72].

Kurkumin ilk olarak 1800'lü yılların başında zerdeçaldan izole edilebilmiş ve yapılan çalışmalar ile coğrafi özelliklere bağlı olarak kurkuminin zerdeçal içeriğinin yaklaşık %2-9'unu oluşturduğu gözlenmiştir . Kurkuminin diferuloilmetan kimyasal yapısı ise ancak 1900'lü yılların başında anlaşılabilmiştir. Hidrofobik ve keto-enol kompozisyon göstermesi, oral nutrisyon ve parenteral kullanımlarda bilim insanlarına birtakım avantaj ve dezavantajlar sunmasına sebep olmuştur [73]. Hidrofobik özelliği dolayısıyla kurkumin düzenli olarak alındığında hücre içinde birikim göstermektedir [74]. Kurkumin, etanol ve konsantre asetik asit içinde çözünür. Ayrıca kurkumin diklorometan, kloroform, metanol, etil asetat, dimetil sülfoksit ve aseton içinde çözünür. Kurkumin en yüksek emilimini 420nm'de metanol gibi organik çözücülerde gösterir ve bu, adsorbsiyon çözücü solüsyonun aköz özelliği arttıkça azalır. Kurkumin, etanolde zayıf bir yeşil floresan gösterir [75].

Kurkuminin stabilitesi, içinde bulunduğu solüsyonun pH'sına da bağlıdır. Ağız ve mide gibi asiditesi yüksek bölgelerde en kararlı halini sergiler; nitekim ağız ve midede degradasyonu azalır. Bunun sebebi asidik pH'da kimyasal yapısındaki hidroksi gruplarının ayrışmamış formda olmasıdır [76]. Ortam pH'sı 7 üzerine çıktığında ise kurkumin kararlılığını kaybeder ve %90'dan fazlası 30 dakika içinde degrade olur. Kurkuminin oral biyoyararlanımının düşük olmasının diğer sebepleri barsak mukozasından adsorbsiyonunun düşük olması, emilen kısmın karaciğerde hızla metabolize olması ve safra kanalı aracılığı ile feçes ile vücuttan hızlı eliminasyonudur. Türler arasında farklılık göstermekle birlikte birçok hayvan çalışmasında oral yolla verilen kurkuminin büyük bir kısmının dışkıda tespit edildiği, idrarda önemsenmeyecek miktarda az bulunduğu gösterilmiştir [77]. Kurkuminin enterositlerden kan dolaşımına transferini sağlayan ve biyoyararlanımının düşük olmasına sebep ana yolaklar çoklu ilaca dirençli proteinler 1 ve 2'dir (multidrug resistance-related proteins, MRP) [78].

Literatürde kurkumin biyoyararlanımını arttırmak için birçok yöntem denenmiştir. Kurkuminin, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} ve Se^{2+} gibi metaller ve serum albümini ile bileşik oluşturulması denenmiştir [79]. Kurkuminin, piperin, nanopartiküller, lipozomlar ve fosfolipidler ile birleştirilmesi veya kurkumin analoglarının yapısal olarak değiştirilmesi de çalışılan yöntemler arasındadır. Piperin, kurkuminin faz 2 metabolizmasının glukronidasyonuna ve dolayısıyla inhibisyonuna sebep olarak biyoyararlanımını arttırdığı savunulmaktadır (Şekil 2.5) [80].



Şekil 2.5. Kurkumin biyoyararlanımını artırmak için potansiyel uygulama stratejileri

Kurkumin formülasyonları dolaşımda yararlanılabilen ana kurkuminin artmasına neden olurken standart kurkumin ağırlıklı olarak karaciğerde kurkumin konjugatlarına dönüştürülür ve daha sonra kurkumin parçalanma ürünlerine ayrılır. Sağ dikiörtgen dolaşımdaki sıralı kurkumin metabolizmasını ve buna karşılık kurkumin metabolitlerinin potansiyel biyoaktivitesini özetler. Piperin, kurkumin konjugasyonunu inhibe etmek için birlikte uygulanabilir. Şekil 2.5'te ayrıca kurkumin biyoyararlanımını sınırlayan faktörler de özetlenmiştir [81].

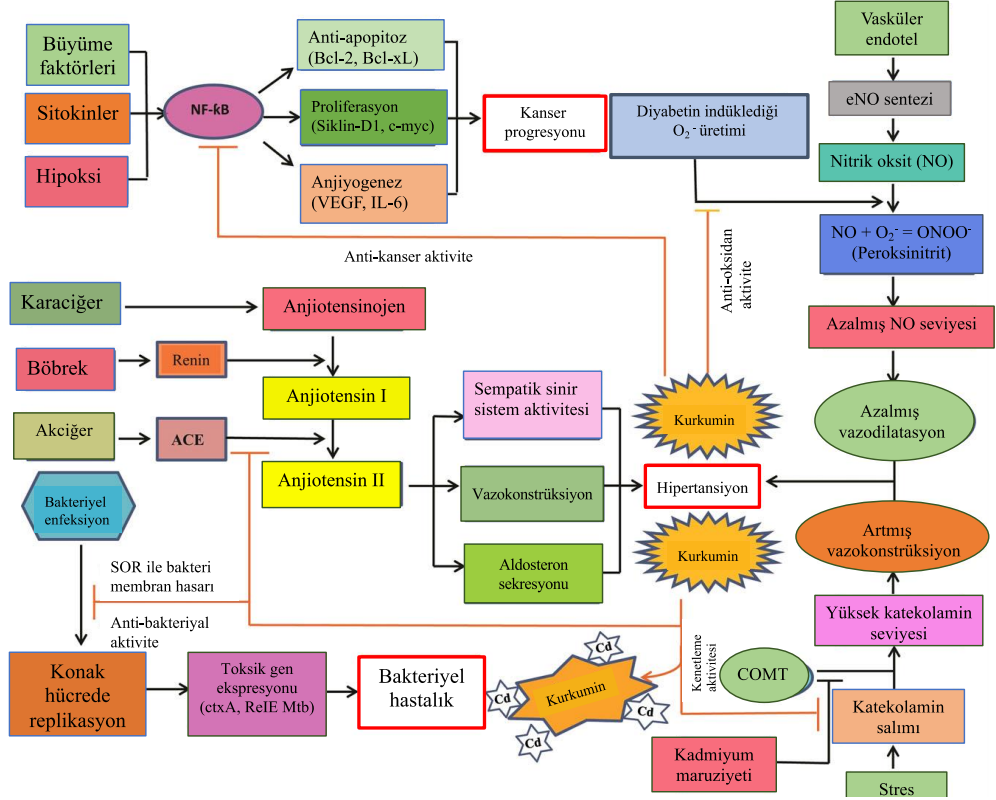
Kimyasal yapısında iki ferulik asit ünitesinin bir metilen grup ile bağlanması kurkuminin tipik bir Michael akseptörü olarak davranmasına sebep olmaktadır. Bu özelliği ile kurkumin tiyol (glutasyon) grupları ile kimyasal etkileşime girebilmektedir [82].

2.2.3. Kullanım Alanları

Bugün için çoğu hastalığa düzensiz enflamasyonun neden olduğu bilinmektedir. Bunun yanısıra, modern tıpta güvenli ve etkili bir antienflamatuvar ajan bulmak araştırmacılar için gerçek bir zorluktur. Son yıllarda yapılan kapsamlı araştırmalar, kurkuminin malign olan ve olmayan çok çeşitli hastalıklara karşı etkili olduğunu ortaya koymuştur. Epidemiyolojik çalışmalar ile kurkuminin pankreatit, artrit, enflamatuvar bağırsak hastalığı, kolit, gastrit, allerji dahil olmak üzere sayısız enflamatuvar hastalığa karşı olumlu etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca skleroderma, sedef hastalığı, multiple skleroz, diyabetes mellitus gibi çeşitli otoimmün hastalıklara etkisi de gösterilmiştir. Kurkuminin bu etkileri enflamatuvar öncül sinyallerin düzenlenmesi yoluyla olur. Kurkumin, hücresel düzeyde çok fazla sayıda büyüme faktörü, hücre yüzey reseptörü, transkripsiyon faktörleri, enzimler, enflamatuvar sitokinler ve gen ekspresyon mekanizmaları ile etkileşime girer. Öncelikli olarak kurkumin, enflamatuvar öncül gen ürünlerinin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyonunu baskılar. Ayrıca, kurkumin enflamasyon kaskadının ana başlatıcı enzimlerinden biri olan sikloksijenaz (COX) enzimini inhibe eder. COX inhibisyonu yanında kurkumin, 5-lipoksijenaz (5-LOX) aktif bölgesine bağlanarak enflamatuvar kaskadda önemli bir yer tutan lökotrienlerin sentezini de engeller. Bunun yanında kurkumin, enflamasyon ile bağıntılı birçok hücre yüzey bağlanma molekülünü, sitokin deşarjını engeller ve ortamda oksidan molekül yakalayıcısı olarak işlev görerek anti-oksidan özellik sergiler. Ayrıca, vasküler endotel büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü gibi anjiyogenez ile ilişkili moleküllerin aşağı regülasyonuna aracılık eder [61].

Kurkuminin kanser gelişimi ve tedavisinde de etkin olduğunu gösteren bir takım moleküler kanıtlar mevcuttur. Kurkumin, anti-apoptotik gen ekspresyonunu azaltarak, kaspaz aktivasyonu sağlayarak ve p53 gibi tümör baskılayıcı genleri aktive ederek

kanser gelişimini önler. Ayrıca, kanser metastazında tümör yayılımını kolaylaştıran matris metalloproteinaz enzimlerinin ve hücre yüzey adezyon moleküllerinin inhibisyonunu sağlar [83].



Şekil 2.6. Kürkümünin çeşitli terapötik etkileri ve hedefleri [70]

Kanser, geliştiği organ sisteminde anatomik ve fonksiyonel bozukluğa sebep olan ve vücudun diğer bölgelerine yayılma potansiyeli olan anormal hücre büyümesini içeren bir grup hastalıktır. Şimdiye kadar tespit edilebilen 100'den fazla kanser türü insan ırkını etkilemiştir. Kanser kök hücrelerinin, kanser patogenezi ve özellikle metastazında asıl sorumlu hücreler olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple kanser araştırmalarında klinik ve laboratuvar deneyleri ile hedefe yönelik tedavilerin asıl ilgi alanı haline gelmişlerdir [84].

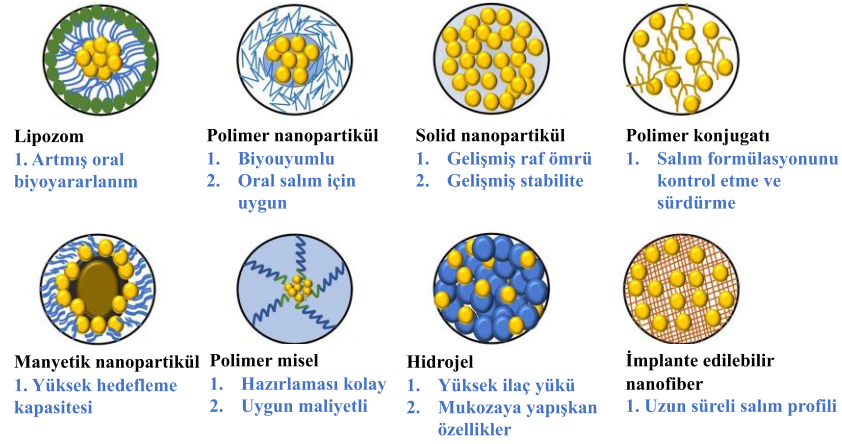
Hedefe yönelik tedavi, kanser için hormonal terapi ve sitotoksik kemoterapi yöntemlerinin haricinde farmakoterapi yöntemlerinden biridir. Bir moleküler tıbbi yöntem olarak, hedefe yönelik tedavi, geleneksel kemoterapi yöntemlerinde olduğu gibi

tüm hızla bölünen hücrelere müdahale etmek yerine tümör büyümesi için gerekli spesifik hedeflenmiş moleküllere müdahale ederek kanser hücrelerinin büyümesini engeller. Hedeflenen kanser terapilerinin geleneksel kemoterapi yöntemlerinden daha etkili ve normal hücrelere daha az zararlı olması beklenmektedir. Hedefe yönelik tedaviler, kanser immünolojisi alanı tarafından geliştirilen immünoterapiye örnektir. Dolayısıyla, terapötik hedefler için immün mekanizmalar kullanılarak organizmanın vereceği biyolojik tepki modifiye edilmeye çalışılır. Günümüzde, meme kanseri, akciğer kanseri, kolorektal kanser, baş ve boyun kanserleri, lenfoma, prostat kanseri, malign melanom ve multiple miyelom için hedefe yönelik tedaviler bulunmuştur [85].

Son yıllarda, kanser dahil olmak üzere vücudumuzda gelişen birçok hastalıkta barsak mikrobiyotasının önemi vurgulanmaya başlanmıştır. Günlük diyet içerisindeki kurkuminin insanlarda kanser inhibitör aktivitesini teşvik etmek için potansiyel olarak sindirim sistemi içinde benzersiz mikrobiyal türlerin zenginleşmesine yol açabileceğini gösteren çalışmalar ağırlık kazanmaya başlamıştır. Mc Fadden ve ark., bir muatjenik ajan olan azoksimetan ile oluşturdukları kolorektal kanser modelinde farelerin barsak mikrobiyotasında *Lactobacillus* miktarında azalma olduğunu ve diyet içeriğindeki kurkumin ayarlaması ile daha önce hücre döngüsü durması ve kolon kanseri hücre hatlarında apoptozun indüklenmesi yoluyla anti-tümör fonksiyonu sergilediği gösterilen kontrol seviyelerine *Lactobacillus* sayılarını geri yükselttiğini göstermişlerdir [86]. Başka bir hayvansal kolit modelinde, kurkuminin kolon epitel hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunu azaltarak ve kolon mukozasındaki CD4 + Foxp3 + düzenleyici T hücrelerinin genişlemesini arttırarak barsak enflamasyonunu azalttığı gösterilmiştir [87].

Hayvan deneyleri yanında insan çalışmalarında da kurkumin uygulamasının, faydalı ve patojenik mikroplar arasındaki oranı kayda değer şekilde değiştirdiği ve barsak enflamasyonunu bu şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Peterson ve ark., yaptıkları bir pilot çalışmada, diyet takviyesi olarak kurkumin kullanan insan deneklerinde barsak mikrobiyom profillerini araştırmış ve kurkumin tedavisinin *Clostridium*, *Enterobacter* gibi faydalı bakteri türlerini arttırdığını, bununla birlikte bazı *Blautia* ve *Ruminococcus* türlerini göreceli olarak azalttığını bildirmişlerdir [88].

Kurkuminin özellikle kolorektal kanserde etkinliğini gösteren in vivo çalışmaların artmasıyla beraber, kurkuminin biyoyararlanımını arttırmak üzere çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Kurkumin oral yoldan uygulandığında barsak ve karaciğerde hızlı metabolizmaya uğrar ve bileşiğin %60-70'i dışkı ile atılır, bu nedenle terapötik etkiler üretmek için ağır dozda kurkumin gerekir. Bu sebeple kurkuminin kolorektal kansere karşı terapötik etkinliğini arttırabilecek lipozom, misel ve nanoparçacık gibi yeni ilaç verme sistemleri ile kullanılması önerilmiştir [89].



Şekil 2.7. Avantajları ile birlikte kurkuminin çeşitli olası formülasyonları [90]

Singh ve ark., Silika nanopartikülü ve hyalüronik asit ile kombine edilmiş kurkuminin tek başına kurkumin bileşiğine göre kanser hücresi içine alınımında artış ve hücre canlılığında daha fazla azalma olduğunu göstermişlerdir [91]. Alizadeh ve ark., azoksimetan kaynaklı kolon karsinogenezinde polimerik nanotaşıyıcı kurkuminin serbest kurkumine oranla daha anlamlı lezyon boyutunda azalma, apoptozu indükleyen protein Bax ekspresyonunda artış, anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunda azalma gerçekleştirdiği gösterilmiştir [92]. Esmatabadi ve ark., kurkumin ile formüle edilmiş dendrozom nanotaşıyıcıları ile dendrozomun su çözünürlüğünün ve kurkuminin etki etme kabiliyetinin arttığını bildirmişlerdir [93].

Serbest kurkumin ve PLGA-kurkumin konjugatlarının karşılaştırıldığı bir başka çalışmada PLGA-kurkumin konjugatının, zamana ve doza bağlı bir şekilde HCT-116 ve

HT-29 hücre hatlarında serbest kurkuminden daha fazla hücre çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir [94].

Kurkuminin etkili olduğu gösterilmiş bir başka kanser türü ise bir santral sinir sistemi kanseri olan Glioblastoma Multiforme (GBM)'dir. Santral sinir sistemi tümörleri için ilaç araştırmalarında en önemli kısıtlayıcı faktör, ilacın sistemik yolla uygulanmasını takiben kan beyin bariyerini geçebilme kabiliyetine sahip olmasıdır. Dolayısıyla santral sinir sistemini ilgilendiren tedaviler için araştırılan molekülün kan beyin bariyerinin yüksek miktarda yağ molekülü içermesinden ötürü lipofilik olması gerekmektedir. Kurkumin lipofilik özelliği sebebiyle bu noktada fayda sağlayabilmektedir. Park ve ark., bir GBM hücre hattı olan U87 hücrelerinde belirli konsantrasyon ve süre ile kurkumin uygulamasının STAT-3 yolağının inhibisyonu, fascin (invazif kanser hücrelerinde hücre iskeletinde değişikliği sağlayan bir protein) ekspresyonunda azalma, hücre şekil değişimi ve hücre filopod (iplik şekilli olan ve uca doğru incelen, hareket edebilen hücrelerde bulunan bir yalancı ayak türü) oluşumunda azalma olduğunu göstermişlerdir [95]. Ayrıca Perry ve ark., GBM zenograftlarında kurkumin uygulaması ile azalmış anjiyogenez göstergesi olarak MMP 9, jelatinolitik enzim aktivitelerinin ve endotel hücre belirteçlerinin azaldığını göstermişlerdir [96].

Hücre sel büyüme, proliferasyon ve oksidatif stres ile ilişkili çoklu hücre sinyal yollarının modüle edilmesindeki güçlü aktivitesi sebebiyle kurkuminin, kardiyak hipertrofi, kalp yetmezliği, ilaca bağlı kardiyotoksisite, miyokardiyal enfarktüs, ateroskleroz, abdominal aort anevrizması, inme ve diyabetik kardiyovasküler komplikasyonlar gibi kalp ve damar sistemini ilgilendiren hastalıklarda da kullanımı önerilmiştir. Parodi ve ark., fare aort anevrizma modelinde 14 gün boyunca günlük 100 mg/kg kurkumin diyet uygulaması sonucunda aort çapında daralma, medial elastin tabakasında güçlenme ve enflamasyon öncül moleküllerde azalma olduğunu göstermişlerdir [97]. Ateroskleroz, dünyada artan bir halk sağlığı sorunu ve birçok vasküler trombotik hastalığın temeli olarak oldukça sık araştırılan bir konudur. Kurkuminin ateroskleroz üzerine olumlu etkileri olduğunu gösteren ilk hayvan çalışmasında araştırmacılar, ApoE/LDLR - / - farelerde 4 ay boyunca günlük 0.3 mg kurkumin tedavisi ile ateroskleroz insidansı ve ilerlemesini önemli ölçüde azalttıklarını vurgulamışlardır [98]. Farklı birçok araştırmada, kurkuminin ateroskleroza önlemedeki

etkisi TLR-4 azalması, NF-κB inhibisyonu, regülatuvar T hücre oranlarında artış, scavenger reseptör-A (SR-A) azalması, makrofajların LDL alımının azalması gibi yollar ile ilişkilendirilmiştir [99-101].

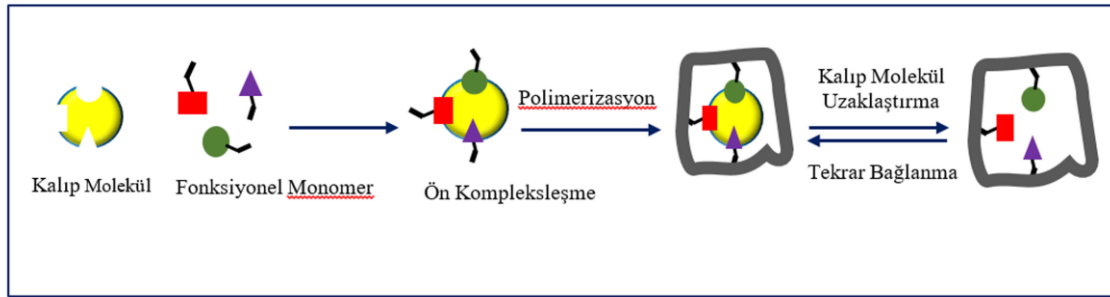
Hong ve ark., akut miyokard enfarktüsü modeli geliştirdikleri ratlarda 3 gün boyunca 75 mg/kg/gün kurkumin uygulanan çalışma grubunda uygulanmayan gruba göre miyokard enfarktüs alanının daha küçük olduğunu; kardiyak fonksiyon, ve enzimatik belirteçlerin daha iyi olduğunu göstermişlerdir [102].

Antitümör, antiinflamatuvar, antitrombotik, antidiyabetik ve antimikrobiyal fizyolojik etkilerinin yanında kurkuminin fitokimyasal, floresan polifenol olarak optik özelliklerinden dolayı kimyasalların saptanması için bir sensör malzemesi olarak kullanılabilceği de savunulmaktadır. Kurkumin türevleri, keto-enol izomerizasyonlu 1,3-diketonlar taşıyarak Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Pt^{+2} , Re^{+2} ve Al^{+3} gibi birçok katyon ile kompleksler yapabilir ve bu metal iyonları ile kompleksi, suda çözünürlüğüne ve çeşitli renk tonlarının yanı sıra sitotoksik ve antimikrobiyal etkilere neden olur. Ayrıca, kurkuminin sistein ve poli-gliserol akrilat gibi bazı organik bileşiklerle konjügasyonu, sulu ortamda pikrik asit ve 2-vinil piridin için etkili bir floresans tespit edilmesini sağlar. Bu özellikler sebebiyle kurkumin, kimyasal sensörlerin membran bileşimi olarak ve sensör platformlarında kullanılmaya başlanmıştır [103].

Patil ve ark., tasarladıkları gadolinyum-DOTA (Gd-DOTA) ve kurkumin ile kovalent bağları olan poli β-L-malik asit bazlı bir nano görüntüleme aracı ile kan beyin bariyerinden geçebilen ve Alzheimer hastalığına spesifik amiloid plaklarına seçici olarak bağlanabilen bir sistem kurmuşlardır. Kurkuminin floresan özelliği sayesinde insan ve fare türlerinde manyetik rezonans görüntüleme plaklar yüksek kontrast artışı sergilemiştir [104]. Kalorimetrik, spektrometrik ve flöresans yöntemler ile kurkuminin tautomerik kimyasal yapısından faydalanılarak anyonik ve katyonik bileşen tayini ve biyosensör araştırmaları büyük bir hızla artmaktadır [105,106].

2.3. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılanmış polimerler, kalıp molekül için spesifik bağlanma yerleri içeren çapraz bağlı polimerlerdir. Kısaca, bu prosedürde bir kalıp (hedef) molekül, bir çözücü içinde çözülmüş bir monomer ve çapraz bağlayıcı karışımına dahil edilerek üç boyutlu polimer matrisi elde edilir. Kalıbın hazırlanmış polimerden çıkarılmasından sonra, polimer matrisi içinde oluşturulan orijinal kalıbın kalıcı boşlukları, seçici olarak yeniden bağlanabilen kalıp moleküllerin şekline, boyutuna ve yönüne karşılık gelir. Elde edilen polimer, moleküler baskılanmış polimer (MIP) olarak adlandırılır [107].



Şekil 2.8. Moleküler baskılamanın şematik gösterimi

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT), kalıp molekülün, kalıp molekülü çevreleyen fonksiyonel monomerlerle 3 boyutlu etkileşimlerini ve çapraz bağlayıcılar ile fonksiyonel monomerlerin kopolimerizasyonunu içeren bir süreçtir. MIT, ayrılmaz bir yapı oluşturmak için bir molekülün diğerlerine bağlandığı moleküler tanıma dayanır. Antijen-antikor etkileşimleri, DNA replikasyonu, enzimatik kataliz, sinyal iletimi, protein sentezi vb. doğal süreçlerde moleküler tanıma gözlenir. MIT, biyolojik sistemlerdeki moleküler tanımayı olağanüstü kararlılık ve sağlamlıkla sentetik sistemlere getirir. İlaç salım sistemlerinde MIT kullanımı, daha yüksek yükleme kapasitesi, sürekli salım, uyarana duyarlı salım ve daha etkili enantiyomerin enantiyoseçici yüklenmesi ve salınması gibi olağanüstü avantajlar sağlar [108].

Moleküler baskılamayla ilgili ilk raporlardan biri Wulff ve Sarhan tarafından 1972'de yayınlanmıştır [109]. Moleküler baskılama, moleküler tanıma bölgelerini hazırlamak için en popüler yöntemlerden biridir ve hedef moleküllerin tamamlayıcı parçalarının

hazırlanması için artan girişimlerle ilgiyi kendine çekmiştir. Bu yöntem esas olarak kalıp olarak adlandırılan hedef molekülün çevresinde meydana gelen moleküler tanımlama reaksiyonuna dayanır. Ön kompleks ilk olarak kalıp ve fonksiyonel monomerler tarafından oluşturulmuştur. Polimerizasyon, moleküler tanıma alanlarını üretebilen kalıbı bağlamak için fonksiyonel grupların pozisyonunu koruyan çapraz bağlayıcı ve ön kompleks etkileşimlerinden sonra tamamlanmaktadır. Polimerizasyon aşamasının sonunda, polimerik matriks, kalıbı uygun desorpsiyon maddeleriyle kaldırdıktan sonra özel tanıma alanlarına sahiptir, bu nedenle moleküler olarak baskılanmış polimerler (MIP'lar) diğer rakip moleküllere kıyasla kalıbı yüksek seçicilikle bağlayabilir [110]. MIP'lar, çeşitli çapraz bağlayıcılar, fonksiyonel çapraz bağlayıcılar, fonksiyonel monomerler ve çözücülerin çeşitli kombinasyonları ile üretilir. MIP'ların kalitesi ve bağlanma özellikleri, sadece karışımın kombinasyonu yoluyla değil, aynı zamanda başlatıcı tipi ve miktarı, polimerizasyon sıcaklığı, etkileşim mekanizmaları ve benzeri deneysel koşullar ile de değiştirilir [111].

MIP ağ yapısı, monomer kimyasının türüne (anyonik, katyonik, nötr, amfifilik), monomerler ve asılı gruplar arasındaki etkileşimlere, çözücüye ve yapının oluşturulduğu beslemedeki bağlı monomer miktarlarına bağlıdır. Tanıma, üç boyutlu yönlendirme gerektirdiğinden, çoğu teknik, yüksek oranlarda çapraz bağlayıcıyı fonksiyonel monomerlerle kullanarak bellek alanının makromoleküler zincir gevşemesi, şişme fenomeni ve diğer işlemler yoluyla hareketini sınırlar. Çapraz bağlanan monomer içeriğindeki bir artış, çapraz bağlar arasındaki ortalama moleküler kütlenin azalmasına yol açtığından, makromoleküler zincirler daha sert hale gelir. Daha az çapraz bağlı sistemlerde, makromoleküler zincirlerin hareketi veya daha spesifik olarak, seçilen yeniden bağlama çözücüsüne (segment-çözücü etkileşimini karakterize eden termodinamik etkileşim parametreleri) veya uygulama çözüm ortamına bağlı olarak ağ genişledikçe veya daraldıkça fonksiyonel grupların aralıklarının hareketi değişecektir. Bu süreç tersine çevrilebilir ve geçici olarak bağlanma davranışını etkiler ve değişen afiniteye ve azalmış seçiciliğe sahip bölgelere yol açar [112].

Baskılama modu, özellikle kovalent olmayan ve kovalent baskılama arasındaki seçim, baskılanmış bölgelerdeki tanımanın özgüllüğü ve baskılı molekülün bağlanma ve salım kinetiği üzerinde büyük bir etki yaratacaktır. Kovalent baskı genellikle daha spesifik

tanıma özellikleri sunar; bununla birlikte, bağlanma ve salım kinetiği yavaş olma eğilimindedir ve bilinen yalnızca sınırlı sayıda kolaylıkla tersine çevrilebilir kovalent bağlar vardır ve çoğu zaman yeni kalıp monomer komplekslerinin sentezlenmesi gerekir. Bir ilaç salım cihazına yeni bir sentetik bileşiğin eklenmesi, fizyolojik koşullar altında baskılı malzemeden reaksiyona girmemiş monomer-kalıp kompleksinin sızma olasılığı varsa, güvenlik hususlarını beraberinde getirebilir.

Moleküler tanıma materyalleri olarak MIP'ların hazırlanmasında kovalent olmayan yaklaşım son yıllarda daha çok tercih edilmektedir. Bu yolla yapılan MIP'lar daha uygun bağlanma ve salım kinetiğine sahipken, daha önce biyomalzemelerin sentezinde kullanılan ve fizyolojik özellikleri zaten bilinen monomerler kovalent olmayan baskılamada bir hayli yer edinmiştir. Bu sentez yöntemi, genellikle bir dizi bağlanma bölgesi özgünlüğüne sahip MIP'larla sonuçlanır ve baskılama için kovalent olmayan yaklaşım genellikle oldukça zayıf moleküller arası etkileşimlere (hidrojen bağı, k-k yığılması ve hidrofobik etkileşimler) dayandığından, çoğu kovalent olmayan baskılama organik çözücüler içinde gerçekleştirilir. Biyomedikal uygulamalar için, bu çözücülerin ve diğer kalıntıların, malzeme kullanılmadan önce uzaklaştırılması gerekir. Bu problem, kalıbın monomer karışımında çözünür olduğu ve başka çözücülerin eklenmesine gerek olmadığı bazı durumlarda aşılabilir. Çökeltme polimerizasyon yöntemleri de bu sorunu azaltabilir; çünkü nihai polimerler polimerizasyonda kullanılan çözücü ile genellikle tamamen karışmaz ve polimer ve çözücünün kolay ayrılmasına izin verir [18].

İlgili molekülün, kovalent, kovalent olmayan veya metal iyon koordinasyonu etkileşimleri yoluyla fonksiyonel monomerlerle etkileşime girmesine izin verilir. Genel olarak, moleküler baskılama ile ilaç salımına yönelik çalışmalar, ilaç verme sistemleri için yetersiz olabilecek kovalent olmayan etkileşimleri araştırmıştır. Metal iyon koordinasyon baskısı, zayıf kovalent olmayan etkileşimler için alternatif bir yaklaşımdır [113]. Metal iyon koordinasyonunun hidrojen bağına göre daha yüksek kuvveti vardır, bu da onu sulu ortamda daha kararlı hale getirir. Ek olarak, metal iyon koordinasyonu hızlı bir bağlanma sürecidir ve bağlanma kuvveti, tanımlanmış bir kalıp molekül için uygun metal iyonu seçilerek ayarlanabilir. Ayrıca, farklı amaçlar için moleküler baskılı polimerin seçiciliğini veya kullanımını artırmak için metal iyonunu başka bir iyonla değiştirmek mümkündür. Bu nedenle, metal iyon koordinasyon yaklaşımı, sulu ortamda

yüksek düzeyde spesifik moleküler baskı yapan polimerlerin hazırlanması için önemli bir potansiyele sahiptir [114].

Monomer tipi ve bileşime göre makromoleküler yapıyı tasarlarken, çapraz bağlanan monomerin moleküler kütlesi arttıkça, şişme veya küçülme olgusuna bakılmaksızın olası bağlanma rejimlerinin kaybını önlemek için fonksiyonel monomer veya monomerlerin uzunluğu buna göre artmalıdır. Bu, esas olarak, polimerizasyon kinetiği ve polimerizasyon sırasında oluşan zincirlerin doğası ile ilgilidir ve ağ yapısını moleküler düzeyde etkiler. Yüksek çapraz bağlanan monomer oranları ile oluşturulan zincir tipleri, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcının birincil kopolimer zincirlerinden ve her bir makromer birimini bağlayan diğer çapraz bağlanan monomer zincirlerinden oluşur. Bu, araştırmacıların, fonksiyonel monomer moleküler kütlesinde (doğrusal boyut) karşılık gelen bir artış olmadan çapraz bağlayıcının moleküler kütlesini artırarak belirli bir analiti baskılamada marjinal başarı görmelerinin olası bir nedenidir. Benzer şekilde, çapraz bağlayıcı moleküler boyutunun belirli bir sınırın altına düşürülmesi, kalıp difüzyonu ve yeniden bağlanma için çok kısıtlı bir ağ üretecektir [115].

Bu nedenle, doğrudan kalıbın boyutuna bağlı olan, fonksiyonel monomer moleküler kütle oranına optimum bir çapraz bağlanma vardır. Bugüne kadar baskılanmış küçük moleküler kütle molekülleri türleri için, etilen glikol dimetakrilat şu anda mevcut fonksiyonel monomerlerle en çok tercih edilen ve başarılı seçim olmuştur. Çok işlevli çapraz bağlayıcılar için, vinil zincirlerinin karşılık gelen doğrusal bölümlerinin, çapraz bağlayıcının fiziksel moleküler doğasına bağlı olarak farklı bir uzunluk ölçeğinde de olsa aynı mantığı izlemesi beklenir. Bununla birlikte, makromoleküler zincirlerin boyutu arttıkça zincirlerin esnekliğinin de artacağını dikkate almak önemlidir. Bunların stabilize edilmesi gerekebilir veya gerekemeyebilir. Moleküler baskılı polimerler, zorlu koşullara (örn. termal, mekanik ve oldukça asidik ve bazik pH koşulları) karşı yüksek seçicilik, stabilite ve dayanıklılık sergiler. Yüksek seçicilikleri ve kararlılıkları nedeniyle MIP'lar kromatografik ayırma gibi çok sayıda uygulama için uygulanmıştır [107].

Baskılama teknolojisi, MIP bazlı sorbentlerin, sabit fazların, sensör arayüzünün geliştirilmesinde veya biyolojik antikörlere ve reseptör sistemlerine alternatif olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır [116]; ancak MIP'lerin ilaç salım sistemlerinde uygulanması in vitro olarak kanıtlanması aşamasında hala gelişmektedir. Bununla birlikte, MIP'lar, geleneksel polimerlere kıyasla bazı benzersiz özelliklerden dolayı ilaç salım sistemi kullanımı için büyük bir potansiyele sahiptir. Özel fizikokimyasal özellikleri, salım profilini uzatmalarına ve aktif bileşeni (antikanser ilaç) vücuttan geçişi sırasında enzim bozulmasından korumalarına izin verir. Dahası, ilaç kalıbı ve moleküler baskılama ile tanımlanan polimer fonksiyonel grupları arasındaki özel olarak tasarlanmış afinite, bu polimerlere baskısız olanlara kıyasla daha yüksek bir ilaç yükleme kabiliyetine sahip olma özelliğini getirir. Ek olarak, halihazırda yayınlanmış çalışmalar, MIP'ların baskılanmış kalıbı daha uzun süreli bir şekilde serbest bırakabildiğini ve uzun süre boyunca sıfır dereceli bir ilaç salımına ulaşılabileceğini gösterdi, bu da geleneksel ilaç dağıtımına göre açık bir avantajı temsil ediyor [117].

İdeal olarak, MIP tabanlı ilaç salım sistemleri, yükü kendi terapötik aralığı içinde serbest bırakabilmeli, böylece ilaç uygulama sıklığını ve kemoterapötiklerin yan etkilerini azaltabilmelidir. Ayrıca, ilaç salımı, belirli bir uyarının (yani, bir biyobelirteç konsantrasyonundaki bir değişikliğin) ilacın insan vücudundaki belirli bir bölgede salınmasını başlatacağı bir geri bildirim mekanizması ile değiştirilebilir; ilaç salımı, biyobelirteç belirli bir sınırın üzerinde olduğu sürece devam eder ve biyobelirteç seviyesi düştüğünde durur. Açık ki, baskılanmamış ilaç salım sistemleri için geçerli olduğu gibi, diğer fiziksel (sıcaklık, ultrason, ışık, manyetik veya elektrik alan) veya kimyasal (pH, redoks potansiyeli, iyonik güç) uyarılar, kemoterapötiklerin MIP bazlı ilaç salım sistemlerinden kontrollü salımı için hala en uygulanabilir sistem olarak geçerliliğini korumaktadır. Baskılanmış polimerler biyolojik olarak uyumlu olmalı, immünojenik olmamalı ve biyolojik olarak parçalanabilir olmalıdır [118].

İmplant edilebilir sistemler, sürekli bir ilaç salımı için tümöre yakın bölgede büyük dozlarda ilaç verebilir. Bu nedenle kemoterapinin terapötik etkisini etkin bir şekilde artırabilir ve ilacın toksik etkilerini büyük ölçüde azaltabilirler. PHEMA, yüksek su içeriği, düşük toksisite ve iyi doku uyumluluğu gibi faydalı özelliklerinden dolayı en yaygın kullanılan biyomateryallerden biridir. Aynı zamanda yüksek kan uyumluluğuna

sahiptir ve bozulmaya karşı yüksek direnç gösterir. Kriyojeller subkutan veya intraperitoneal olarak implante edilebilir. PHEMA, biyolojik olarak parçalanamadığı için, ilaç salındıktan sonra, taşıma sisteminin vücuttan çıkarılması için küçük cerrahi gereklidir [119].

Polimerizasyon reaksiyonunun sonunda, baskılanmış polimerden kalıbın çıkarılması, analitik uygulamalarda zorunlu ve kritik bir adımdır ve bunun sonucunda moleküler tanıma aşaması için baskılanmış boşlukları ortaya çıkarır. Bununla birlikte ilaç salım uygulamalarında, toksik olmayan monomerler kullanıldığı sürece, kalıp ekstraksiyonuna gerek yoktur. İyi tanımlanmış baskılanmış boşluklar elde etmenin anahtarı, kalıp molekülü polimerizasyon süreci boyunca "yerinde kilitleyecek" bir kalıp-fonksiyonel monomer kompleksi oluşturabilen doğru monomerlerin seçilmesine ve polimerik matriksin en uygun sertliğini sağlamaya dayanır [120].

Moleküler baskı sürecinin verimliliğinin karşılaştırılmasında anahtar niceliksel parametre, kromatografik kapasite faktörü / bağıl yanıt oranı (ayırma ve algılamada) veya yüklenmiş ilaç miktarı (ilaç salımında) olarak hesaplanan baskılama faktörüdür (IF). Bu değerlendirme baskılanmış polimerin (MIP) baskılanmamış polimere (NIP) kıyasıyla mümkündür. Moleküler baskılanmış ilaç salım sistemleri için, polimerin baskılı bölgelerine spesifik olarak bağlanan ilaç yükü miktarı ve nihayetinde elde edilen IF, kalıp çıkarıldıktan sonra karşılaştırmalı yeniden bağlama çalışmaları (MIP'a karşı NIP) ile belirlenir [118].

2.4. Hidrojeller ve Kriyojeller

2.4.1. Hidrojeller

Hidrojeller, büyük miktarlarda su veya biyolojik sıvıları emebilen üç boyutlu, hidrofilik, polimerik ağlardır. Yüksek su içeriği, gözeneklilik ve yumuşak kıvamı nedeniyle, doğal yaşam dokusunu, diğer sentetik biyokimya sınıflarından daha yakın simüle ederler. Hidrojeller kimyasal olarak stabil olabilir veya bozulabilir ve sonunda parçalanabilir ve çözülebilir [121].

Hidrojellerin çekici fiziksel özellikleri, özellikle gözeneklilikleri, yüklü ilacın sürekli salımı gibi ilaç salım uygulamalarında muazzam avantajlar sunar. Aktif farmasötik bileşenin yüksek bir lokal konsantrasyonu, difüzyon, şişme, kimyasal veya bazı çevresel uyarılara dayalı olarak kontrol edilen uygun bir salım mekanizması ile uzun bir süre muhafaza edilir. Bir madalyonun iki yüzü gibi, kullanımlarıyla ilgili dezavantajlar da vardır. İlaç salımındaki birincil dezavantaj çoğu ilacın hidrofobikliği olacaktır. Suyu seven polimerik çekirdek muhtemelen uyumsuz hidrofobik ilaçları tutmak için çok ideal değildir. Bu durum şu anda hastalık tedavisinde kullanılan ve etkili olan birçok hidrofobik olduğundan bir sorundur. Bu hidrojenlerin gerilme mukavemeti zayıftır ve bu bazen ilacın hedef bölgeye varmadan önce, erken salınmasına neden olur [122].

Hidrojenler özellikle çekici bir ilaç salım sistemidir ve kardiyoloji, onkoloji, immünoloji, yara iyileşmesi ve ağrı yönetimi dahil olmak üzere birçok tıp dalında kullanılmıştır. Hidrojenler büyük miktarda su ve çapraz bağlı bir polimer ağından oluşur. Yüksek su içeriği (tipik olarak %70-99) dokulara fiziksel benzerlik sağlar ve hidrojenlere mükemmel biyouyumluluk ve hidrofilik ilaçları kolayca kapsülleme kabiliyeti verebilir. Ayrıca, tipik olarak sulu çözeltilerde olduğu için, organik çözücülere maruz kaldığında ilaç denatürasyonu ve agregasyon riski en aza indirilir [32].

Hidrojenlerden şişme kontrollü ilaç salımı, bir biyo-sıvı ile temas ettiğinde şişmeye başlayan camsı bir polimer içinde dağılmış ilaçları kullanır. Şişme sırasındaki genişleme, polimer zincirinin gevşemesiyle birlikte ilaç difüzyonunu kolaylaştırır. Aksi takdirde Durum II taşınması olarak adlandırılan süreç, zamandan bağımsız, sürekli ilaç salım kinetiklerini destekler. Hidrojel içindeki dağılmış ilaç ve çevresindeki ortam arasındaki gradyan, aktif bileşen hidrojel içindeki daha yüksek konsantrasyonlu bir bölgeden daha düşük bir bölgeye difüzyona izin verdiğinden, süreç aynı zamanda difüzyon ve ilaç salımını sağlamak için şişme süreçlerini birleştirdiğinden anormal taşıma olarak da adlandırılır [122].

Hidrojellerin varlığı, Wichterle ve Lim'in kontakt lenslerde PHEMA hidrofilik ağlarının kullanılmasını önerdiği 1960 yılına dayanmaktadır. O zamandan beri, hidrojellerin kullanımı çeşitli biyomedikal ve farmasötik uygulamalara kadar genişledi. Diğer sentetik biyomalzemelere kıyasla hidrojeller, nispeten yüksek su içeriği ve yumuşak ve lastik kıvamı nedeniyle canlı dokulara fiziksel özelliklerine çok benzemektedir. Hidrojeller, düşük arayüzey gerilimleri nedeniyle vücut sıvılarından proteinleri adsorbe etme konusunda minimum eğilim gösterir. Ayrıca, farklı büyüklükteki moleküllerin hidrojellerin içine (ilaç yüklemesi) ve dışına (ilaç salımı) yayılma kabiliyeti, kuru veya şişmiş polimerik ağların oral, nazal, bukkal, rektal, vajinal, oküler ve parenteral uygulama yolları için ilaç verme sistemleri olarak kullanılmasına izin verir [123].

Kurkuminin çeşitli terapötik faydaları olduğu gösterilmiştir ve geleneksel tedavide muazzam uygulamaları bulmuştur. Uygulanmasının zorlayıcı yönü, suda son derece düşük olan çözünürlüğüdür. Bununla birlikte, glisirhetinik asit molekülü ile modifiye edilmiş kurkumin bazlı hidrojel, hepatosellüler karsinom için çözünmeyen ilacın verilmesine ilişkin sorunu gidermek için geliştirilmiştir. Projelatör formunda sağlanan GA molekülü ile modifiye edilmiş kurkumin, glutatyon ile disülfid azalmasına bağlı olarak in vitro bir supramoleküler hidrojel üretebilir ve HepG2 hücrelerinde bildirildiği gibi kurkumin biyoyararlanımını ve çözünürlüğünü artırabilir. Test edilmiş olan zaten bilinen bir kurkumin hedefleme bileşiğine göre in vitro olarak hidrojel ile daha yüksek hücresel alım ve güçlü anti-kanser aktivitesi gözlenmiştir [124].

Bir hidrojinin işlevi, yani belirli bir polimerik ağ için karakteristik olan denge şişmesi, şişme kinetiği, geçirgenliği ve biyoyumluluk özelliklerinin merkezindedir. Üretilen partilerin verimli ürün performansı ve kalite güvencesi için uygun bir karakterizasyon yöntemi gereklidir. Çizelge 2.3, hidrojinler için bazı önemli karakterizasyon parametrelerini ve bunları ölçmek için kullanılan yöntemleri vurgulamaktadır [123].

Çizelge 2.3. Hidrojeller için Karakterizasyon Parametreleri [123]

Parametre	Ölçüm Tekniği
Ağsı yapı gözenek büyüklüğü	Elektron mikroskobu, porozimetre, denge şişme deneyleri
Çapraz bağlayıcı ve mekanik dayanım	Nihai basınç dayanımı, zamanla polimer çözünürlüğündeki değişim
İlaç dağılımı	Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM)
İlaç difüzyonu	Membran geçirgenliği, kontrollü salım deneyleri, nükleer manyetik rezonans (NMR), FTIR, SEM
Şişme derecesi	Zamanla boyutsal değişiklikler, şişme ile hacim veya kütle değişimi, denge su miktarı

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM), diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA) ve şişme kinetiği; monomer konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı, soğutma hızı ve kriyojelin gözenek yapısı, mekanik davranışı, şişme derecesi ve gözeneklilik üzerindeki etkilerini belirlemek için kullanılan analitik tekniklerdir [125].

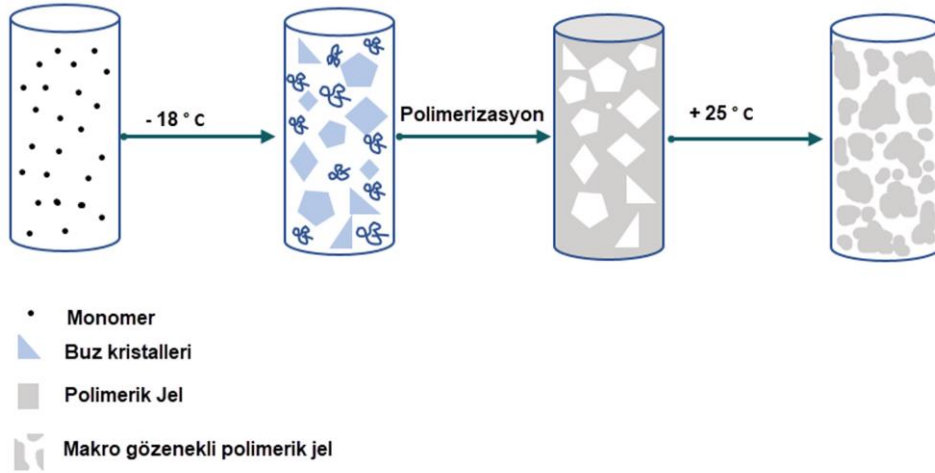
2.4.2. Kriyojeller

Kriyotropik jelleşme, bir jel oluşumu sürecidir ve kriyojeller adı verilen süper gözenekli hidrofilik jeller üretmek için kullanılmıştır. Kriyojeller, mevcut bir başlatıcı / aktivatör çifti kullanılarak sıfırın altındaki sıcaklıklarda sentezlenebilen birbirine bağlı süper gözenekli malzemelerdir [4]. Polimerizasyon, buz kristalleri arasındaki ara yerlerde meydana gelerek donmuş monomer solüsyonunda gerçekleştirilir. Kristaller, polimerizasyon sırasında yapı iskelesi boyunca bir porojen görevi görür ve çözme işleminden sonra süper-gözenekli bir polimer oluşur. Kriyojellerin büyük gözenekler (10–200 µm), kısa difüzyon yolları, esneklik, iyi biyouyumluluk ve yüksek mekanik

mukavemet gibi önemli özellikleri, onları biyomoleküllerin immobilizasyonu için etkili taşıyıcılar haline getirir. Kriyojeller tipik olarak, çözünen maddelerin engellenmemiş difüzyonuna ve ayrıca partiküllerin kütsel taşınmasına izin veren birbirine bağlı süpergözenekli polimerlere sahiptir. Kompozit kriyojeller, diğel polimerik malzemelerle birleştirilerek hazırlanabilir ve bu polimerler, ilaç dağıtımı, doku mühendisliğı, protein saflaştırma, enzim aktivitesi dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. Bu nedenle, süper gözenekli kompozit kriyojeller, teknolojik açıdan zorlu biyoayırma süreçlerinde ve yüksek verimli analizlerde kullanılmak üzere özel olarak tasarlanmıştır [126].

Kriyojel, monomerlerin polimerizasyona eklenmesi veya çözücünün donma noktasından daha düşük bir sıcaklıkta bir polimerin çapraz bağlanma reaksiyonu yoluyla hazırlanan elastik, gevşek ve gözenekli süngerimsi bir hidrojeldir. Kriyojel esas olarak, gözenekli yapı, yüksek verim ile moleküler baskılama tekniğinin yüksek seçicilik avantajını birleştiren, analitik kimyada moleküler baskılanmış kriyojel bazlı katı faz ekstraksiyonu biçiminde kullanılmıştır [127].

Bir hidrojel alt sınıfı olan kriyojeller, benzersiz fiziksel özelliklere sahip biyomalzemelerdir. Kriyojeller (veya dondurularak çözülmüş kriyojeller) sıfır altı sıcaklıklarda (tipik olarak -5 ve -20 °C arasında) kriyojelasyon yoluyla oluşturulur. Tipik olarak, kriyojelasyon işlemi, 1) buz kristali oluşumu ile faz ayrımı, 2) buz kristalleri arasında donmamış bir sıvı fazda konsantre edilmiş reaktif varlıkların çapraz bağlanması/polimerizasyonu, ardından 3) açık ve birbirine bağlı makro gözenekli bir polimer ağ oluşturmak için buz kristallerinin buzunun çözülmesi dahil birkaç adımı içerir [128].



Şekil 2.9. Kriyopolimerizasyonun şematik gösterimi

Uygun bir jelleşme süresinden sonra kriyojel oda sıcaklığına döndürülür. Çözücü kristalleri eriyerek ağı nemlendirirken, birbirine bağlı makro gözenekli bir hidrojel yapısı oluşur. Tamamen eridiğinde, bir kriyojelin gözenekleri, onları oluşturan çözücü kristallerin keskin kenarlı doğasına rağmen sıvı/gözenek duvarı arayüzündeki yüzey gerilimine bağlı olarak yuvarlanır. Bu yapının oluşumu, birbirine bağlı makro gözeneklerin varlığı nedeniyle gözeneksiz hidrojellere kıyasla sünger benzeri kriyojellerde önemli ölçüde daha hızlı elde edilir. Doku mühendisliği uygulamaları için, hidrojeller içindeki gözeneklerin, hücrelerin göçüne ve çoğalmasına izin vermek ve erişilemeyen bölgeleri sınırlandırmak için yüksek oranda birbirine bağlı olması arzu edilir. Gözenek ara bağlantısının gerekliliği kriyojel tekniğinin diğer gözenek oluşturma tekniklerine göre önemli bir avantajını vurgulamaktadır, çünkü kriyojeller doğaları gereği yüksek oranda birbirine bağlıdır. Çözücü kristalizasyonu sırasında, çözücü kristalleri, ön kenar başka bir kristal cepheyle temas edene kadar büyür ve bu da yüksek oranda birbirine bağlı gözenekli jeller ile sonuçlanır [129].

Çapraz bağlanma/polimerizasyon aşaması iki ana mekanizma yoluyla gerçekleşir: kimyasal veya fiziksel. Kimyasal çapraz bağlanma, kovalent reaksiyonlar ve monomerlerin veya öncül polimerlerin çapraz bağlanması yoluyla gerçekleşir. Kimyasal olarak çapraz bağlı kriyojeller, reaktif türlerin (monomerler, prepolimerler) buz kristalleri arasında polimerize olduğu sıfır altı sıcaklıklarda oluşur [130]. Öte yandan, polimer zincirleri arasındaki iyonik veya hidrofobik etkileşimler yoluyla fiziksel çapraz

bağlanma meydana gelir. Fiziksel olarak çapraz bağlı kriyojeller için, polimerler ya polimerizasyon kinetikleri yavaş/geciktğinde buz kristalleri etrafında konsantre edildikten sonra ya da hızlı polimerizasyon kinetiği sergileyen polimerler için kriyo işleminden (donma-çözülme döngülerine tabi fiziksel hidrojel) önce çapraz bağlanır [131].

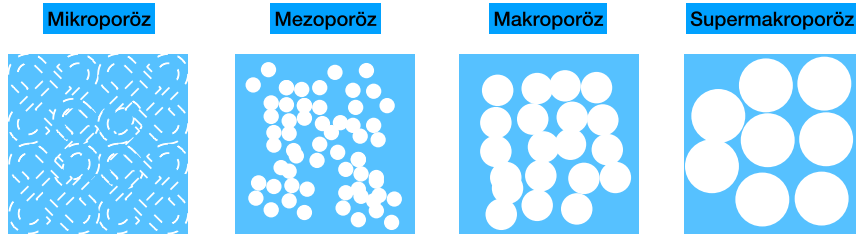
Fiziksel çapraz bağlama, kriyojel üretimi için çok basit ve hızlı bir işlem olabilir, çünkü fiziksel kriyojeller herhangi bir kimyasal reaksiyon olmadan gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, birkaç grup, örneğin ilaç uygulama uygulamalarında, parçalanabilirlik, kırılabilirlik, yetersiz jel bütünlüğü ve sertlik gibi zayıf ve güvenilmez jel özellikleri dahil olmak üzere bir dizi sınırlamaya sahip fiziksel kriyojel bildirmiştir [132]. Bunun aksine, kimyasal olarak çapraz bağlı kriyojeller (kimyasal kriyojeller) genellikle fiziki olarak daha karardır ve daha tanımlanmış ve öngörülebilir özelliklerdir.

Kriyojeller, toz, levha, çubuk ve monolitik malzeme şeklinde hazırlanabilir. Kriyojelin uygun bir formu performansını artıracaktır. Moleküler baskılı kriyojelin monolitik bir kolonu aracılığıyla, kriyojel üzerindeki yapısal analogları ile hedef maddenin rekabetçi tutma mekanizmasını keşfedebiliriz. Bir kriyojel, moleküler olarak baskılanmış polimerik partiküllerle gömüldüğünde, kriyojelin spesifik yüzey alanı ve adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde geliştirilecektir. Kriyojel aynı zamanda moleküler baskılanmış ayırma membranı olarak da hazırlanabilir, ki bu büyük miktarlarda biyolojik numunelerin yüksek verimle işlenmesine yardımcı olur [127].

Kriyojellerin fiziksel karakterlerini ve özelliklerini kontrol etmek için bir dizi parametre ayarlanabilir [129]. Örneğin, polimerizasyon sıcaklığının düşürülmesi veya kriyojelasyondan önce soğutma hızının artırılması tipik olarak hızlı buz kristali çekirdeklenmesini ve büyümesini indükler. Sonuç olarak, kriyojeller daha küçük gözenek boyutları gösterir. Çapraz bağlama yöntemi, kriyojel üretilirken dikkate alınması gereken önemli bir parametredir. Örneğin enjekte edilebilir kriyojeller, fiziksel olarak çapraz bağlanmış olanlar önemli ölçüde daha zayıf olma ve zarar görmeleri kolay olma eğiliminde olduğundan genellikle kimyasal olarak çapraz bağlanırlar. Polimerlerin moleküler ağırlığının ve/veya konsantrasyonunun artması, gözenek boyutlarının azalması ve bir dereceye kadar gelişmiş mekanik stabilite sergileyen kriyojellerle ilişkilendirilmiştir. Serbest radikal kriyopolimerizasyonu, redoks veya foto-başlatıcıların

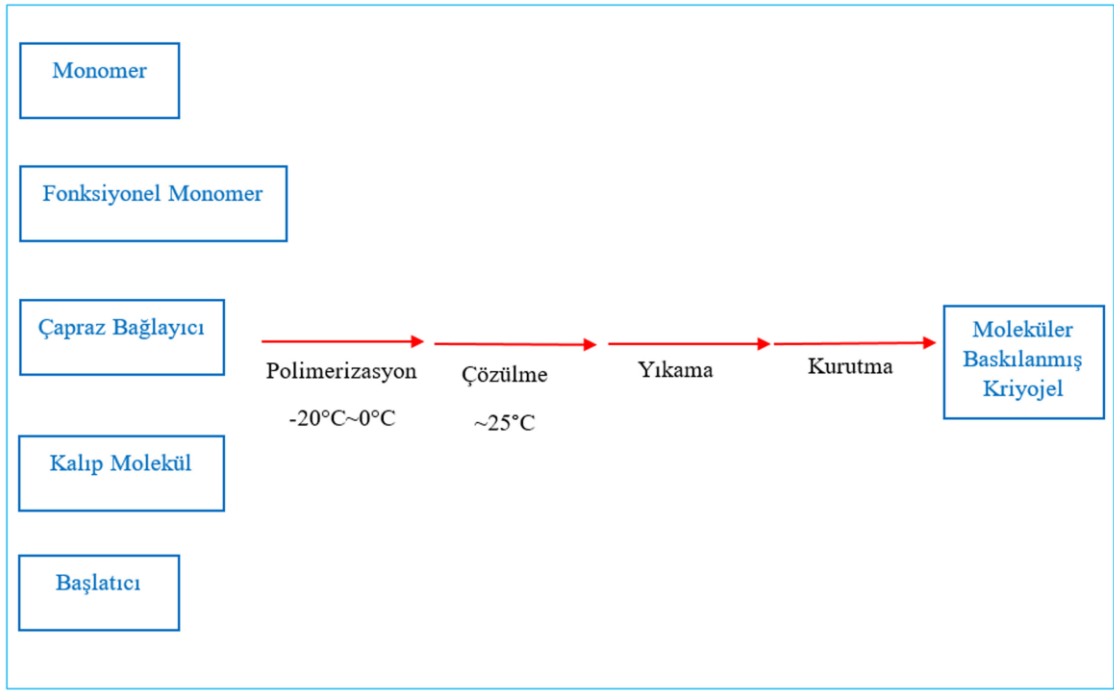
ayrışması yoluyla indüklenebilir. Amonyum persülfat (APS) ve N, N, N, N tetrametiletilediamin (TEMED) radikal başlatıcı sistemi, kriyojel üretimi için en yaygın şekilde kullanılır. Bu serbest radikal kriyopolimerizasyonları her zaman üç aşamalı bir süreçle yapılır: i) başlatma, ii) yayılma ve iii) buz kristallerini çevreleyen donmamış sıvı faz içinde sonlandırma. Radikal başlatma adımı, reaktif yapı bloğu varlıklarının yayılmasını ve çapraz bağlanmasını başlatmak için serbest radikaller üretir [128].

Çapraz bağlanmanın derecesi ve türü, jel çözeltisinin bileşimi, jelleşme sıcaklığı, bu sıcaklıkta tutulma süresi ve donma hızı gibi kriyojellerin fiziksel özelliklerini belirleyen bir dizi değişken vardır [133]. Bu parametrelerdeki değişikliklerin başka önemli yansımaları olsa da gözenek boyutu en çok etkilenen ve belirtildiği gibi biyomedikal uygulamalarda büyük ilgi gören bir özelliktir [129].



Şekil 2.10. Farklı gözenek boyutu dağılımına sahip kriyojellerin şematik gösterimi

Uygun bir gözenek boyutu dağılımına sahip bir kriyojel, yani makro-, mezo- ve mikro-gözeneklerin doğru oranı, uygulanabilir reaksiyon koşulları altında uygun bir kalıp, yapısal monomer, fonksiyonel monomer ve çapraz bağlayıcı oranından hazırlanabilir. Böylelikle kriyojelin geniş bir özgül yüzey alanı ve analitler için yüksek bir kütle transfer hızı oluşur ve iyi adsorptif ve kromatografik davranış gösterir [134].



Şekil 2.11. Moleküler baskılanmış kriyojel hazırlanması

Çapraz bağlayıcılar, ağsı yapılara sahip kriyojeller ve sonuç olarak yüksek sertlik ve mükemmel şişme özellikleri gibi iyi mekanik özellikler oluşturmak için faydalıdır. Çapraz bağlayıcılar üzerindeki fonksiyonel gruplar, kriyojelin hedef maddelere tanınma kapasitesinin artmasına katkıda bulunur [135].

N, N'-metilen-bisakrilamid (MBAAm) en yaygın kullanılan çapraz bağlayıcılardan biridir. MBAAm'nin bir kriyojele dahil edilmesi kriyojelin üç boyutlu yapısının oluşmasına yardımcı olur ve kriyojelin hedef maddeye koordinasyon bağlarının oluşumunu destekler. Örneğin, MBAAm ilk olarak imidojen ve karbonil grubu ile Cu^{2+} gibi köprülü bir metalik iyonla doymamış olarak koordine edilmiş, Cu^{2+} daha sonra imidazolil, tiol ve indolil ile kalıntı bağ bölgeleri aracılığıyla hedef moleküllere (örneğin amino asit) koordinasyon bağları oluşturmuştur. Bu, kriyojelin biyomakromoleküllere afinitesini ve biyoyumluluğunu arttırmış, böylece polipeptit ve proteinin saflaştırılmasını kolaylaştırmıştır [127].

Öncel ve ark., mitomisin C'nin salımı için poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-l-glutamik asit) bazlı kriyojel tasarlamışlar, bu kriyojeller kısmen dondurulmuş koşullar altında serbest radikal yığın polimerizasyonu ile üretilmiştir. Çapraz bağlayıcı oranı ve kalıp miktarının etkilerini incelemek için in vitro ilaç salım çalışmaları yapmış ve membranlar şişme testleri, Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu, yüzey alanı ölçümleri ve in vitro hemo uyumluluk testleri ile karakterize edilmiştir. Mitomisin C'nin kümülatif salımının, çapraz bağlama ajanı oranında bir artış ve kriyojel yapısında daha yüksek kalıp miktarı ile azaldığını gözlemlemişlerdir. Kriyojelin sitotoksikite davranışı fare fibroblast hücre hattı L929 kullanılarak araştırılmış ve sonuçlar kriyojelin L929 hücre canlılığının $97,27 \pm 3,57$ olarak ölçüldüğünü, yani toksik olmadığını göstermiştir [108].

Yapılan başka bir çalışmada, 5-florourasil salımı için baskılanmış kriyojel membranlar hazırlanmıştır. Koordine bağı etkileşimleri, Cu^{2+} iyonunun yardımıyla metal-şelat monomer N-metakriloil-l-histidin ve 5-FU arasında bir koordinasyon kompleksi oluşturmak için kullanılmış ve kompleks, poli(hidroksietil metakrilat-N-metakriloil- (L)-histidin metil ester) kriyojel membranlar üretmek için hidroksietil metakrilat ile kopolimerize edilmiştir. Kriyojel membranlar, şişme testleri, taramalı elektron mikroskobu, diferansiyel taramalı kalorimetri ve X-ışını kırınım çalışmaları yapılarak kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Çapraz bağlayıcı oranı, ortam pH'sı ve ilaç konsantrasyonunun etkilerini araştırmak için in vitro salım çalışmaları yapılmıştır. 5-FU baskılı kriyojel membranların, oldukça makro gözenekli yapılara sahip olduğu; ilaç moleküllerinin, 5-FU baskılı kriyojel matrisinde homojen olarak dağıtılmış olduğu; 5-FU'nun toplam salımının, polimer matrisindeki çapraz bağlayıcı yoğunluğunu artırarak azaldığı gözlenmiştir. Ek olarak 5-FU'nun salım hızı, bir koordinasyon kompleksinde farklı pH değerleriyle değişmiştir; çünkü metal iyonu bir Lewis asidi olarak ve ligand, yani 5-FU, bir Lewis bazı olarak işlev görmüştür. 5-FU'nun kümülatif salımı, polimer matrisinde artan ilaç konsantrasyonu ile artmıştır. 5-FU geçiş mekanizmasının doğası Fickian olmadığı değerlendirilmiştir [119].

Bakhshpour ve ark., mitomisin C'nin tanınması için anti-biyotik ve anti-neoplastik kemoterapi ilacı MMC baskılı kriyojel membranlar hazırlamışlardır. N-metakriloil- (L)-histidin metil ester ile metal iyon koordinasyon etkileşimlerini kullanarak 2-hidroksietil

metakrilat ve metilen bisakrilamid bazlı membranların farklı oranlarını sentezlemiş ve kriyojel membranları çeşitli analizlerle karakterize ettiler ve fare fibroblast hücre hattı L929 kullanarak kriyojel membranların sitotoksitesini araştırmışlardır. Zamana bağlı salım gerçekleştirmişler ve kriyojel membranlar çok yüksek mitomisin C yükleme etkinliği (%70-80) ve saatler boyunca sürekli mitomisin C salımı göstermiştir [114].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kriyojellerin hazırlanmasında kullanılan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), N, N-metilen bisakrilamid (MBAAm), N, N, N', N'-tetra-metiletilediamin (TEMED), amonyum persülfat (APS) ve 1,7-bis[4-hidroksi-3-metoksifenil]-1,6-heptadien-3,5-dion (kurkumin) Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir.

Fonksiyonel monomer olan N-Metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentezlenmesi için, 0.2 g of hidrokinon ve 5.0 g L-histidin metil ester, 100 mL CH₂Cl₂ çözeltisinde çözülmüştür. Bu çözelti 0 °C'ye kadar soğutulmuş ve 12.74 g trietilamin bu çözeltiliye eklenmiştir. 5.0 mL metakriloil klorür yavaşça azot gazı altında bu çözeltiliye eklenmiş ve 2 saat süreyle oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Kimyasal tepkime sürecinin sonunda, reaksiyona girmemiş olan metakriloil klorür, %10'luk NaOH ile uzaklaştırılmıştır. Su fazı döner buharlaştırıcı aracılığıyla buharlaştırılmıştır [136]. MAH ile kompleks oluşturmak için kullanılan bakır (II)-nitrat hemipantahidrat Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Polimerizasyonda kullanılan çözücüler, tamponlar ve diğer kimyasal maddeler, Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Saf su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmos Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun direnci ~18 MΩ/cm'dir.

3.2. PHEMA Kriyojel Disklerin Hazırlanması

Kontrol grubu olarak kurkumin baskılanmamış PHEMA kriyojel diskleri sentezlenmiştir. Sentez için HEMA monomeri, çapraz bağlayıcı olarak MBAAm,

başlatıcı olarak ise APS ve TEMED çifti kullanılmıştır. Hazırlanan monomer karışımı özel olarak ölçülendirilip kesilerek hazırlanmış iki cam plaka arasındaki bölgeye konulmuştur. Cam plakalar kenarlarından kilitlenmiş ve -16 °C’da kriyopolimerizasyon için 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda oluşan kriyojel bir süre oda sıcaklığında donmuş buz kristallerinin erimesi için bekletilmiş; kriyojel diskleri düzgün bir şekilde elde etmek için oda sıcaklığına getirilen örnek üzerine saf su dökülerek cam zeminden rahatça ayrılması sağlanmıştır. Oda sıcaklığına getirilmiş kriyojel uygun bir kesici yardımıyla 1.2 cm±0.1 çapa sahip diskler halinde kesilmiştir. Kesilen kriyojel diskler saf su içerisine alınarak üzerindeki polimerizasyona katılmamış olan kalıntıların uzaklaştırılması amacıyla birkaç defa saf su ile yıkanmıştır.



Şekil 3.1. Sentezlenen PHEMA kriyojel diskler

3.3. Kurkumin Baskılanmış Poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) Kriyojel Disklerin Hazırlanması

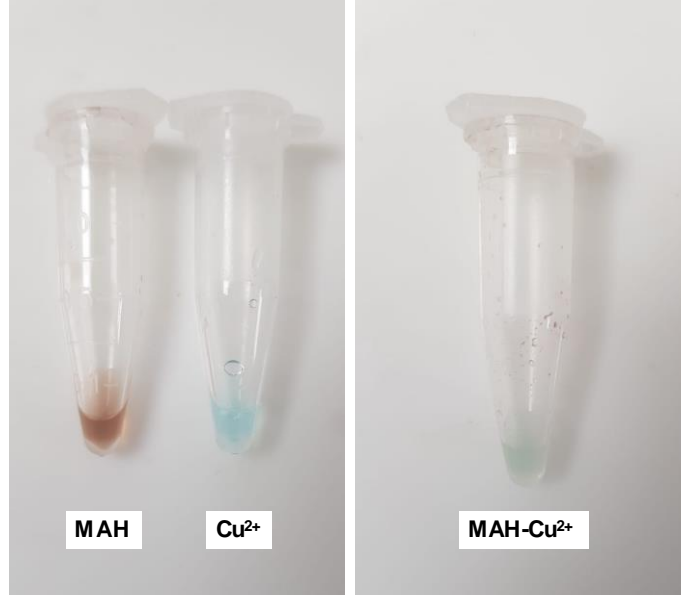
Kurkumin baskılanmış poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) kriyojel disklerin hazırlanması (MIP disk) üç basamakta gerçekleştirilmiştir:

- MAH-Cu²⁺ Kompleksinin Hazırlanması,
- MAH-Cu²⁺ : Kurkumin Önkomplesinin Hazırlanması,
- Kurkumin Baskılanmış Poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) Kriyojel Disklerin Hazırlanması.

PHEMA temelli kurkumin baskılanmış kriyojel disklerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer olan N-metariloil-L-histidin metil ester (MAH) monomeri, metal şelat yöntemi ile Cu²⁺ aracılığıyla baskılanacak kalıp molekül olan kurkumin ile kompleks oluşturulmuştur. Polimerleşme kurkumin baskılanmamış PHEMA temelli kriyojellerde (NIP disk) olduğu gibi aynı kriyopolimerizasyon yöntemiyle yapılmıştır.

3.3.1. MAH-Cu²⁺ Kompleksinin Hazırlanması

İlk basamakta MAH-Cu²⁺ kompleksinin hazırlanması için 2.4 mg bakır(II)-nitrat tartılarak ependorf içerisine alınıp üzerine 100 µl saf su eklenmiştir. Daha sonra 14 µl MAH monomeri bakır çözeltisi üzerine eklenip 30 dakika süreyle rotatörde (Dragon Lab MX-RD-Pro, Çin), 30 rpm'de karıştırılmıştır. Açık kahve renkte olan MAH monomerinin rengi bakır çözeltisinin eklenmesiyle birlikte yeşil renge dönmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. MAH-Cu²⁺ kompleksinin renk dönüşümü

3.3.2. MAH-Cu²⁺ : Kurkumin Kompleksinin Hazırlanması

MAH-Cu²⁺ : kurkumin kompleksinin hazırlanması için öncelikle 1 mg kurkumin 1 mL etanol içerisinde çözülmüş ve 30 dakika süreyle rotatörde (Dragon Lab MX-RD-Pro, Çin), 30 rpm'de karıştırılmıştır. Çözünen kurkumin ve daha önceden hazırlanan MAH-Cu²⁺ kompleksi tüp içerisine alınarak rotatörde 30 dakika süreyle karıştırılmıştır.

3.3.3. Kurkumin Baskılanmış PHEMA Temelli Kriyojel Disklerin Hazırlanması

Kurkumin baskılanmış PHEMA temelli kriyojel diskler aşağıdaki yöntem ile hazırlanmıştır:

İlk olarak çapraz bağlayıcı olarak kullanılan 0,283 g MBAAm tartularak 10.0 mL saf suda çözülmüştür. Diğer bir beherde 1.3 ml HEMA monomeri üzerine 1.7 ml saf su eklenerek manyetik karıştırıcıya konulmuştur. HEMA monomeri ve MBAAm çözeltileri aynı beher içerisine alınmış ve MAH-Cu²⁺ : kurkumin ön kompleksi bu çözeltinin üzerine eklenerek 10 dakika süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu

karışımın üzerine başlatıcı olarak 20 mg APS ve 25 µL TEMED başlatıcı çifti eklenmiştir. Karışım iki cam plaka arasına dikkatli ve olabildiğince hızlı bir şekilde aktarılarak polimerizasyon -16°C’da 24 saat süreyle devam ettirilmiştir. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra iki cam plaka arasında oluşan kriyojel polimeri oda sıcaklığında 1 saat süreyle bekletilmiştir. Cam plaka yüzeyinden kolayca ayrılması için plaka yüzeyine saf su eklemesi yapılmış ve cam plaka yavaşça kaldırılmıştır. Cam plaka yüzeyinden ayrımı sağlanan kriyojel perforatör yardımı ile yuvarlak diskler şeklinde kesilmiştir. Tepkimeye girmemiş monomerlerin ve diğer safsızlıkların elde edilmek istenen polimerik yapıdan uzaklaştırılması için kriyojeller saf su ile birkaç kez yıkanmıştır. Belirtilen yöntem ile farklı monomer oranlarında (%8, %10 ve %12, v/v) üç farklı kriyojel ve farklı HEMA/MBAAm oranlarında (4, 6, 8 ve 10; çapraz bağlayıcı miktarları farklı, mol/mol) dört farklı kriyojel sentezlenmiştir. Sunulan tez kapsamında hazırlanan kriyojellerin polimerizasyon reçeteleri Çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Farklı tipte hazırlanmış kriyojel disklerin polimerizasyon reçeteleri.

Kriyojel Diskler		Kurkumin (mg)	Monomer Oranı (v/v)	$n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$ (mol/mol)
PHEMA		0	%12	6
NIP 1		0	%8	6
NIP 2		0	%12	6
MIP1	MIP1-a	1	%8	6
	MIP1-b	0.7	%8	6
	MIP1-c	0.5	%8	6
	MIP1-d	0.2	%8	6
MIP2		1	%10	6
MIP3	MIP3-a	0.1	%12	6
	MIP3-b	0.5	%12	6
	MIP3-c	0.7	%12	6
	MIP3-d	1	%12	6
MIP4		1	%8	4
MIP5		1	%8	8
MIP6		1	%8	10

3.3.4. Polimerizasyon Veriminin Hesaplanması

Polimerizasyon veriminin hesaplanması için öncelikle polimerlerin hazırlandığı cam düzeneğin ağırlığı tartılır. İkinci adımda kriyopolimerizasyon sonrası oda sıcaklığına getirilen iki cam plaka arasında hazırlanmış olan polimer ve cam plakalar birlikte tartılır. Etüv içerisinde uygun sıcaklıkta tam olarak kurutulan düzenek içerisindeki kuru polimer ile birlikte tekrar ağırlığı tartılarak toplam kuru polimer ağırlığına ulaşılmış olunur. Böylece toplam ıslak polimer ağırlığı ile polimerik yapıya en başta katılan toplam monomer ağırlığı da bilindiğinden polimerizasyon verimi bu değerler üzerinden hesaplanır.

3.4. Kurkumin Baskılanmış PHEMA Temelli Kriyojellerin Karakterizasyonu

3.4.1. FTIR ile Yapı Analizi

Poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) kriyojellerinin yığın yapısı fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer, SpectrumOne Nicolet 520 model, ABD) ile incelenmiştir. Analizden önce kriyojel diskler 1 gün boyunca oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra, 98 mg KBr ile 2 mg polimer örneği karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm² basınçta ince bir pellet haline getirilmiştir. Hazırlanan pelletin FTIR spektrumu 4600-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında alınmıştır.

3.4.2. Yüzey Alanı ve Ölçümü

BET (Brunauer–Emmett–Teller Yüzey Alanı Analizi) cihazı, malzeme özelliklerinden yüzey alanı ve gözeneklilik (mikrogözenekli < 2 nm; mezogözenekli 2-50 nm; makrogözenekli > 50 nm) hakkında nicel olarak bilgi veren bir sistemdir. Kriyojel disklerin yüzey alanlarını belirlemek için Bilkent Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsü'nde (UNAM) yer alan yüzey alanı ölçüm cihazı (Quantachrome, Nova 2200E model, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır.

3.4.3. Şişme Özelliklerinin İncelenmesi

Şişme davranışlarının incelenebilmesi amacıyla PHEMA kriyojel disk, NIP kriyojel disk, farklı monomer oranına sahip MIP kriyojel disklerden ve farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip MIP kriyojel disklerden ikişer adet örnek alınıp etüvde, 50 °C’de, iki gün süre ile kurutulmuştur. Kuru kriyojel disklerin ilk ağırlıkları ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Daha sonra bu kriyojel diskler saf su içeren bir behere konulmuş ve periyodik aralıklarla kriyojel disklerin ağırlıkları kaydedilmiştir. İkişer örnek alınarak yapılan ölçümler farklı zamanlarda üç kez tekrarlanmıştır. Ağırlık değerleri kullanılarak kriyojel disklerin şişme yüzdeleri hesaplanmıştır.

3.4.4. Yüzey Morfolojisi

Kurkumin baskılanmış PHEMA temelli kriyojel diskler süngerimsi ve elastik, opak bir yapıya sahiptir. Kriyojelin makrogözeneklerinde bulunan su, kriyojel iki parmak arasında sıkıştırıldığında kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Sıkıştırılmış kriyojel tekrar suya konulduğunda şişmekte ve orjinal boyutunu ve yapısını birkaç saniye içerisinde tekrar kazanmaktadır.

PHEMA, NIP ve MIP kriyojel disklerin yüzey ve yığın özelliklerinin belirlenmesinde Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (HÜNİTEK) yer alan taramalı elektron mikroskopu (SEM) (Tescan, GAIA 3 Model, Çek Cumhuriyeti) kullanılmıştır. Polimerik kriyojel disklerin SEM görüntülerinin alınabilmesi için numuneler öncelikle etüvde 50 °C’da, iki gün süre ile kurutulmuş ve sonrasında numunelere iletkenlik kazandırmak amacıyla HÜNİTEK sistem destek biriminde yer alan Au/Pd/C kaplama cihazıyla (Leica, ACE 600 model, Almanya) 10 nm karbon (C) kaplanmıştır.

3.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Numune ısıtılırken, soğutulurken veya sabit bir sıcaklıkta tutulurken soğurulan veya salıverilen enerji miktarını ölçer. Bu teknikte, referans ile numuneden gelen veya uzaklaşan ısı farkı sıcaklığa veya zamana bağlı olarak gösterilir. Güç telafisi prensibiyle çalışan DSC'lerde, numune sıcaklığı ile referans sıcaklığı aynı tutulur. Eğer numune ile referans arasında bir sıcaklık farkı saptanırsa, sıcaklığı aynı tutmak için numuneye verilen enerji (güç) miktarı değiştirilir. Bu yolla numunedeki faz değişimi sırasındaki ısı aktarımı miktarı saptanabilir.

Örneklerin differansiyel taramalı kalorimetri eğrileri inert azot atmosferinde 50 mL/dk gaz akış hızında, Al₂O₃ (alümina) referansına karşılık Shimadzu DSC 60H cihazı (Japonya) ile 25-500°C aralığında kaydedilmiştir.

3.4.6. X-Işınları Difraktometresi (XRD)

X-ışını kırınımı analizi, kriyojel disklerin kristalin yapılarının tayin edilebilmesi amacıyla toz x-ışınları difraktometre cihazı (PANanalytical, Empryrean model, Birleşik Krallık) ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla toz halindeki örneklerin her biri tarama derecesi $0^{\circ} \leq 2\theta \leq 90^{\circ}$ ve tarama hızı 1°/dk temel alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.7. Bilgisayarlı Mikrotomografi (Micro-CT)

Bilgisayarlı mikrotomografi, katı numunelerin farklı yoğunluktaki bileşenlerinin yüksek çözünürlükte, tahribatsız bir şekilde üç boyutlu olarak incelenmesine olanak veren bir görüntüleme tekniğidir. Elde edilen veri setlerinden numuneyi oluşturan bileşenler üzerinde 3 boyutta nicel hacimsel ve morfolojik analizler gerçekleştirilebilir. Kriyojel disklerin analizlerini gerçekleştirebilmek için Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yer alan mikro-CT cihazı (Bruker, Skyscan 1272 model, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır.

3.5. Kriyojel Disklerin In Vitro Sistotoksisite Testleri

Kriyojel disklerin sitotoksik etkileri, ISO-10993-5 ‘Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi’ standartlarına göre fibroblast hücre hattı (L929) kullanılarak 3-(4,5-dimetil/tyiazol-2-il)-2,5-difeniltetra zolium bromür tiyazolil mavisi (MTT) testi ile incelenmiştir. Hücreler, 3 gün boyunca %95 hava ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir atmosferde, 37 °C’de, %10 fetal sığır serumu ve %10 L-glutamin ile desteklenmiş DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içeren bir ortamda kültürlenmiştir. Kriyojeller, ultraviyole ışık altında 1 saat sterilize edilmiş ve hücre kültürü ortamında 37 °C’da 72 saat inkübe edilmiştir. Oyuuk başına 1×10³ yoğunlukta L929 hücreleri, 96 oyuklu bir hücre plakasında 200 µL hacimde hücre kültürü ortamında kültürlenmiş ve gece boyunca nemlendirilmiş %5 CO₂’de inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre kültürü ortamı, özüt ortamı ile değiştirilmiş ve 37°C’da 24 saat tekrar inkübe edilmiştir. Kültürlenen hücreler 100 µL/oyuk MTT çözeltisi ile 4 saat boyunca muamele edilmiştir. Ardından plakalar karanlıkta 30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak, 540 nm’de otomatik enzim bağlantılı immünosorbent tahlil (ELISA) okuyucusu tarafından değerler okunmuştur.

3.6. Kriyojel Disklerin Hücre Canlılığı Testleri

Kurkumin baskılı kriyojellerin hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırmak için MDA MB 231 meme kanser hücre hattı kullanılarak 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi yapılmıştır. İlk olarak bu hücreler, %10 fetal sığır serumu (FBS) (Biochrom AG, Almanya) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Biochrom AG, Almanya)/F12 (DMEM/12) içinde 37 °C’de kültürlenmiştir. %5 CO₂ içeren bir atmosferde kültürlenmiş hücreler, 24 saat inkübe edilen MTT testi için iki farklı 96 oyuklu plakaya ekilmiştir. Bu sürenin sonunda kültür ortamı değiştirilmiş ve hücreler PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat Tuz Tamponu) ile yıkanmıştır. Her bir malzeme (Kurkumin baskılanmış (MIP), baskılanmamış (NIP) ve pozitif kontrol (pc), derişim 1 mg/mL olacak şekilde oyuklara eklenmiştir. Negatif kontrol (nc) olarak hücre kültürü ortamı kriyojel olmadan uygulanmıştır. Bu 3 grup, önceden ısıtılmış bir kontrol kültür ortamı ile 24 ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Her inkübasyon süresinin

sonunda, hücrelere, %10 kültür ortamı miktarında MTT ilave edilmiştir. 0.1 N HCl içeren izopropanol kültür ortamına eklenmiştir. Absorbans, bir spektrofotometre mikropilaya okuyucusu (IQuant™, Biotek Instruments Inc, ABD) üzerinde 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her grup için deneyler, altı tekrarlı üç set halinde gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerin yüzdesi, kontrol grubundan elde edilen absorbans değerlerinin her zaman periyodu için 100 olduğu varsayılarak hesaplanmıştır.

Hücrelerin canlılığı ve/veya öldüğünü göstermek için akridin turuncusu/propidyum iyodür (PI) çift boyama testi yapılmıştır. Kültürlenmiş ve oyuklara aktarılan hücreler, boyamadan önce ortamdaki saflaştırılmış ve PBS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Eşit hacimde akridin turuncusu ve propidyum iyodür içeren boya karışımı 300 mL hücrelerde yaklaşık 20 saniye aktive edilmiş ve sonra PBS tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. Boyanmış hücreleri görüntülemek için floresan mikroskopu (Olympus, IX70 model, Japonya) kullanılmıştır.

3.7. Antibakteriyel Özelliğın İncelenmesi

Kurkuminin literatürde yer alan antibakteriyel özelliklerinin incelenmesi amacıyla Kirby-Bauer yöntemi olarak da bilinen disk difüzyon tekniğı kullanılmıştır. Bu yöntemde *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakteri kolonileri seçilmiştir. Öncelikle uygun katı besiyeri (Mueller Hinton Agar-MHA) hazırlanarak petrilere dökülmüştür. Mikroorganizmalar, 6-8 saatlik buyyon kültüründen (hafif bulanık) MHA plaklarına 0.1-0.2 mL miktarında ekilmiş ve plağı yayılmıştır. Bu aşamada sıvı kültüre eküvyon çubuk daldırılıp iyice eminceye kadar bekletilmiş ve eküvyon çubuktaki kültür petri yüzeyine 120 derecelik açıyla sürülerek mikroorganizma ekimi gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizmaların tüm petriye yayılması için işlem en az 6 kez tekrar edilmiştir. Agar yüzeyi oda sıcaklığında 10 dakika kurutulduktan sonra agarın yüzeyine PHEMA, moleküler baskılanmamış ve 0.5 mg/mL kurkumin baskılanmış PHEMA diskler yerleştirilerek 18-24 saat inkübe edilmiştir. 18-24 saatlik sıvı mikroorganizma kültürünün bulanıklığı 0.5 McFarland olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu sürenin sonunda polimerik diskler etrafında oluşan zonlar kontrol edilmiştir.

3.8. In vitro Kurkumin Salım Çalışmaları

MIP kriyojel disklerden kurkumin salımı, pH 6.0, 7.0, 7.4 ve 8.0 olmak üzere farklı pH'lara sahip 5 mL tampon ortamlarında gerçekleştirilmiştir. İlaç salım kinetiğinin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalar, 37 °C sabit sıcaklıkta ve 45 rpm karıştırma hızına sahip manyetik karıştırıcı üzerinde yürütülmüştür. Deneysel çalışma PBS (pH=7.4) ortamı baz alınarak oda sıcaklığında tekrar edilmiştir. Ortama yüklenen ilaç miktarının kriyojel disklerden salınan ilaç miktarına etkisini incelemek amacıyla farklı monomer oranlarında hazırlanan MIP kriyojel disklere 0.1 ila 1 mg/mL olmak üzere farklı derişimlerde kurkumin yüklenmiş ve kriyojel disklerden ortalama 15 günlük kurkumin salım miktarları incelenmiştir. Ayrıca farklı çapraz bağlayıcı oranlarıyla hazırlanan kriyojel disklerden kurkumin salımını incelemek amacıyla dört farklı oranda MBAAm ($n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}} = 4, 6, 8, 10$) içeren kriyojel disklerden hazırlanmış ve 1mg/mL derişimde kurkumin yüklenerek MIP kriyojel disklerden ortama kurkumin salım miktarları incelenmiştir. Kurkumin salım miktarı UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu, Model 1601, Tokyo, Japan) kullanılarak 420 nm dalga boyunda ölçümler alınarak belirlenmiş ve toplam salım değerleri hesaplanmıştır.

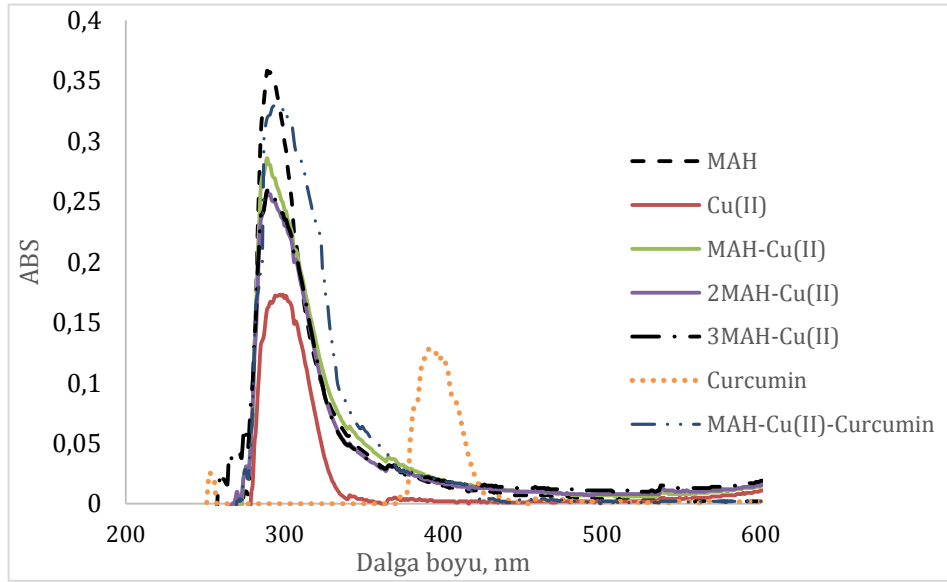
3.10. Kurkuminin Floresan Özelliğinin Gösterilmesi

Kurkuminin birçok çalışmada floresan bir bileşik olduğu gösterilmiştir [75, 137, 138]. Bu çalışmada kurkuminin floresan özelliğinin incelenmesi amacıyla floresan ataçmanlı bir araştırma mikroskobu (Olympus, IX70 model, Japonya) ile FITC filtresinde farklı derişimlerde kurkumin yüklenmiş MIP kriyojel diskler incelenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. MAH-Cu²⁺: Kurkumin Kompleksinin Karakterizasyonu

MAH-Cu²⁺ kompleksinde komonomer olan MAH, Cu²⁺ iyonları üzerinden metal şelatlayıcı ligand olarak seçilmiştir. Geçiş metal iyonları ile imidazol grubu sayesinde şelat yapma özelliğine sahip olduğundan ilk önce MAH, kurkumin ve Cu²⁺'ın ayrı ayrı spektrumları alınmıştır. Ardından 1:1, 2:1 ve 3:1 (mol/mol) oranlarında hazırlanan MAH-Cu²⁺ ön kompleksin spektrumu taranmıştır. Ön kompleks oluşumu karakterizasyonunda MAH molekülündeki histidinin, Cu²⁺ iyonlarını imidazol azotu, amino azotu ve karboksil oksijen atomu üzerinden üç dişli olarak bağlayabildiği öngörülmektedir. Dört koordinasyon yapan Cu²⁺'ın dördüncü bağı ise ortamdaki su moleküllerinde bulunan oksijen atomları ile tamamlanmaktadır. Bu aşamada toplam 2.4 mg bakır tuzu kullanılmıştır.



Şekil 4.1. UV-Spektrometre ile MAH-Cu²⁺: kurkumin kompleksinin analizi

MAH-Cu²⁺ ön kompleksi, farklı kurkumin yükleme oranlarına sahip ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için farklı miktarlarda kurkumin ile etkileştirilmiştir. Kompleks

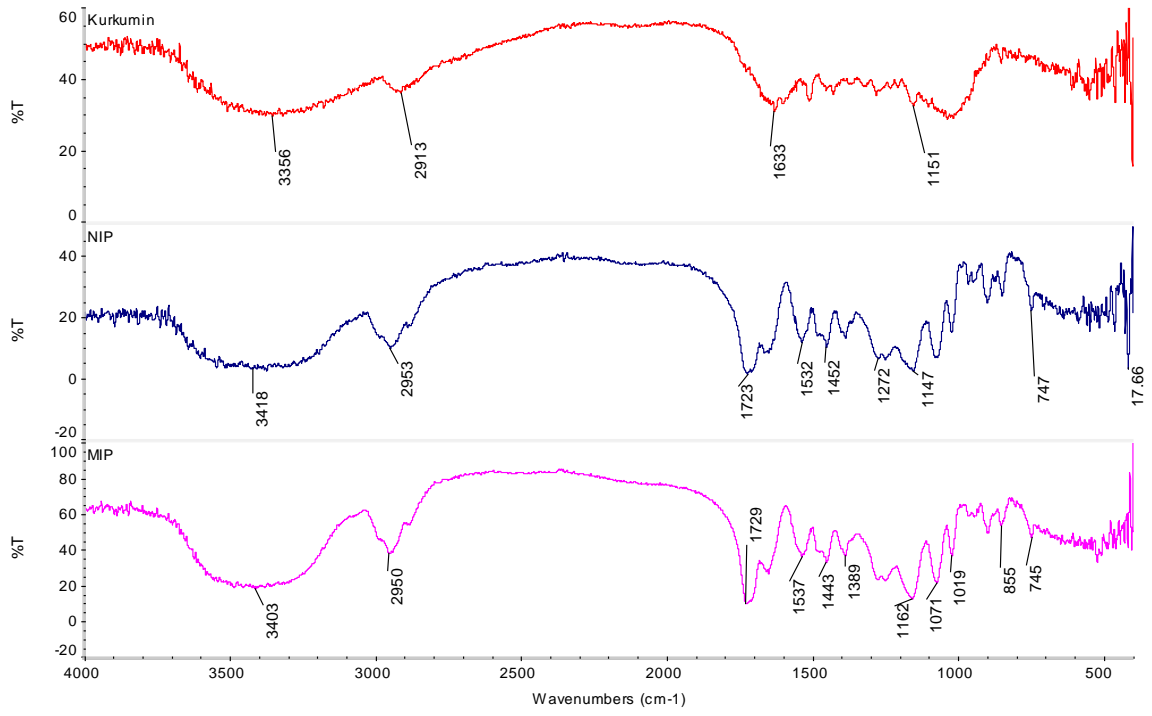
oluşumu UV spektrofotometre ile absorpsiyon bantlarındaki kayma/azalma gözönüne alınarak gösterilmiştir. Kurkumin ve ön kompleks spektrumları arasındaki fark, kurkumin ve MAH-Cu²⁺ arasındaki etkileşimler şekil 4.1’de gösterilmiştir. Sonuçlardan, en şiddetli ve kararlı kompleksin 1:1 mol oranında hazırlanan MAH-Cu²⁺ üzerinden elde edildiği değerlendirildiğinden deneysel çalışmalarda bu mol oranında kompleks tercih edilmiştir. Kurkuminin yapıya dahil olması sonucunda MAH-Cu²⁺: kurkumin pikinin, MAH-Cu²⁺ pikine göre şiddeti artmıştır.

4.2. Kurkumin Baskılanmış PHEMA Temelli Kriyojel Disklerin Karakterizasyonu

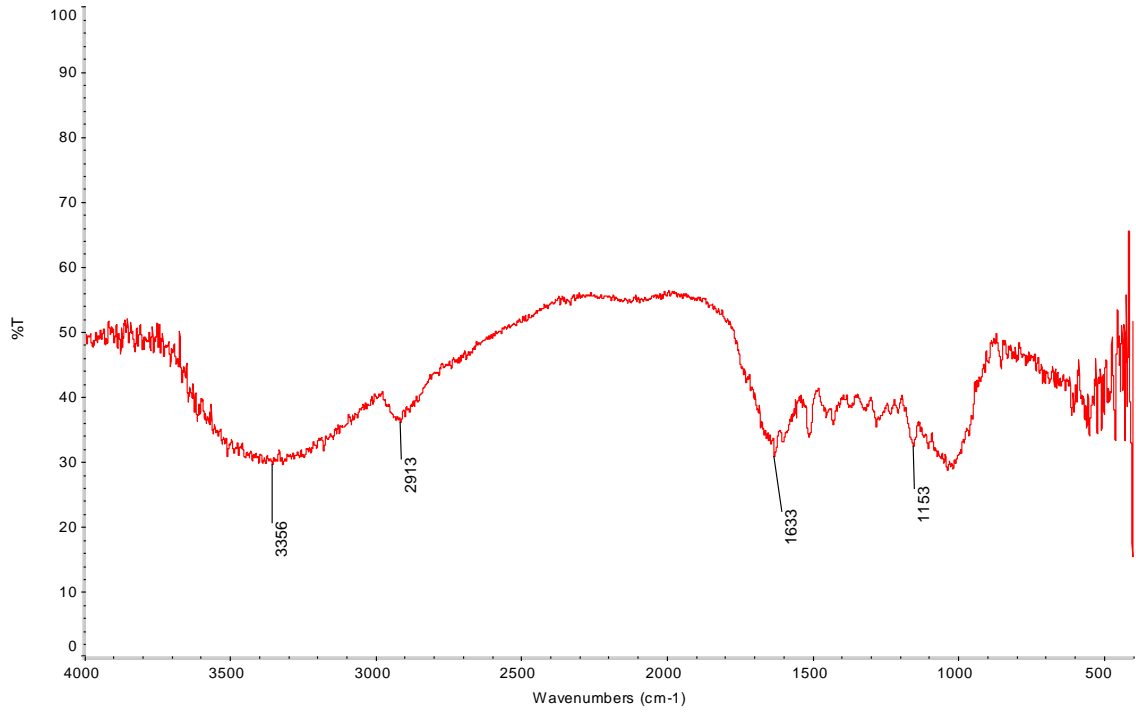
Kurkumin baskılanmış PHEMA temelli kriyojel diskler, HEMA monomeri ve MAH-Cu²⁺: kurkumin kompleksi kullanılarak soğukta-polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Hazırlanan MIP kriyojel diskler, FTIR, SEM, BET, DSC, XRD, Micro-CT ve şişme deneylerinin gerçekleştirilmesi yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

4.2.1. FTIR ile Yapı Analizi

FTIR ile yapı analizlerinin belirlenebilmesi için yalnızca kurkumin, moleküler baskılanmamış poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) kriyojel disk ve kurkumin baskılanmış poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) kriyojel disk olmak üzere üç farklı örnek hazırlanmıştır. Örnekler önce havanda dövülerek KBr ile pellet haline getirilmiş ve daha sonra FTIR’da analiz edilmiştir.

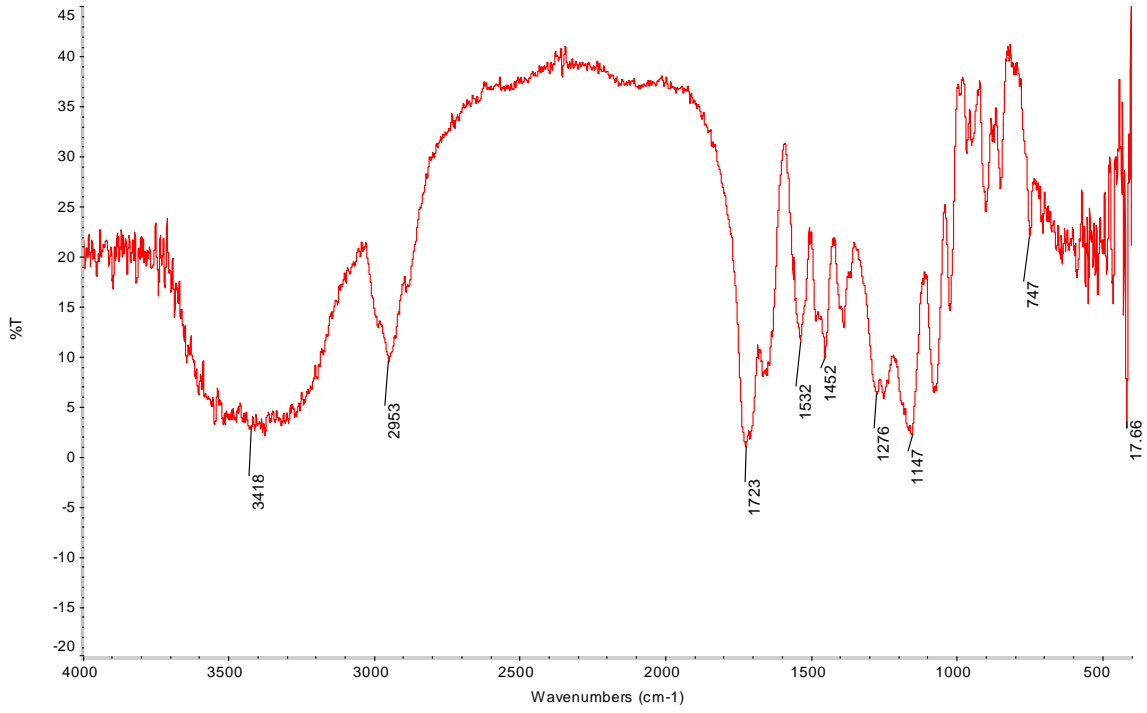


Şekil 4.2. Örtüştürülmüş FTIR spektrumu

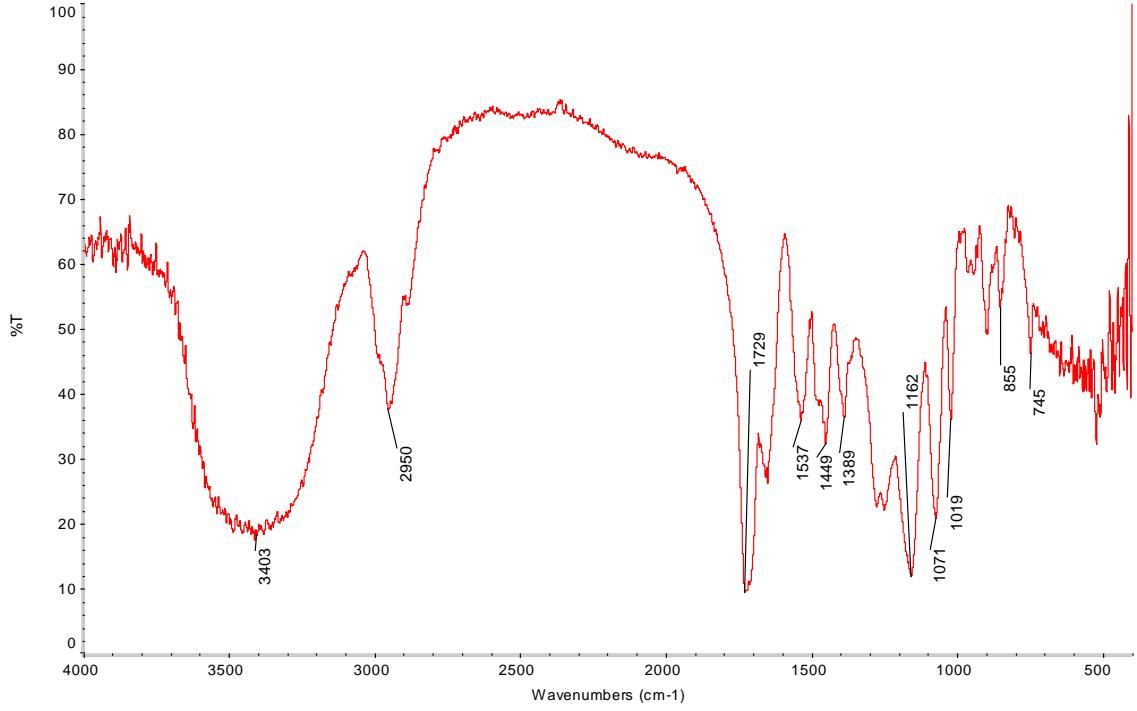


Şekil 4.3. Kurkuminin FTIR spektrumu

3300-3400 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler fenol gruplarının O-H gerilimlerini, 1600-1650 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler aromatik C=C gerilimlerini ve 1153 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler C-O-C gerilimlerini belirten kurkumine ait piklerdir.



Şekil 4.4. NIP kriyojel disklerin FTIR spektrumu



Şekil 4.5. MIP kriyojel disklerin FTIR spektrumu

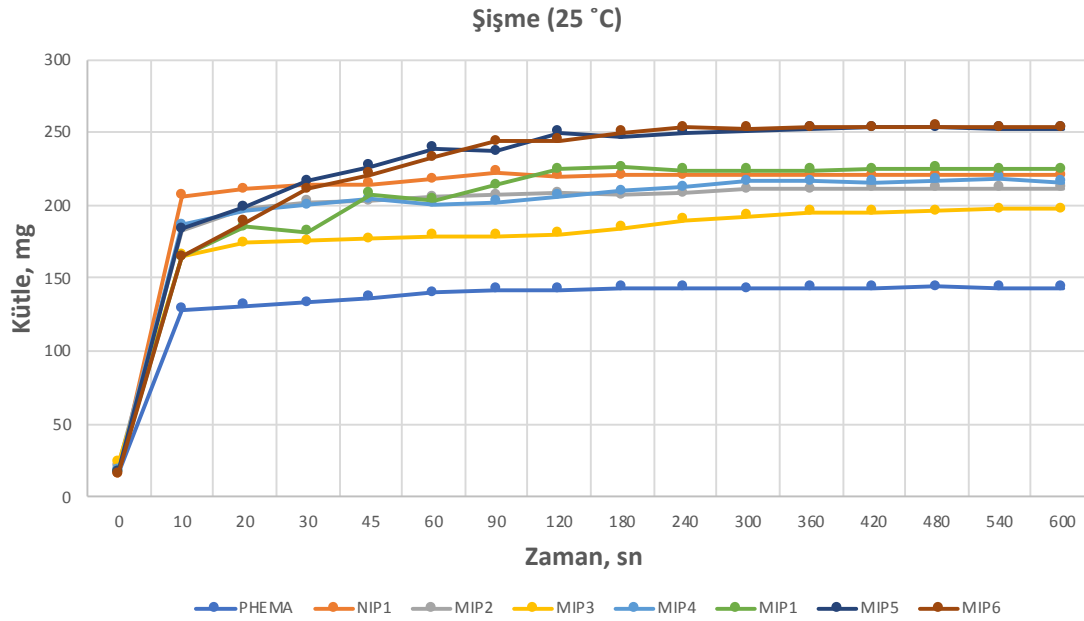
Kurkumin baskılanmış poli(HEMA-MAH-Cu²⁺)'ya ait FTIR spektrumunda; N-H gerilme pikleri 3400-3500 cm⁻¹, OH gerilme 3300-3400 cm⁻¹, alifatik C-H gerilme 2900-2950 cm⁻¹, ester C=O gerilme 1720-1730 cm⁻¹, C=C gerilmesi 1600-1650 cm⁻¹, C-O gerilme 1240-1250 cm⁻¹, aromatik C-H gerilme 740-750 cm⁻¹ bantlarında görülmektedir (Şekil 4.5).

4.2.2. Şişme Deneyi

Kriyojellerin şişme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı özelliklerde hazırlanmış olan disklerin şişme deneyleri 4 °C, 25 °C, 37 °C ve 42 °C olmak üzere dört farklı sıcaklıkta tekrarlanmış ve veriler çizelge ve grafikler halinde kaydedilmiştir. Bu doğrultuda farklı özelliklerde hazırlanmış kriyojel disklerin oda sıcaklığında elde edilmiş şişme değerleri çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı özelliklerde hazırlanan kriyojel disklerin 25 °C'de gerçekleştirilen şişme deneylerinde zamana bağlı kütle değişimleri

Kütle								
Zaman (sn)	PHEMA	NIP1	MIP2	MIP3	MIP4	MIP1	MIP5	MIP6
0	16,8	15,2	21,4	23,5	18,1	17,2	17	16,1
10	128,5	206,1	182,9	165,1	186,7	164,6	183,5	164,7
20	131,4	210,8	198	174,3	197	184,9	198,8	188,7
30	133	214	202	175,5	199,8	182	216,2	211
45	136,3	214,5	202,6	177	204,4	207,8	227	221
60	140	217,6	205,4	178,9	201	203,2	238,7	233,2
90	142	222,7	207,1	179	202,4	213,8	236,7	244
120	142,1	220	208,5	180,2	206	225	250	244,5
180	143,6	220,4	207,2	184,2	210	226,4	247,2	250,2
240	143,7	220,3	208,2	190,1	212,4	224,2	250	253,4
300	143	220,8	211,1	192,7	216,4	224,3	251	253
360	143,6	221	211,2	195,5	216,4	224	253	253,2
420	143,2	220,4	211,5	195,1	216	224,7	253,6	253,6
480	143,9	220,8	212	196	217	225,3	253,2	254
540	143,5	221	211,7	197,4	218,6	225	253	253,1
600	143,3	220,5	211,6	197,1	216	224,8	252,9	253,5



Şekil 4.6. Farklı özelliklerde hazırlanan kriyojel disklerin kurutma sonrası 25 °C'de suya daldırıldığında zamana bağlı kütle değişimleri

Şekil 4.6'dan görüldüğü üzere kriyojel diskler en yüksek şişme kapasitesine 10-20 sn aralığında ulaşmakta ve bir süre sonra kütle sabit kalmaktadır. Yine aynı grafikteki

verilerden yararlanılarak kriyojellerin makrogözeneklilik ve şişme oranları hesaplanmıştır.

Makrogözeneklilik oranı için;

$$(m_{\text{şişmiş}} - m_{\text{sıkıştırılmış}}) / m_{\text{şişmiş}} \times 100$$

formülünden ve,

Şişme oranı için;

$$\text{Şişme}(\%) = (m_{\text{şişmiş}} - m_{\text{kuru}}) / m_{\text{kuru}} \times 100$$

formülünden faydalanılmış ve bu değerler aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Kriyojel disklerin 25°C’de şişme ve makrogözeneklilik oranları

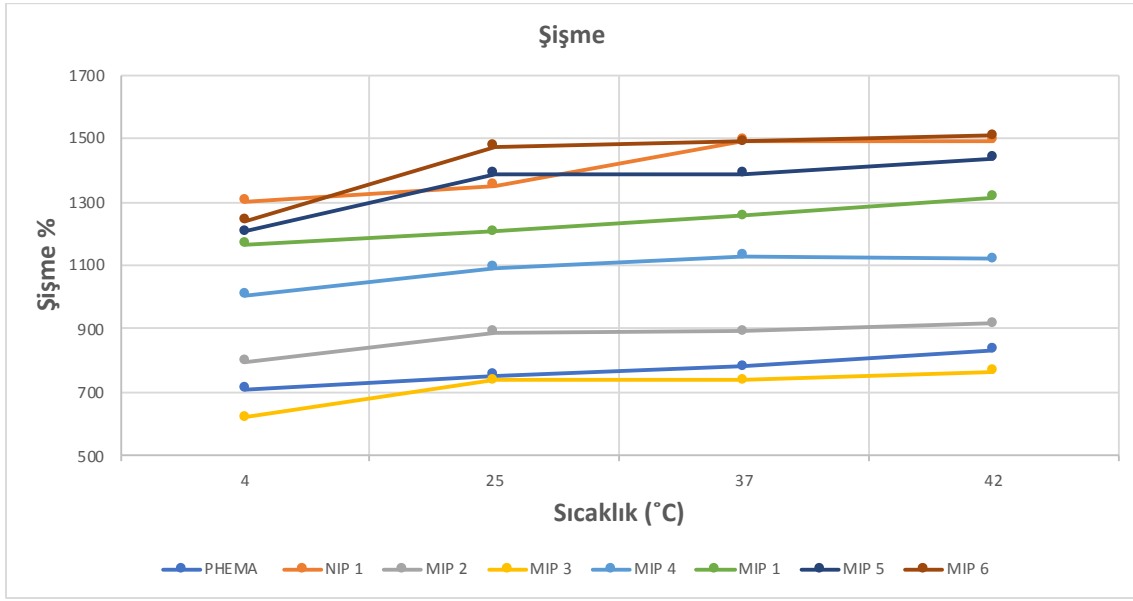
	PHEMA	NIP1	MIP2	MIP3	MIP4	MIP1	MIP5	MIP6
Şişme %	752	1350	888	738	1093	1206	1387	1474
Makrogözeneklilik %	30,08	42,49	33,55	29,53	36,81	39,68	42,9	46,27

Çizelge 4.3’ten elde edilen sonuçlara göre MIP1, MIP2 ve MIP3 arasında yapılan karşılaştırmada monomer oranı arttıkça şişme oranında azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$ oranının şişme oranı üzerine etkisi değerlendirildiğinde, MIP1, MIP4, MIP5 ve MIP6 arasında yapılan karşılaştırmada bu oran arttıkça yapıya katılan çapraz bağlayıcı miktarı düştüğünden şişme oranında artış gözlenmiştir.

25°C için örneği verilen zamana bağlı kütle değişim tablo ve grafikleri dört farklı sıcaklık için de hazırlanmış, bu veriler üzerinden farklı tipteki kriyojel disklerin dört farklı sıcaklıktaki şişme yüzdeleri elde edilerek karşılaştırma sağlanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Kriyojel disklerin farklı sıcaklarda şişme yüzdeleri.

Sıcaklık (°C)	Şişme (%)							
	PHEMA	NIP1	MIP2	MIP3	MIP4	MIP1	MIP5	MIP6
4	709	1301	797	622	1005	1167	1207	1239
25	752	1350	888	738	1093	1206	1387	1474
37	781	1493	891	738	1128	1256	1387	1491
42	834	1493	917	765	1121	1314	1436	1507



Şekil 4.7. Farklı özelliklerde hazırlanan kriyojel disklerin farklı sıcaklıklarda şişme oranları

Şekil 4.7’den görüldüğü üzere düşük sıcaklıklarda şişme yüzdesi diğer sıcaklıklara göre çok daha düşüktür. 37 °C ve 42 °C sıcaklıklardaki şişme yüzdesi birbirine çok yakın değerlerdedir.

4.2.3. Yüzey Alanı Ölçümü

Kriyojel disklerin yüzey alanı ölçümleri BET yöntemi kullanılarak nitrojen gaz adsorpsiyon metodu ile 77 kelvinde sıvı nitrojende gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1’de şişme ve makrogözeneklilik oranları ile birlikte verilmiş olan yüzey alanı ölçümleri incelendiğinde:

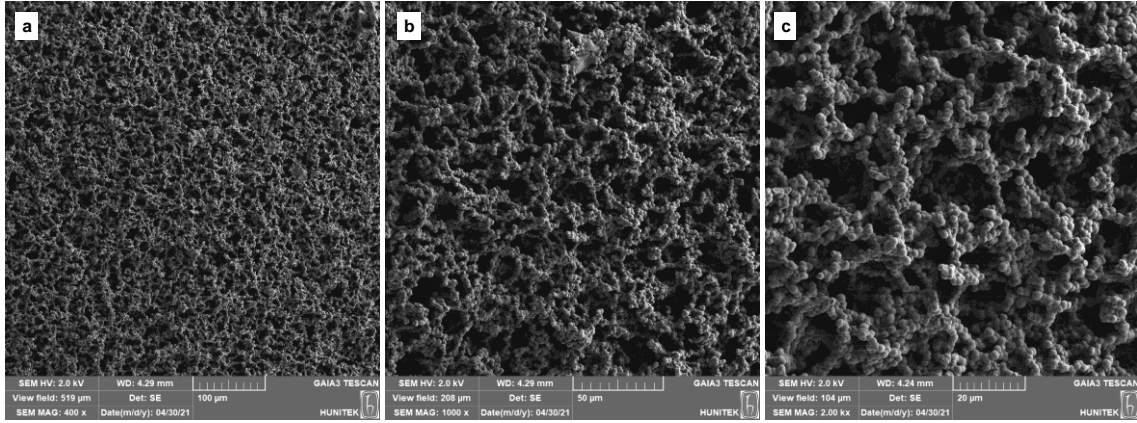
- Yapıdaki monomer oranı arttıkça kriyojel disklerin yüzey alanlarının arttığı gözlenmektedir. Yani MIP1, MIP2 ve MIP3 arasında yüzey alanları arasında bir karşılaştırma yapıldığında; sırasıyla %8, %10 ve %12 monomer oranına sahip kriyojel disklerin monomer oranı arttıkça yüzey alanı artmış; gözenek çapı ve salım miktarı azalmıştır. Şişme deneylerinden elde edilen verilerden de kriyojel disklerin monomer oranı arttıkça şişme oranının ve makrogözenekliliğin azaldığı görülmüştür.
- Kriyojel disklerin içerdiği çapraz bağlayıcı miktarı azaldıkça yüzey alanlarının arttığı gözlenmiştir. Bununla birlikte salım miktarı artmış, gözenek çapı azalmıştır. Şişme deneylerinden elde edilen verilerle de yapıdaki çapraz bağlayıcı miktarı azaldıkça şişme oranının ve makrogözenekliliğin arttığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.1. Kriyojel disklerin yüzey alanı ölçümleri.

Kriyojel	Yüzey Alanı (m²/g)	Şişme %	Makrogözeneklilik %
PHEMA	14.27	752	30.08
NIP1	9.33	1350	42.49
MIP2	18.75	888	33.55
MIP3	25.41	738	29.53
MIP4	15.33	1093	36.81
MIP1	15.69	1206	39.68
MIP5	19.87	1387	42.90
MIP6	23.12	1436	46.27

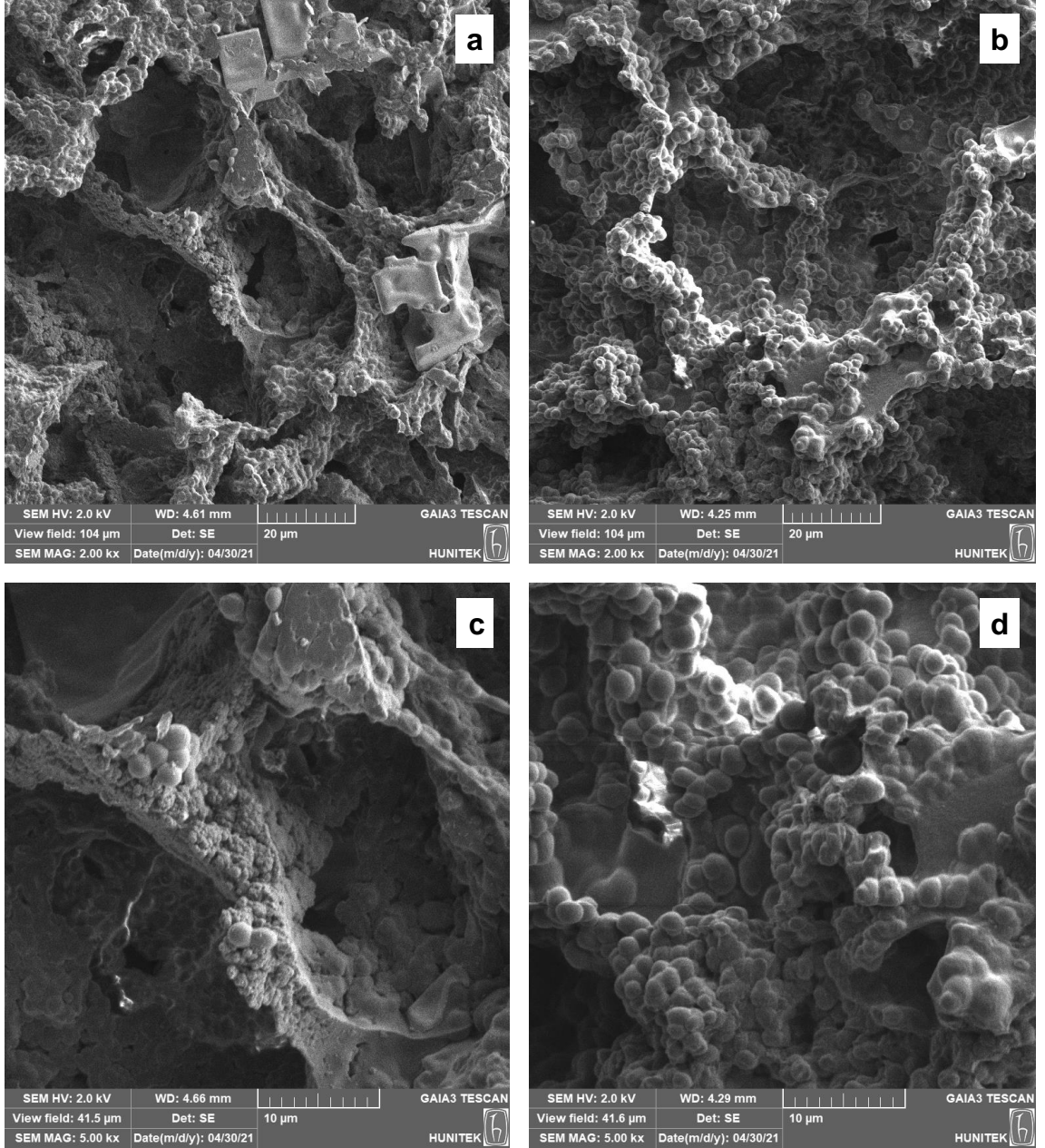
4.2.4. Yüzey Morfolojisi

Moleküler baskılanmamış ve kurkumin yüklemesi yapılmamış PHEMA kriyojel disklerin gözenekli yapısı Şekil 4.8’de farklı büyütmelerde alınan SEM görüntülerinde görülmektedir.



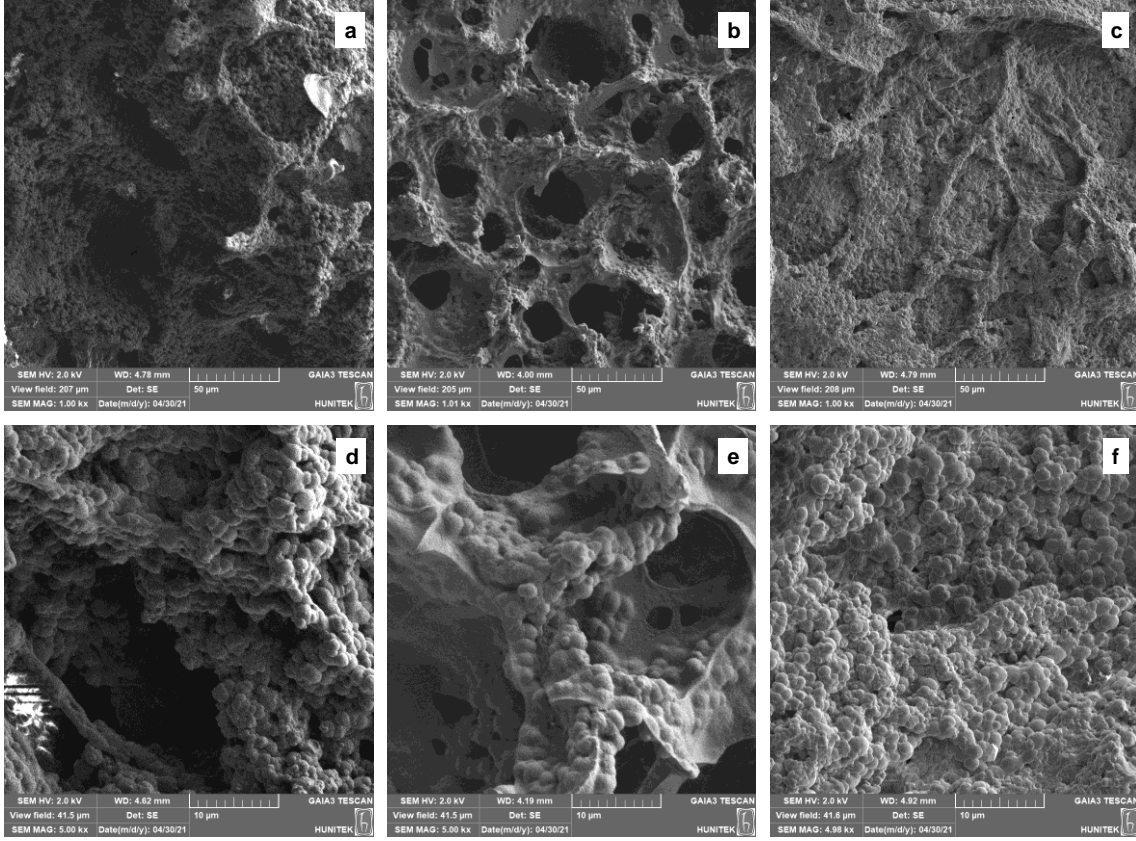
Şekil 4.8. PHEMA kriyojel disklerin farklı büyütmelerde SEM görüntüleri; a) 400 büyütme b) 1000 büyütme c) 2000 büyütme

Şekil 4.9’da yer alan, hacimce farklı monomer oranları ile hazırlanmış NIP kriyojel disklerin SEM görüntülerinden açıkça görüleceği üzere monomer oranı arttıkça yapıdaki gözenek boyutunda azalma gerçekleşmiştir. Daha düşük monomer oranı ile hazırlanan NIP kriyojel disklerde gözenek çapı daha büyüktür.



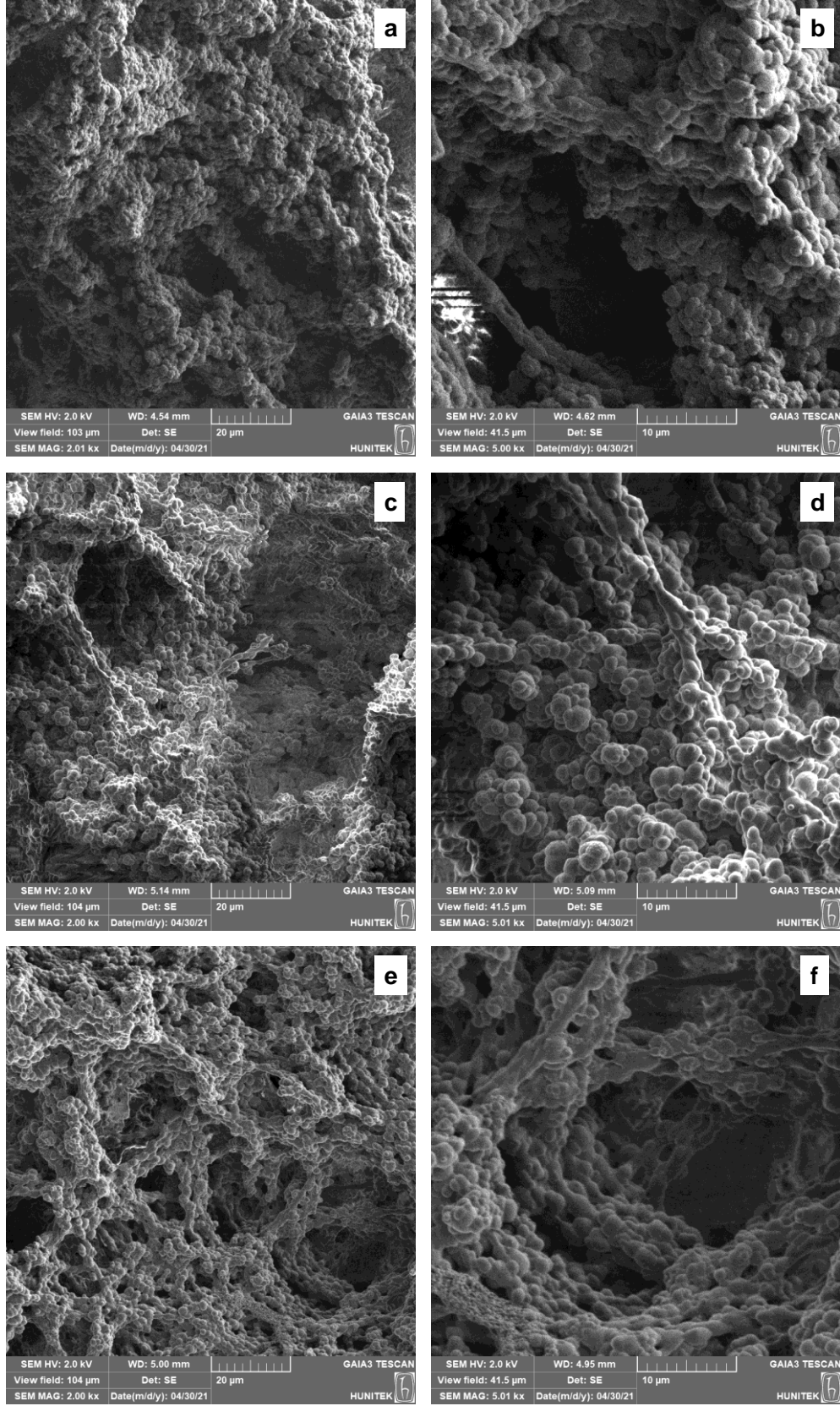
Şekil 4.9. NIP Kriyojel disklerin SEM görüntüleri; a) NIP1 kriyojel disk, 2000 büyütme, b) NIP2 kriyojel disk, 2000 büyütme, c) NIP1 kriyojel disk, 5000 büyütme, d) NIP2 kriyojel disk, 5000 büyütme

Kurkumin baskılanmış kriyojel disklerin SEM görüntülerinde de yapıdaki çapraz bağlayıcı oranı sabit tutularak ($n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=6$ olarak) yapıya katılan monomer oranı artırıldıkça gözenek çapındaki azalma gözlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=6$ oranına sahip MIP kriyojel disklerin SEM görüntüleri; a) MIP1, 1000 büyütme, b) MIP2, 1000 büyütme c) MIP3, 1000 büyütme, d) MIP1, 5000 büyütme, e) MIP2, 5000 büyütme, f) MIP3, 5000 büyütme

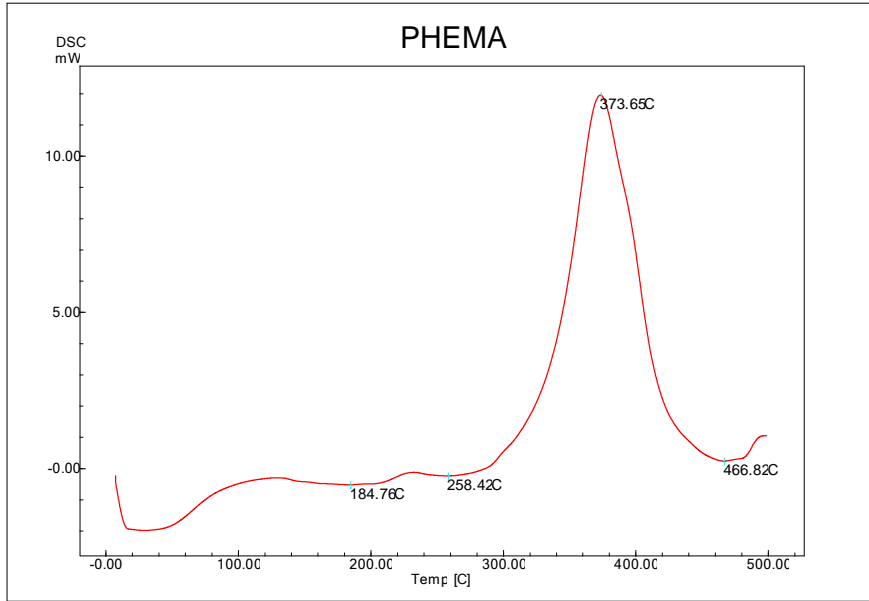
%8 sabit monomer oranı ile hazırlanmış; farklı çapraz bağlayıcı miktarları içeren MIP kriyojel disklerin SEM görüntülerine bakıldığında yapıdaki çapraz bağlayıcı oranının artması ile birlikte daha katı bir polimerik yapıya ulaşıldığı, daha kalın polimer duvarı ve daha küçük çapta gözenekler ile sonuçlandığı görülmektedir (Şekil 4.11).



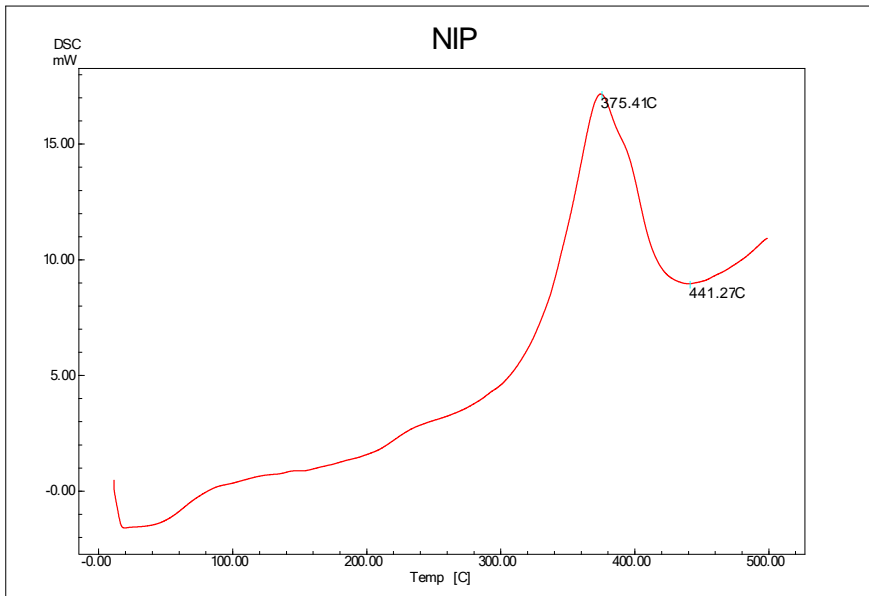
Şekil 4.11. %8 monomer oranına sahip MIP kriyojel disklerin SEM görüntüleri; a) MIP1, 2000 büyütme, b) MIP1, 5000 büyütme, c) MIP5, 2000 büyütme, d) MIP5, 5000 büyütme e) MIP6, 2000 büyütme, f) MIP6, 5000 büyütme

4.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

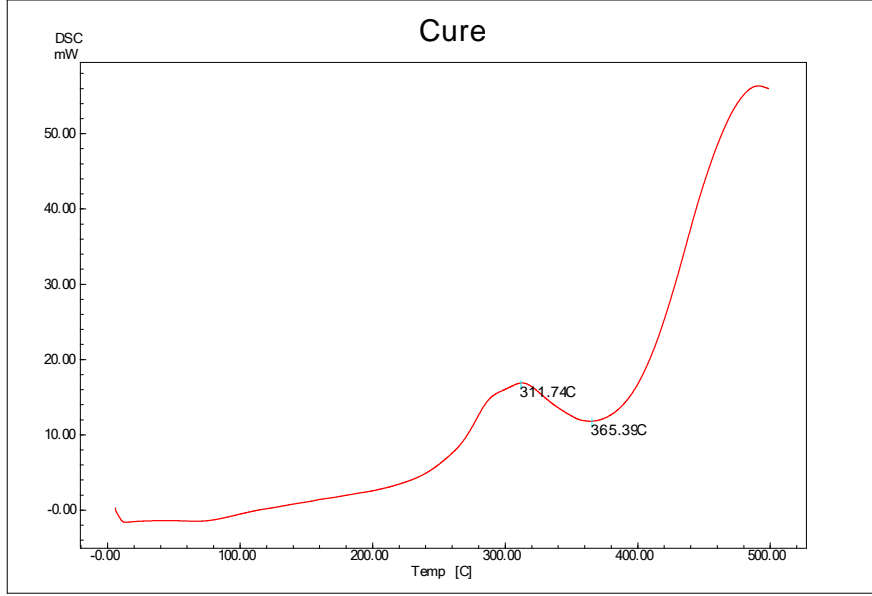
PHEMA kriyojel disklerde camsı geçiş bölgesi 185-260°C aralığında görülmektedir. Yapının 373°C'de kristallenmeye başladığı gözlenirken 466°C'de yapının erimeye başladığı söylenebilir (Şekil 4.12).



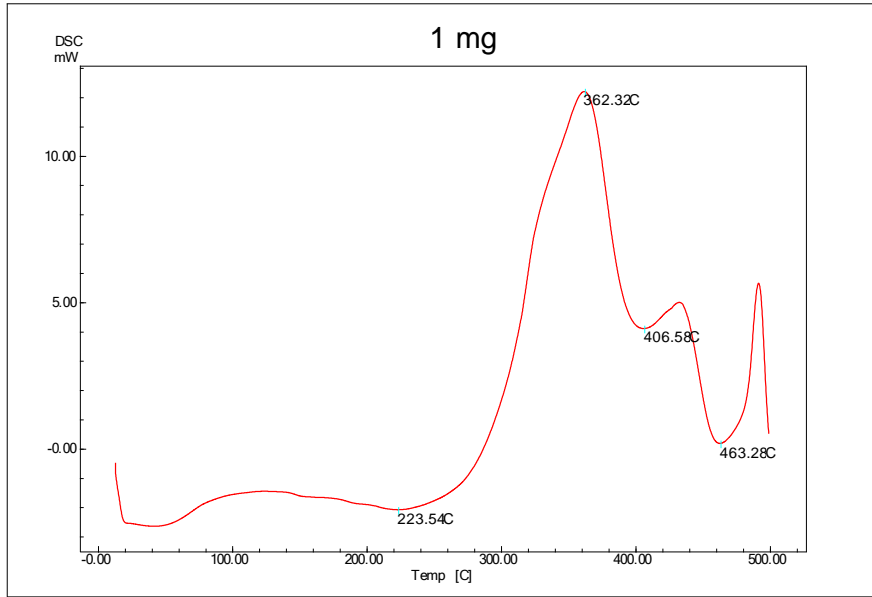
Şekil 4.12. PHEMA kriyojel diskin DSC termogramı



Şekil 4.13. NIP kriyojel diskin DSC termogramı



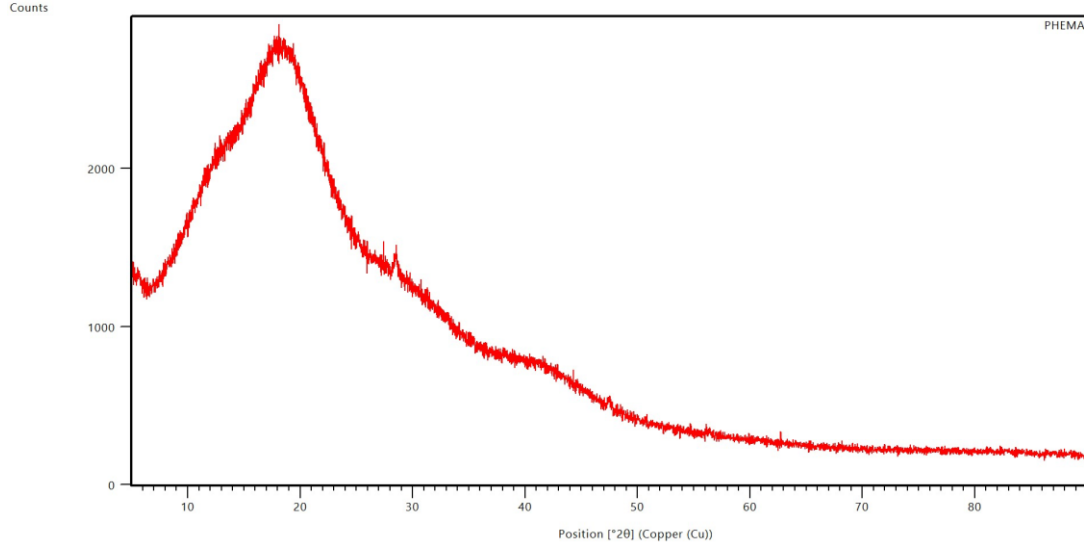
Şekil 4.14. Kurkuminin DSC termogramı



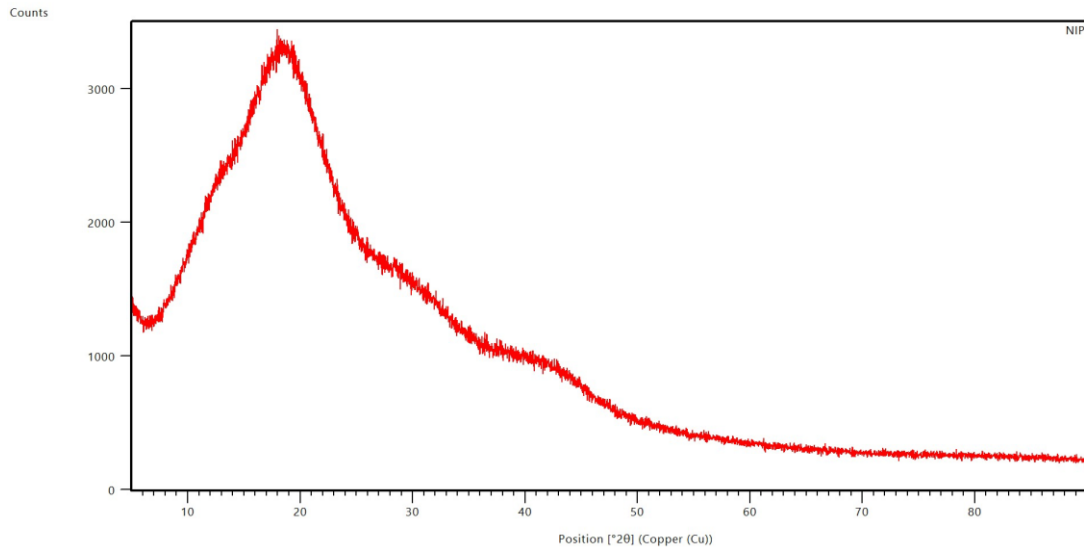
Şekil 4.15. Kurkumin yüklenmiş kriyojel diskin DSC termogramı, derişim: 1 mg/mL

Kurkuminin kristalizasyon sıcaklığının görece düşük olması nedeniyle kurkumin yüklenmiş kurkumin baskılanmış PHEMA kriyojel disklerde kristalizasyon 362°C'de görülmektedir. Aynı şekilde kurkumin erime sıcaklığı 365°C civarında görülürken bu sıcaklık kurkumin baskılanmış PHEMA kriyojel disklerde 400°C civarında görülmektedir. Bu da yapının termal kararlılığını açıklamaktadır (Şekil 4.15).

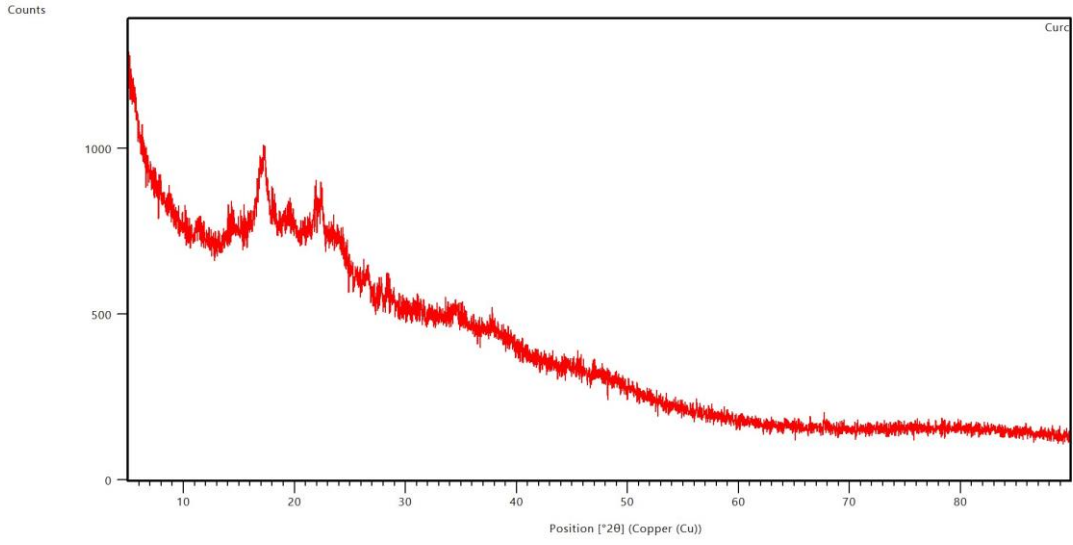
4.2.6. X-Işınları Difraktrometresi (XRD)



Şekil 4.16. PHEMA kriyojel disklerin XRD desenleri

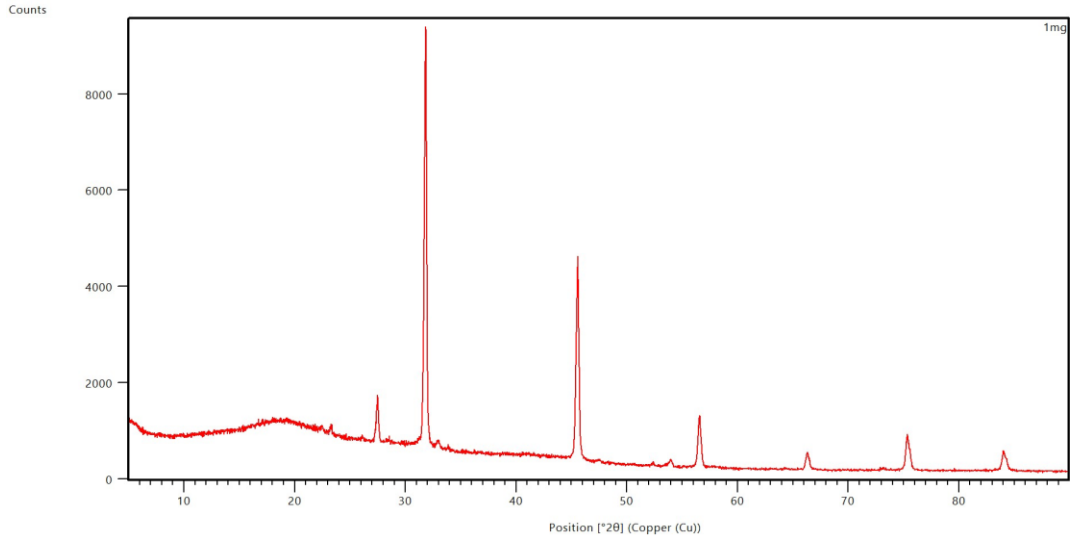


Şekil 4.17. NIP kriyojel disklerin XRD desenleri



Şekil 4.18. Kurkuminin XRD desenleri

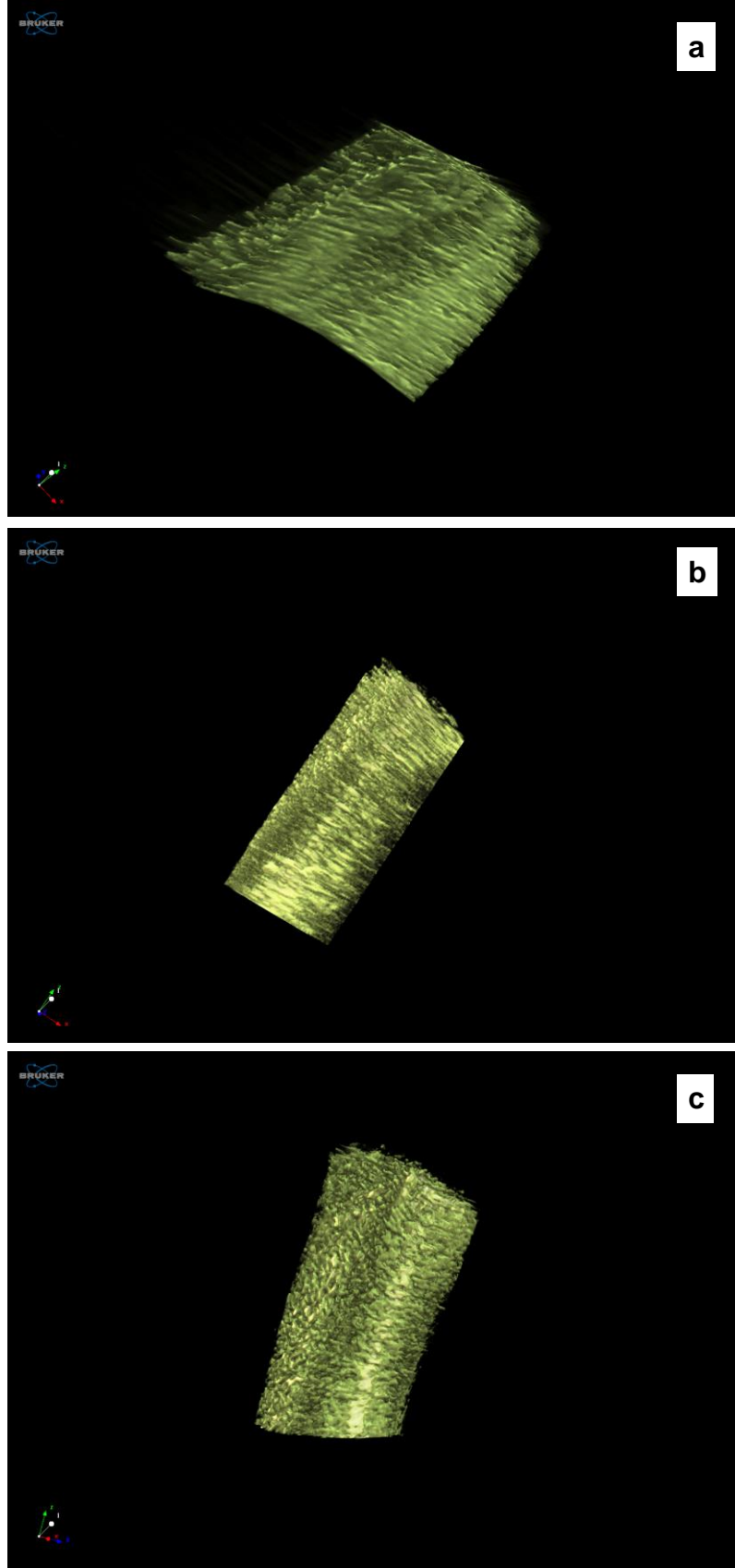
XRD spekturumunda kurkumine ait pikler 14° ila 27° arasında görülmektedir. Bu pikler kurkuminin moleküller yapısının kristalin yapıda olduğunu göstermektedir (Şekil 4.18). Kurkumin baskılanmış PHEMA kriyojel diske ait XRD spektrumunda kurkumine ait keskin kırınım pikleri görülmektedir. Kriyojel diskin yapısına yüklenmiş kurkumin moleküllerinin kristal yapısını koruduğu görülmektedir. Polimerik kriyojel yapı ise amorf yapıdadır. Ayrıca ilacın polimerik kriyojel yapıda homojen olarak dağıtıldığı söylenebilir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. 1.0 mg kurkumin yüklü MIP kriyojel disklerin XRD desenleri

4.2.7. Bilgisayarlı Mikrotomografi (Micro-CT)

Farklı monomer oranları ile hazırlanmış olan MIP1, MIP2 ve MIP3 için alınmış olan anlık micro-CT görüntülerinden homojen bir yapı gözlenmiş; hiçbirinde opak bir alan gözlenmemiştir. Daha az monomer oranı ile hazırlanmış olan MIP1'in MIP3'e göre daha daha büyük gözenekler içerdiği değerlendirilebilir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Farklı monomer oranına sahip kriyojel disklerin mikro-CT çıktılarının anlık görüntüleri, a) MIP1 kriyojel disk, b) MIP2 kriyojel disk, c) MIP3 kriyojel disk

4.3. Polimerizasyon Verimi

Çizelgede yer alan net ıslak ve kuru polimer ağırlıkları ile toplam monomer ağırlığı verileri üzerinden yapılan hesaplamalardan polimerizasyon verimi %93 olarak bulunmuştur. Bu oldukça yüksek ve yığın polimerizasyon için kabul edilebilir bir değerdir.

Çizelge 4.5. Hesaplanmış net ıslak/kuru polimer ağırlıkları ve polimerizasyon verimi.

Toplam cam ağırlığı (g)	Toplam ıslak polimer ağırlığı (g)	Toplam kuru polimer ağırlığı (g)	Net ıslak polimer ağırlığı (g)	Net kuru polimer ağırlığı (g)	Toplam monomer ağırlığı (g)	Polimerizasyon verimi (%)
169.6	183.56	171.43	13.96	1,83	1,70	93

4.4. İn Vitro Salım Kinetiğinin İncelenmesi

İlaç salım kinetiği ve salım parametreleri aşağıda verilen Korsmeyer-Peppas modeline göre hesaplanmıştır.

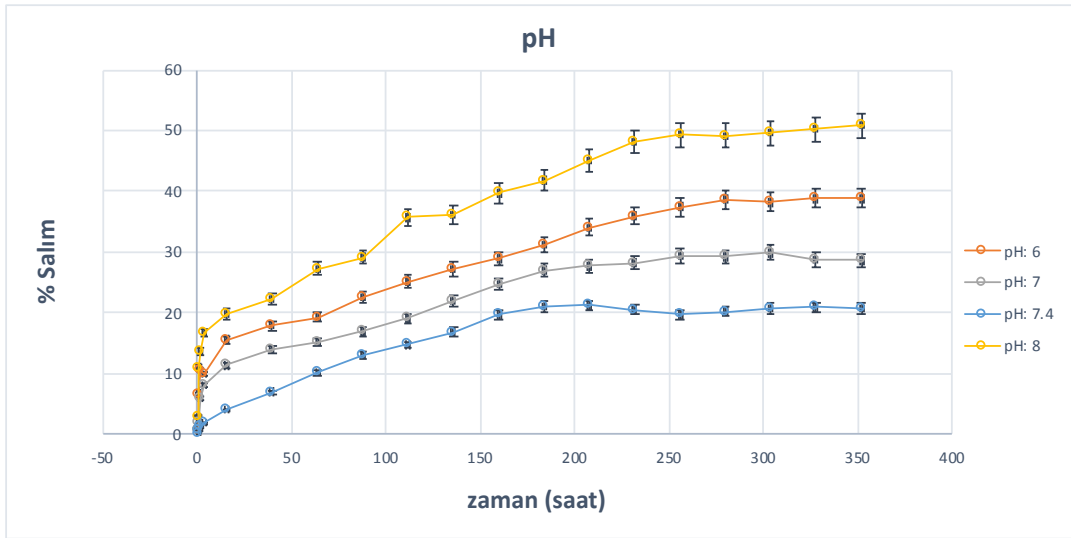
$$M_t/M_\infty = kt^n$$

Bu eşitlikte M_t/M_∞ ilaç salım kesri, t anındaki ve dengedeki ilacın kütle oranını, k Korsmeyer-Peppas sabitini ve n difüzyon türünü gösteren bir sabiti ifade etmektedir. Bu eşitlik, n değerine bağlı olarak difüzyon mekanizmasının türünü açıklar ve çözücünün polimerdeki genel taşınım davranışını tanımlamak için kullanılır. Buradaki verilerle $\ln(M_t/M_\infty)$ ile $\ln(t)$ arasındaki grafik çizildiğinde, grafiğin eğimi n değerini ve kesişimi k'yı verir. Bu denklem, ilacın fraksiyonel salımının üssel olarak salım süresiyle ilişkili olduğunu öngörür ve yalnızca toplam ilaç miktarının %60'ı salınana kadar ($M_t/M_\infty < 0.6$) geçerlidir [139].

Salım kinetiklerinin incelenmesi amacıyla yukarıdaki model uygulanmış ve çizilen grafiklerden n, k ve R² değerleri hesaplanarak her bir salım parametresi için salım mekanizmaları yorumlanmıştır.

4.4.1. Farklı pH'ların Salım Davranışı Üzerine Etkisi

Ortam pH'sının, kriyojel disklerden kurkumin salımı üzerine etkisinin incelenmesi için kurkumin baskılanmış MIP kriyojel disklerden 4 farklı pH'da (6.0, 7.0, 7.4 ve 8.0'de) ortama kurkumin salımı incelenmiştir. İlaç yüklemesi kriyopolimerizasyon sırasında yapılarak hazırlanmış olan kriyojel disklerden 5'er adedi cam şişe içerisine alınarak üzerine 5 mL farklı pH'larda tampon çözeltileri eklenmiştir. Hazırlanan örneklerin yer aldığı cam şişeler 37 °C sıcaklıkta 45 rpm'de karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Ölçümler UV-Vis spektrofotometrede 420 nm dalga boyunda; 30. dk, 60. dk, 120. dk, 4. saat, 8. saat, 12. saat, 24. saat ve devam eden günlerde alınmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.21. Ortam pH'sının kurkumin salım hızına etkisi (T: 37°C, %12 monomer oranı)

Ortam pH'sının asidik veya bazik olması ön komplekste kullanılan MAH-Cu²⁺ metal şelatın kararlılığını etkilemektedir. Asidik pH'larda salımın düşük olması ve bazik pH'larda metal ve kurkumin arasındaki etkileşimler daha zayıf olduğundan salımın daha

hızlı gerçekleşmesi beklenen bir durumdur. Bu çalışmada %12 monomer oranında hazırlanan kurkumin baskılanmış MIP kriyojel diskler kullanılmıştır.

Şekil 4.21’de görüldüğü gibi en hızlı ve en fazla miktarda kurkumin salımı pH değeri 8 olduğunda gerçekleşmektedir. Ortamın pH değeri 7.4 olduğu zaman salım değeri %20 olarak gözlenmiştir. Asidik ortamda kriyojellerin ve ilaçların bozunma olasılığı olduğundan genellikle asidik pH değerleri tercih edilmemektedir. Bu tez kapsamında pH 7.4’de daha yavaş ve istenilen sonuç gözlemlendiği için tercih edilmiştir. Ayrıca fizyolojik pH olan 7.4 değerini salım çalışmaları için en uygun pH olarak söylemek mümkündür.

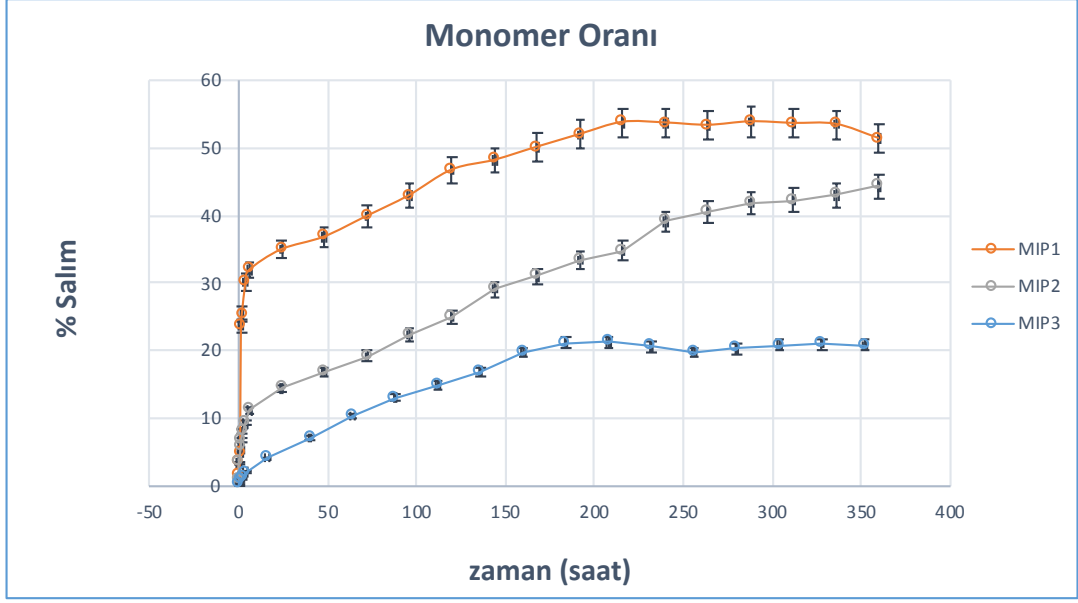
Çizelge 4.6. Farklı pH’larda kriyojeller için kurkumin salım kinetik verileri.

pH	n	k	R²
7.4	0,48	0,03	0,957
6	0,44	0,10	0,981
7	0,50	0,08	0,942
8	0,32	0,16	0,981

Çizelge 4.6’da yer alan hız sabitleri karşılaştırıldığında ortam pH’sının salım üzerine etkisinin incelendiği grafikte örtüşecek şekilde pH 7.4’te en yavaş salım ve pH 8’de en hızlı salım gözlenmiştir. Bunun yanı sıra ilacın polimer diskten salımı her bir pH değeri için non-Fickian olarak değerlendirilmiştir.

4.4.2. Monomer Oranının Salım Üzerine Etkisi

Kriyojel disklerin hazırlanması için kullanılan reçetede yer alan su miktarı değiştirilerek moleküler baskılanmış kriyojel disklerdeki monomer yüzdesi değiştirilmiş ve %8’lik (MIP1), %10’luk (MIP2) ve %12’lik (MIP3) olmak üzere üç grup kriyojel disk hazırlanarak kurkumin salımı sonuçları üzerinde karşılaştırmalar yapılmıştır.



Şekil 4.22. Farklı monomer oranlarının kurkumin salım hızına etkisi (pH: 7.4, T: 37°C)

Grafikten 4.22'den görülebileceği üzere yapıdaki monomer oranı azaldıkça salım hızında bir artış gözlenmiştir. Monomer oranının yüzdesi azaldıkça salımın da %20'den %50'ye kadar arttığı bulunmuştur. Monomer oranının artışı ile polimerik yapıda su oranının azalması ve oluşan gözeneklerin daha küçük olmasından kaynaklı kurkumin baskılama oranı azalmaktadır. Dolayısıyla salım oranını doğrudan etkileyerek azalmıştır. Polimerik yapıya daha fazla su girdiğinde kriyojel içerisinde oluşan gözenekler daha büyüktür ve bu durum kurkumin baskılama oranını arttırdığından salımda bir artış görülmektedir.

Çizelge 4.7. Farklı monomer oranında hazırlanmış kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.

Kriyojel	n	k	R ²
MIP1	0,97	0,15	0,968
MIP2	0,42	0,10	0,968
MIP3	0,70	0,03	0,975

Çizelge 4.7'den açıkça görüleceği üzere k hız sabitinin en yüksek değeri, %8 monomer oranı ile hazırlanan MIP1'de görülmüştür. Monomer oranı arttıkça hız sabiti k değerlerinde düşüş gözlenmektedir. Bu durum kriyopolimerizasyon işlemine daha fazla su girmesi sebebiyle artan gözenekli yapıyla bağlantılı olmak üzere salım hızında bir artış meydana gelmesi durumunu desteklemektedir. Ayrıca MIP1 için n değeri 1'e çok yakın olduğundan Durum II olarak belirtilen şişme kontrolüne en yakın kriyojel diskidir.

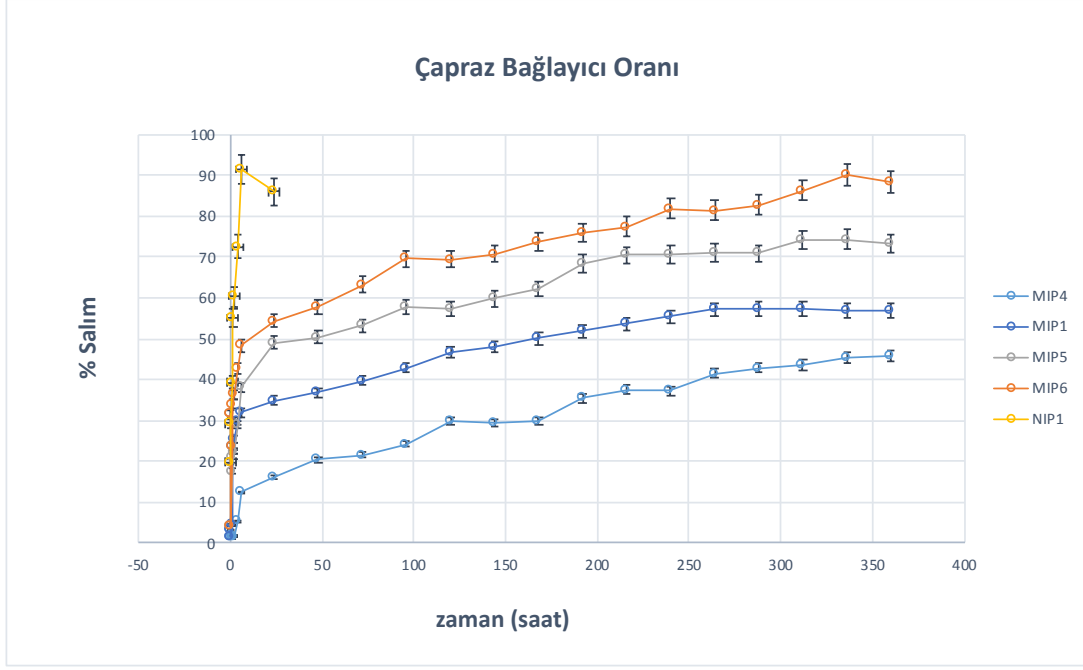
4.4.3. Çapraz Bağlayıcı Oranı Değişiminin Salım Üzerine Etkisi

Polimerik kriyojelin çapraz bağlayıcı oranı salım hızını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu tez çalışmasında kriyojelik polimer yapıda çapraz bağ oluşumunu kontrol etmek amacıyla dört farklı oranda MBAAm ($n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}} = 4, 6, 8, 10$) kullanılmıştır. Böylece farklı miktarlardaki çapraz bağlayıcının polimer yapısına ve salım kinetiğine etkisini incelemek amaçlanmaktadır. Bu etkiyi değerlendirmek amacıyla %8'lik sabit monomer oranına ve farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip MIP kriyojel disklerden kurkumin salımı incelenmiştir.

Bu parametrenin incelenmesi için yukarıda verilen reçete ile %8'lik kriyojel diskler hazırlanırken içerikteki MBAAm miktarı değiştirilmiştir. %8'lik monomer oranına sahip kriyojel diskleri hazırlamak amacıyla kullanılan reçetede molce HEMA/MBAAm oranı daha önceki çalışmalarda 6 iken HEMA kütlesi sabit tutulmuş ve MBAAm kütlesi değiştirilerek molce oranı;

- 4 olarak belirlemek için 0.417 g MBAAm,
- 8 olarak belirlemek için 0.207 g MBAAm,
- 10 olarak belirlemek için 0.166 g MBAAm kullanılmıştır.

İlk gün ve ilk saatlerde sıklıkla kaydedilen absorbans değerleri daha sonra 24 saat aralıklı ölçümlerle 15 gün devam etmiştir.



Şekil 4.23. $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$ oranının toplam salıma etkisi (pH: 7.4, T: 37 °C)

Şekilden 4.23'ten anlaşılacağı üzere, polimerik yapıdaki MBAAm oranı arttıkça salım hızı düşmektedir. Bu sonuç, yapıdaki MBAAm miktarının artırılmasının yapının çapraz bağ oranını arttırdığını açıkça kanıtlamaktadır. Çapraz bağ oranının artmasıyla toplam salım hızını düşüren daha sert bir yapı ortaya çıkmıştır. Diğer bir yandan hidrofobik olan MBAAm'in yapıdaki miktarının artmasıyla birlikte moleküler baskılamada hidrofobik etkileşimlerin etkisinin artmış olabileceği değerlendirilmiştir. Bu nedenle de salım hızında düşüş gözlenmiş olabilir.

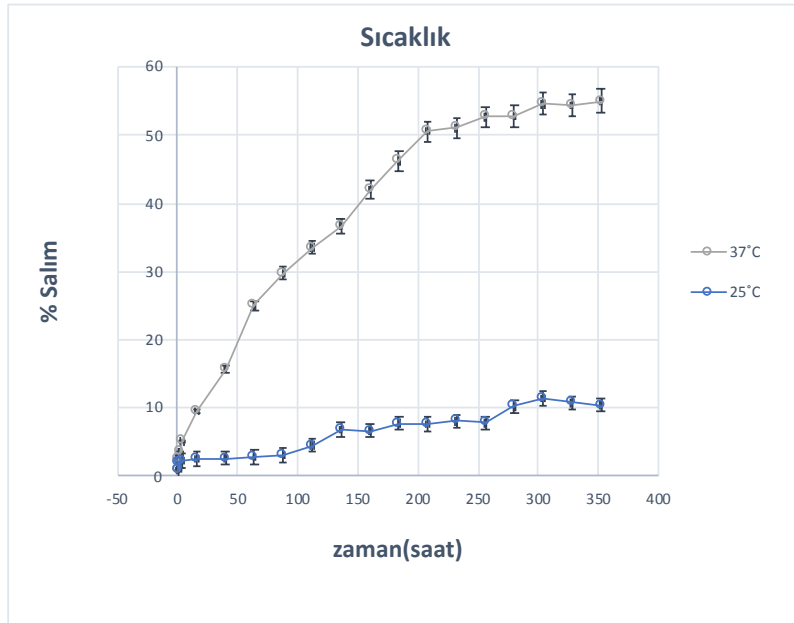
Çizelge 4.8. Farklı çapraz bağlayıcı oranları kullanılarak hazırlanmış kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.

Kriyojel	n	k	R ²
MIP4	0,52	0,07	0,974
MIP1	0,97	0,14	0,970
MIP5	0,30	0,26	0,932
MIP6	0,42	0,28	0,971

Çizelge 4.8’de hesaplanmış n değerleri incelendiğinde ilacın polimer disklerden salım mekanizmasının non-Fickian difüzyonla gerçekleştiği görülmektedir. Hız sabiti olan k değerleri incelendiğinde ise polimerik yapıdaki çapraz bağlayıcı miktarı azaldıkça bu sabitin arttığı açıkça görülmektedir. Bu da yapıdaki çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça daha katı yapıya geçmesi ve gözenek miktarının azalması nedeniyle ilaç salım hızının düşmesi olarak yorumlanabilir.

4.4.4. Sıcaklık Parametresinin Salım Üzerine Etkisi

Salım kinetiği incelenirken diğer bir önemli parametre de salım ortamı sıcaklığının ilaç salımı üzerindeki etkisidir. Bunu belirleyebilmek amacıyla, 1 mg/mL olmak üzere aynı derişimde kurkumin yüklü MIP kriyojel disklerin 37.0°C ve oda sıcaklığındaki ilaç salım davranışları incelenmiştir.



Şekil 4.24. Sıcaklığın toplam ilaç salımına etkisi (pH:7.4, $n_{HEMA}/n_{MBAAm}=6$)

Şekil 4.24 incelendiğinde ani salım etkisine bağlı olarak iki sıcaklıktaki salım hızı farklılığı ilk saatlerde daha belirgin görülmektedir; ancak ilerleyen günlerde salım hızı eğimi birbirine yakındır. Bu duruma polimerizasyon esnasında moleküler baskılamaya katılmayan ve yıkama ile belli bir oranda uzaklaştırılmamış olan ilaç moleküllerinin

neden olmuş olabileceği de değerlendirilmiştir [140]. 37.0 °C’de gerçekleşen salım oda sıcaklığında gerçekleşen salıma nazaran açıkça daha hızlı ve daha fazla miktarda gözlenmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı sıcaklıklarda kriyojel disklerden kurkumin salımı kinetik verileri.

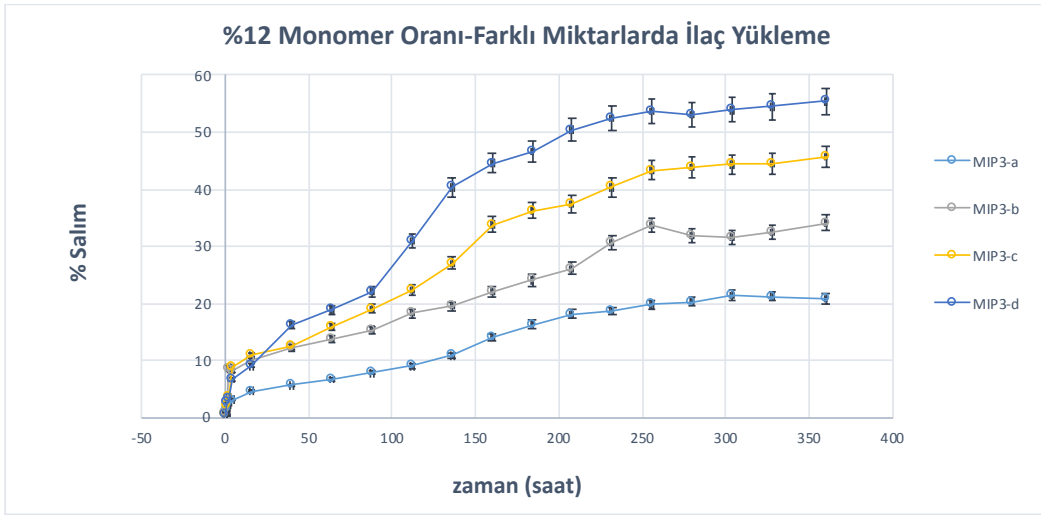
Sıcaklık (°C)	n	k	R ²
37	0,58	0,05	0,961
25	0,35	0,07	0,783

4.4.5. İlaç Yükleme Miktarının Salım Üzerine Etkisi

%12’lik monomer oranına sahip kurkumin baskılanmış MIP kriyojel disklerden kurkumin uzaklaştırıldıktan sonra bu kriyojel disklere 0,1 mg/mL (MIP3-a); 0,5 mg/mL (MIP3-b); 0,7 mg/mL (MIP3-c) ve 1 mg/mL (MIP3-d) derişimlerde olmak üzere dört farklı kurkumin yüklemesi yapılmıştır. Bunun için:

- İlk olarak 5’er adet disk 0,1 M, 5 mL’lik NaCl çözeltisine 2 saat süre ile daldırılmış; 2 saat sonrasında UV spektrofotometresinde bu çözeltinin 420 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.
- Daha sonra diskler saf su içerisine alınarak üzerindeki desorpsiyon işlemi nedeniyle oluşabilecek kalıntıların da uzaklaştırılması amacıyla 1 gece saf suda bekletilmiştir. Ertesi gün önce saf sudaki absorbans değeri ölçülmüş daha sonra diskler dört farklı derişimde hazırlanan kurkumin çözeltilerine alınmıştır. Her bir derişimdeki şişeden 0. dakika başlangıç (initial) absorbans değerleri ölçülmüş; 2 saat sonrasında da bitiş (final) absorbans değerleri alınmıştır.

- Daha sonra her bir 5'er adetlik kriyojel disk grubu, cam şişe içerisindeki PBS (pH:7.4) çözeltisine alınmış; cam şişeler 37 °C sıcaklıkta 45 rpm'de çalışan karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Ölçümler UV-Vis spektrofotometrede, 420 nm dalga boyunda; 15. dk, 30. dk, 45. dk, 60. dk, 90. dk, 120. dk, 4. sa, 8. sa, 24. sa ve devam eden günlerde kaydedilmiştir.



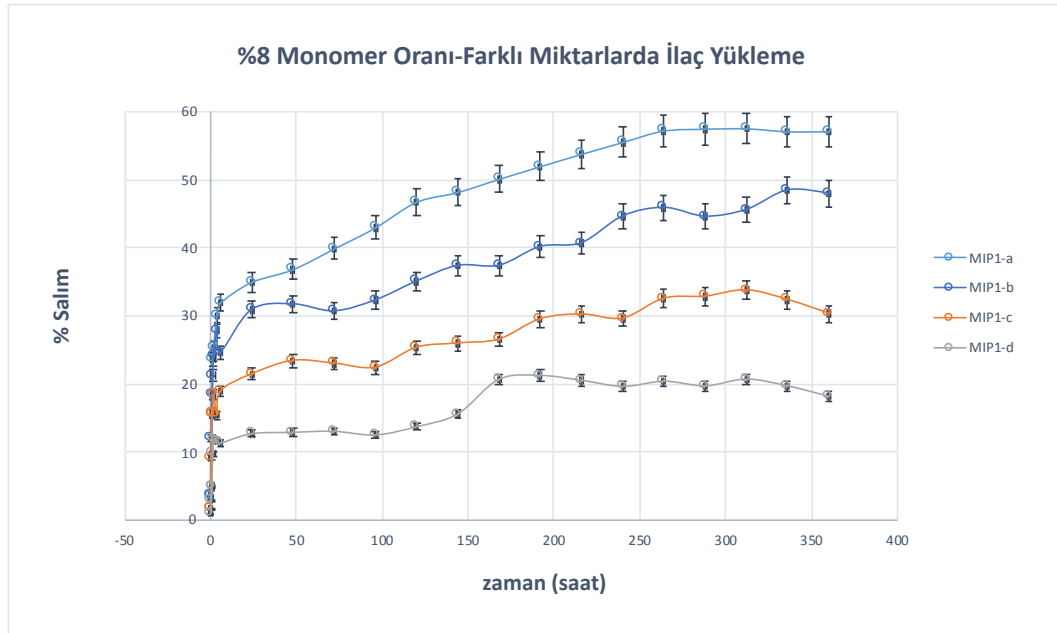
Şekil 4.25. MIP3 kriyojel disklerde kurkumin yükleme oranının toplam salıma etkisi (pH: 7.4, T:37 °C, $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=6$)

Şekil 4.25'ten görüldüğü üzere kurkumin yükleme miktarının artması ile birlikte salım hızı da artmaktadır. Bu sonuç, polimerik sistemdeki kurkumin miktarının artması ile kurkuminin kriyojel diskten difüzyonu için derişim farkının artışı ile açıklanabilir. İlaç derişim farkından dolayı kriyojel, yapı içerisinde tampon ortamına salım yapabilir. Derişim farkının artması ile sürücü kuvvet artmakta ve buna paralel olarak da salınan ilaç miktarı önemli ölçüde artmaktadır. İlaç yükleme miktarı 100 µg/mL iken salım %20 civarındayken ilaç salım oranının 1000 µg değerinde %60'lara kadar arttığını görmekteyiz. Daha doğrusu kriyojel disk yapısındaki kurkumin moleküllerinin daha fazla salımı gerçekleşmiştir. Kriyojel yapıdaki ilaç yükleme miktarının artması sonucunda salım hızı da doğrusal olarak artmaktadır.

Çizelge 4.10. Farklı miktarlarda kurkumin yüklenmiş MIP3 kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.

Kriyojel	n	k	R ²
MIP3-a	0,40	0,08	0,968
MIP3-b	0,42	0,10	0,967
MIP3-c	0,55	0,05	0,948
MIP3-d	0,62	0,04	0,957

Çizelge 4.10'da yer alan n değerleri incelendiğinde kurkuminin kriyojel disklerden salımının non-Fickian difüzyonla gerçekleştiği değerlendirilebilir. Bu sonucun diğer sistemlerde de tekrarlanabildiğini araştırmak üzere aynı yöntemlerle daha önceden hazırlanmış olan %8'lik monomer oranına sahip kriyojel disklerde de 0,2 mg/mL (MIP1-d); 0,5 mg/mL (MIP1-c); 0,7 mg/mL (MIP1-b) ve 1 mg/mL (MIP1-a) derişimlerde olmak üzere farklı miktarlarda kurkumin yüklemesinin etkileri değerlendirilmiştir.



Şekil 4.26. MIP1 kriyojel disklerde kurkumin yükleme miktarının toplam salıma etkisi (pH: 7.4, T: 37 °C, n_{HEMA}/n_{MBAAm}=6)

MIP1 kriyojel disklerde de farklı kurkumin yükleme miktarlarının toplam salıma etkisi incelendiğinde MIP3 kriyojel disklerde görüldüğü gibi kurkumin yükleme miktarı arttıkça salım hızı artmıştır (Şekil 4.26).

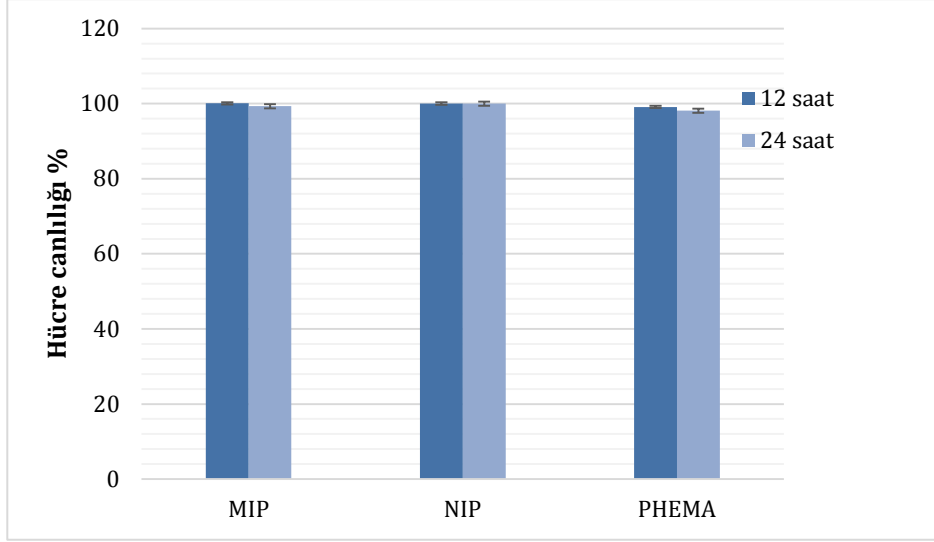
Çizelge 4.11. Farklı miktarlarda kurkumin yüklenmiş MIP1 kriyojel diskler için kurkumin salım kinetik verileri.

Kriyojel	n	k	R²
MIP1-a	0,97	0,14	0,966
MIP1-b	0,56	0,30	0,894
MIP1-c	0,63	0,31	0,899
MIP1-d	0,76	0,22	0,845

Çizelge 4.11'e bakıldığında tüm n değerlerinin $0,5 < n < 1$ aralığında olduğu görülmekte; bu da salımın non-Fickian difüzyonla gerçekleştiğini göstermektedir. En iyi salım kinetiği, şişme profiline en yakın n değeri, en düşük hız sabiti ve en yüksek regresyon katsayısı ile en yüksek derişimde kurkumin yüklemesi yapılmış olan MIP1-a kriyojel diskte gözlenmektedir.

4.5. Sitotoksosite Çalışmaları

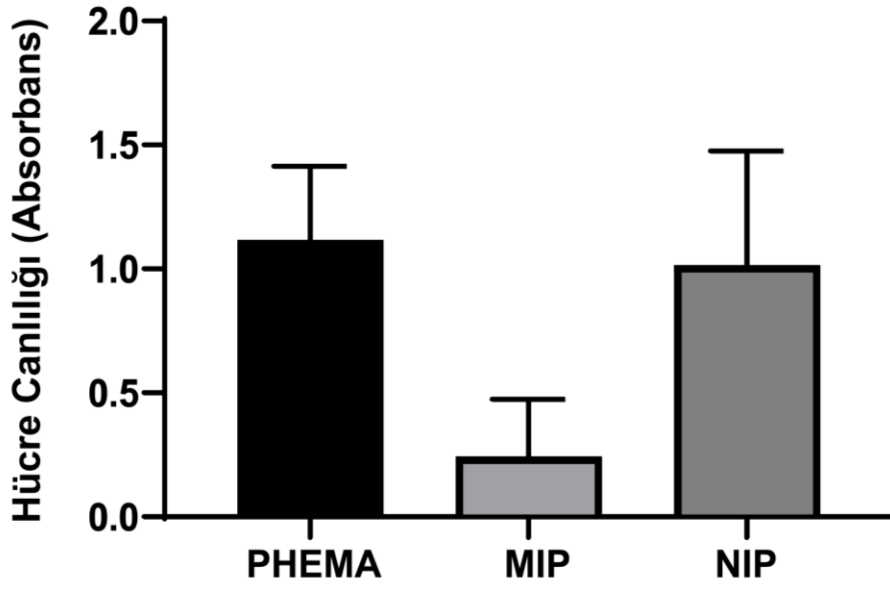
MIP, NIP ve PHEMA kriyojel disklerin sitotoksitesi, fare fibroblast hücre hattı L929 kullanılarak araştırılmıştır. Hücre hatlarının canlılığı, kriyojel diskler ile işlemde 12 ve 24 saat sonra belirlenmiştir. MIP, NIP ve PHEMA kriyojel disklerde hücre canlılığı, diskler 0.5 mg/mL kurkuminle yüklendikten 24 saat sonra sırasıyla 99.32 ± 1.06 , 100.01 ± 0.12 ve 98.12 ± 2.27 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.27). Bu sonuçlar MIP kriyojel disklerinin sitotoksik olmadığını düşünölebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.27. 12 ve 24 saat sonra MIP, NIP ve PHEMA kriyojel diskler ile muamele edilen hücre hatlarının canlılığı

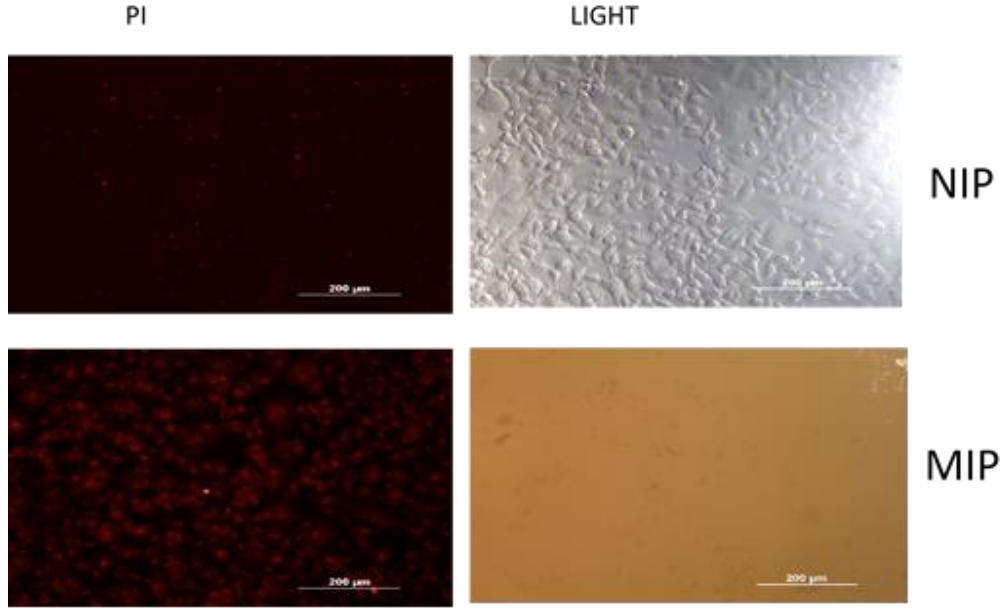
4.7. Hücre Canlılığı Çalışmaları

MTT, hücre canlılığını ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Öncelikle mitokondride bulunan dehidrojenazların aktivitesini ölçer. Hücre canlılığı sona erdiğinde mitokondriyal fonksiyon ve sonuç olarak tetrazolyum tuzunu formazana dönüştürme yeteneği azalır. Birçok hücrede formazan miktarı hücre sayısı ile orantılı olarak değişir ve hücre canlılığı bu miktar değişikliği ile tespit edilir. Şekil 4.31'de görüldüğü gibi 48. saatte, NIP ve PHEMA kontrol grubunda hücre canlılığı hemen hemen aynıdır. Kurkumin içermeyen, baskılanmamış kriyojel disklerin (NIP) bu süre boyunca hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır. Ancak kurkumin baskılanmış MIP'lerin hücre canlılığı açısından %75-80 oranda MDA MB 231 meme kanser hücresine etki ettiği görülmektedir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. MTT testinde 48 saat sonunda kontrol PHEMA, NIP ve MIP gruplarında hücre canlılığı ölçümü

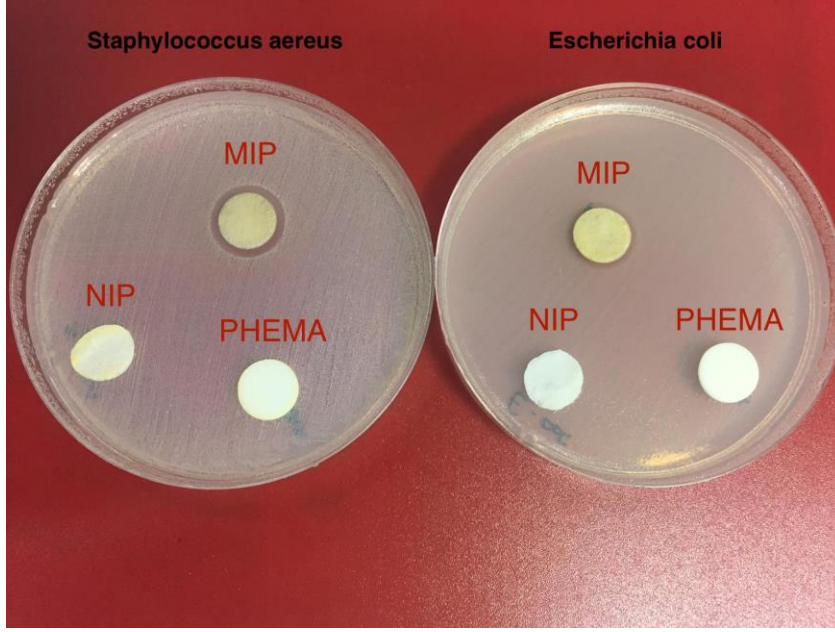
Canlı ve cansız hücreleri bir arada görüntülemek için kullanılan yöntemde akridin oranj (AO) ve propidyum iyodit (PI) boya çifti kullanılır. Bu boyalar, nükleik asitlere bağlanarak renklendirme özelliğine sahiptir. AO, hücre zarından geçebilir. Bu şekilde DNA ve RNA gibi canlı hücrelerin nükleik asitlerine bağlanarak yeşil floresan renk verir. PI canlı hücre zarından geçemez ve ölü hücrelerin nükleik asitlerine bağlanarak floresans altında kırmızı renk verir. Çalışmanın bu kısmında propidium iyodit boyama ile ölü hücreler görüntülenmiştir. Şekil 4.29'da görüldüğü üzere kurkumin baskılanmış kriyojel diskler ile muamele edilen MDA MB 231 meme kanser hücrelerinde, baskılanmamış kriyojel disk ile muamele edilen hücrelere kıyasla 48 saatte canlılık azalmıştır.



Şekil 4.29. NIP ve MIP kriyojel diskler ile propidium iyodür boyama ve ışık mikroskobu görüntüleri

4.8. Antibakteriyel Özelliğin İncelenmesi

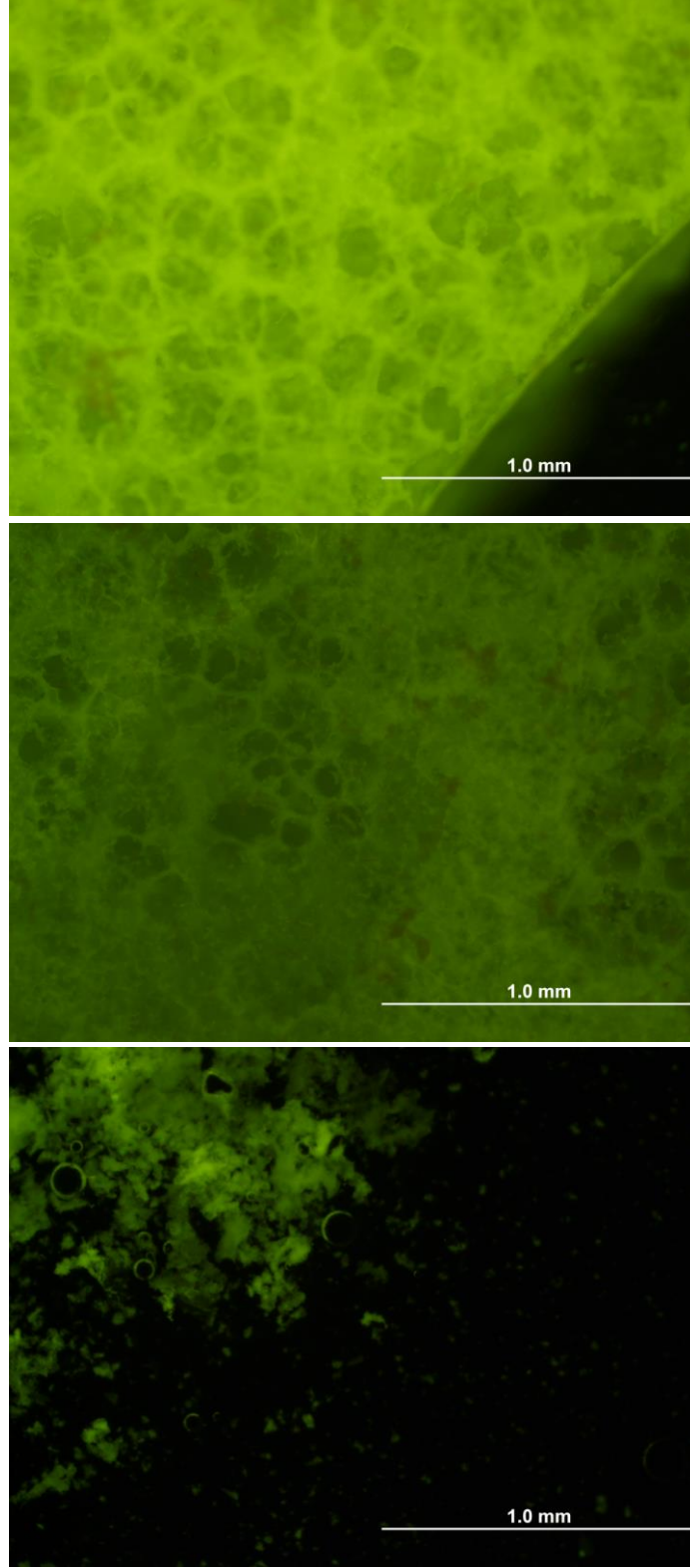
Uygun besiyerlerine yerleştirilen PHEMA, NIP ve MIP kriyojel diskler etrafında oluşan zonlar inkübasyon süresi sonunda kontrol edilmiş ve fotoğraflanmıştır. Şekil 4.30'da kurkumin içermeyen PHEMA ve NIP mebranların etrafında herhangi bir zon oluşumu gözlenmezken kurkumin yüklenmiş MIP disk etrafındaki zon oluşumu, kurkuminin antibakteriyel özelliğine işaret etmektedir.



Şekil 4.30. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibakteriyel özelliğın incelenmesi ve kurkumin baskılanmış kriyojel disklerin etrafında oluşan zonlar

4.9. Kurkuminin Floresan Özelliğı

Kurkuminin kendi özelliğı nedeniyle herhangi bir boyama yapmaya gerek kalmaksızın floresan mikroskop altında belirgin bir şekilde floresan ışımaya yaptığı görülmektedir. Kriyojel disklere yüklenen kurkumin miktarı azaldıkça floresan ışımaya yoğunluğu da azalmıştır (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Floresan mikroskop altında kurkumin yüklenmiş MIP kriyojel disklerin görüntüleri

5. YORUM

Sunulan tez çalışması kapsamında kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılmak üzere kurkumin baskılanmış polimerik kriyojel diskler hazırlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda farklı tipte kriyojel disklerden kurkuminin salımı incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Kontrol grubu olarak kullanmak amacıyla kurkumin baskılanmamış PHEMA kriyojel diskler hazırlanmıştır. PHEMA temelli kurkumin baskılanmış kriyojel disklerin hazırlanmasında fonksiyonel monomer olan N-metarilolil-L-histidin metil ester (MAH) monomeri, metal şelat yöntemi ile Cu^{2+} aracılığıyla baskılanacak kalıp molekül olan kurkumin ile kompleks oluşturulmuştur. PHEMA ve kurkumin baskılanmış kriyojel disklerin hazırlanmasında kriyopolimerizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemle, farklı monomer oranlarına, farklı ilaç miktarlarına ve farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip kurkumin baskılanmış kriyojel diskler hazırlanmıştır.
- Hazırlanan PHEMA kriyojel disklerin net ıslak ve kuru polimer ağırlıkları ile toplam monomer ağırlığı verileri üzerinden yapılan hesaplamalardan polimerizasyon verimi %93 olarak bulunmuştur. Bu oldukça yüksek ve yığın polimerizasyon için kabul edilebilir bir değerdir.
- Kurkumin baskılanmış PHEMA temelli kriyojel disklerin yapısal karakterizasyonu FTIR, SEM, BET, DSC, XRD ve MICRO-CT ile yapılmıştır.
- FTIR ile yapı analizinde O-H gerilimlerine ait $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısındaki pikler fenol gruplarını, $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısındaki pikler aromatik C=C gerilimlerini ve 1153 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler C-O-C gerilimlerini belirten kurkumine ait pikler olarak değerlendirilmiştir. Kurkumin baskılanmış poli(HEMA-MAH- Cu^{2+})'ya ait FTIR spektrumunda; N-H gerilme pikleri $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$, OH gerilme $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$, alifatik C-H gerilme $2900\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$, ester C=O gerilme $1720\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$, C=C gerilmesi $1600\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, C-O

gerilme 1240-1250 cm⁻¹, aromatik C-H gerilme 740-750 cm⁻¹ bantlarında görülmüştür.

- Kriyojel disklerin şişme deneyleri 4 °C, 25 °C, 37 °C ve 42 °C olmak üzere dört farklı sıcaklıkta tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlardan yapıdaki aynı sıcaklıklarda monomer oranı ve çapraz bağlayıcı oranı arttıkça şişme oranında azalma; farklı sıcaklıklarda ise sıcaklık arttırıldıkça şişme oranında artış gözlemlenmiştir. Yine aynı şekilde oda sıcaklığında gerçekleştirilen şişme deneylerinde polimerik yapıdaki monomer oranı ve çapraz bağlayıcı oranı arttıkça makrogözeneklilik oranının azaldığı sonucuna varılmıştır.
- PHEMA ve kurkumin baskılanmış poli(HEMA-MAH-Cu²⁺) kriyojel disklerin yığın yapısı ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM görüntülerinden açıkça anlaşıldığı üzere yapıdaki monomer oranı arttıkça gözenek çapında azalma; farklı çapraz bağlayıcı miktarları içeren kriyojel disklerin SEM görüntülerine bakıldığında yapıdaki çapraz bağlayıcı oranının artması ile birlikte daha katı bir polimerik yapıya ulaşıldığı, daha kalın polimer duvarı ve daha küçük çapta gözenekler ile sonuçlandığı görülmektedir.
- BET cihazı ile gerçekleştirilen yüzey alanı ölçüm sonuçları incelendiğinde yapıdaki monomer oranı arttıkça kriyojel disklerin yüzey alanlarının arttığı; kriyojel disklerin içerdiği çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça yüzey alanlarının azaldığı sonucuna varılmıştır.
- DSC termogramları incelendiğinde PHEMA kriyojel disklerde camsı geçiş bölgesi 185-260 °C aralığında görülmektedir. Yapının 373 °C'de kristallenmeye başladığı gözlenirken 466 °C'de yapının erimeye başladığı söylenebilir. Kurkuminin kristalizasyon sıcaklığının görece düşük olması nedeniyle kurkumin yüklenmiş kurkumin baskılanmış PHEMA kriyojel disklerde kristalizasyon 362°C'de görülmektedir. Aynı şekilde kurkumin erime sıcaklığı 365 °C civarında görülürken bu sıcaklık kurkumin baskılanmış PHEMA kriyojel

disklerde 400 °C civarında görülmektedir. Bu da yapının termal kararlılığını açıklamaktadır.

- XRD spektrumunda kurkumine ait pikler 14° ila 27° arasında görülmektedir. Bu pikler kurkuminin moleküler yapısının kristalin yapıda olduğunu göstermektedir (Şekil 4.21). Kurkumin baskılanmış PHEMA kriyojel diske ait XRD spektrumunda polimerik kriyojel yapının amorf yapıda olduğu; kriyojel diskin yapısına yüklenmiş kurkumin moleküllerinin ise kristal yapısını koruduğu görülmektedir. Ayrıca ilacın polimerik kriyojel yapıda homojen olarak dağıtıldığı söylenebilir.
- Farklı monomer oranları ile hazırlanmış olan MIP1, MIP2 ve MIP3 için alınmış olan anlık micro-CT görüntülerinden daha az monomer oranı ile hazırlanmış olan MIP1'in MIP3'e göre daha gözenekli yapıda olduğu değerlendirilebilir. Görüntülerde homojen bir yapı gözlenmiş; hiçbirinde opak bir alan görülmemiştir.
- İn vitro salım kinetikleri incelendiğinde farklı pH ortamlarında en hızlı ve en fazla miktarda kurkumin salımı pH değeri 8 olduğunda gerçekleşmektedir. Ortamın pH değeri 7.4 olduğu zaman salım değeri %20 olarak gözlenmiştir. Bu tez kapsamında pH 7.4'de daha yavaş ve istenilen sonuç gözlemlendiği için tercih edilmiştir. Ayrıca fizyolojik pH olan 7.4 değerini salım çalışmaları için en uygun pH olarak söylemek mümkündür.
- Farklı monomer oranlarının salım üzerine etkisi incelendiğinde yapıdaki monomer oranı arttıkça salım hızında bir artış gözlenmiştir. Monomer oranının yüzdesi arttıkça salımın da %20'den %50'ye kadar arttığını bulunmuştur. Polimerik yapıya daha fazla su girdiğinde, yani monomer oranı azaldıkça kriyojel içerisinde oluşan gözenekler daha büyüktür ve bu durum kurkumin baskılama oranını azalttığından salımda bir düşüş görülmektedir.

- Farklı çapraz bağlayıcı oranlarının kriyojel disklerden kurkumin salımı üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla %8'lik sabit monomer oranına ve farklı çapraz bağlayıcı oranlarına sahip kriyojel disklerden kurkumin salımı incelenmiştir. Yapıdaki MBAAm oranı arttıkça salım hızı düşmüştür. Bu sonuç, yapının çapraz bağ oranının yapıdaki MBAAm miktarının artırılmasıyla arttığını göstermektedir. Çapraz bağ oranının arttığından daha sert bir yapı ortaya çıkmış ve bu, toplam salım hızını düşürmüştür.
- Sıcaklık parametresinin kriyojel disklerden salım üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla aynı miktar (1 mg/mL) ilaç yüklü MIP kriyojel disklerin 37.0 °C ve oda sıcaklığındaki ilaç salım davranışları incelenmiştir. 37.0 °C'de gerçekleşen salım oda sıcaklığında gerçekleşen salıma nazaran açıkça daha hızlı ve daha fazla miktarda gözlenmiştir.
- İlaç yükleme miktarının salım üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla %8 ve %12 monomer oranına sahip kriyojel disklere dört farklı derişimde kurkumin yüklenmiştir. Her iki monomer oranında da salım hızı, ilaç yükleme miktarının artması ile birlikte artmaktadır. Bu sonuç, derişim farkının artışı ile açıklanabilir. İlaç derişim farkından dolayı kriyojel, yapı içerisinde tampon ortamına salım yapabilir. Derişim farkının artması ile sürücü kuvvet artmakta ve buna paralel olarak da salınan ilaç miktarı önemli ölçüde artmaktadır.
- MIP, NIP ve PHEMA kriyojel disklerin sitotoksitesi, fare fibroblast hücre hattı L929 kullanılarak araştırılmıştır. MIP, NIP ve PHEMA kriyojel disklerde hücre canlılığı, 0.5 mg/mL kurkuminle yüklendikten 24 saat sonra sırasıyla 99.32 ± 1.06 , 100.01 ± 0.12 ve 98.12 ± 2.27 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar MIP kriyojel disklerinin sitotoksik olmadığını düşünölebileceğini göstermektedir.
- Hücre canlılığı testlerinde 48. saatte, NIP ve PHEMA grubunda hücre canlılığı aynıdır. Kurkumin içermeyen, baskılanmamış kriyojel disklerin bu süre sonunda hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır. Ancak MIP'ların hücre canlılığı açısından %75-80 oranda MDA MB 231 meme kanser hücresine etki

ettiği görünmektedir. Canlı ve cansız hücreleri bir arada görüntülemek için kullanılan yöntemde AO/PI boya çifti kullanılmış ve kurkumin baskılanmış kriyojel diskler ile muamele edilen MDA MB 231 meme kanser hücrelerinde, baskılanmamış kriyojel disk ile muamele edilen hücrelere kıyasla 48 saatte canlılık azalmıştır.

- Antibakteriyel özelliğin incelenmesi için yapılan incelemede kurkumin içermeyen PHEMA ve NIP mebranların etrafında herhangi bir zon oluşumu gözlenmezken kurkumin yüklenmiş MIP disk etrafındaki zon oluşumu kurkuminin antibakteriyel özelliğine işaret etmektedir.
- Floresan ataçmanlı mikroskop altında yapılan görüntülemelerde kurkuminin floresan özelliği nedeniyle ışımaya yaptığı, yapıdaki kurkumin miktarı arttıkça da bu ışımaya arttığı gözlenmiştir.
- Salım kinetiği hesaplamalarında difüzyon üsteli olan n değeri genel olarak 0,5'ten büyük bulunmuş; bu doğrultuda salım mekanizmasının Fickian olmayan (non-Fickian) difüzyon olduğu sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] H. Wahid, S. Ahmad, M.A.M. Nor, M.A. Rashid, Fundamentals and applications of controlled release drug delivery, J. Siepmann, R. Siegel, M. Rathbone (Eds.), Springer, **2017**.
- [2] A. Indurkha, M. Patel, P. Sharma, S.N. Abed, A. Shnoudeh, R. Maheshwari, P.K. Deb, R.K. Tekade, Influence of Drug Properties and Routes of Drug Administration on the Design of Controlled Release System. Dosage form design considerations, R. Tekade (Ed.), Elsevier, **2018**, 179-223.
- [3] K. Çetin, H. Alkan, N. Bereli, A. Denizli, Molecularly imprinted cryogel as a pH-responsive delivery system for doxorubicin, J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem. 54 (**2017**) 502–508.
- [4] M. Andaç, I.Y. Galaev, A. Denizli, Affinity based and molecularly imprinted cryogels: Applications in biomacromolecule purification, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1021 (**2016**) 69–80.
- [5] A. Amalraj, A. Pius, S. Gopi, S. Gopi, Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review, J. Tradit. Complement. Med. 7 (**2017**) 205–233.
- [6] M. Caka, C. Türkcan, D. Aktaş Uygun, M. Uygun, S. Akgöl, A. Denizli, Controlled release of curcumin from poly(HEMA-MAPA) membrane, Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol. 45 (**2017**) 426–431.
- [7] H. Yavuz, K. Çetin, S. Akgönüllü, D. Battal, A. Denizli, Therapeutic protein and drug imprinted nanostructures as controlled delivery tools. Design and development of New Nanocarriers, A. Grumezescu (Ed.), Elsevier, **2018**, 439-473.
- [8] Y.H. Yun, B.K. Lee, K. Park, Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation, J. Control. Release. 219 (**2015**) 2–7.
- [9] X. Li, B. R. Jasti, Design of controlled release drug delivery systems, McGraw-Hill Professional, 1 **2005**.
- [10] M.W. Tibbitt, J.E. Dahlman, R. Langer, Emerging Frontiers in Drug Delivery, J. Am. Chem. Soc. 138 (**2016**) 704–717.

- [11] M. Ye, S. Kim, K. Park, Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles, *J. Control. Release.* 146 (2010) 241–260.
- [12] L. Heinemann, The failure of exubera: Are we beating a dead horse?, *J. Diabetes Sci. Technol.* 2 (2008) 518–529.
- [13] L. Acetate, L. Depot, H. Okada, Depot Injectable Microcapsules of Leuprorelin Acetate (Lupron Depot), in: M. Morishitai, K. Park (Eds.), *Biodrug Deliv. Syst. Fundam. Appl. Clin. Dev.*, 1st Editio (1995) 370–383.
- [14] T. Takagi, C. Ramachandran, M. Bermejo, A Provisional Biopharmaceutical Classification of the Top 200 Oral Drug Products in the United States, Great Britain, Spain, and Japan, 3 (2006) 631–643.
- [15] D. Hörter, J.B. Dressman, Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25 (1997) 3-14.
- [16] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications, *Int. J. Pharm.* 420 (2011) 1-10.
- [17] S. Sothvirat, C. McKelvey, J. Moser, B. Rege, W. Xu, D. Zhang, Development of amorphous solid dispersion formulations of a poorly water-soluble drug, MK-0364, *Int. J. Pharm.* 452 (2013) 73-81.
- [18] D. Cunliffe, A. Kirby, C. Alexander, Molecularly imprinted drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1836-1853.
- [19] R. Langer, Polymeric delivery systems for controlled drug release, *Chem. Eng. Commun.* 6 (1980) 1-48.
- [20] M. Bakhshpour, N. Idil, I. Perçin, A. Denizli, Biomedical applications of polymeric cryogels, *Appl. Sci.* 9 (2019) 1-22.
- [21] N.Y. Abu-Thabit, A.S.H. Makhlof, Historical development of drug delivery systems: From conventional macroscale to controlled, targeted, and responsive nanoscale systems, Elsevier Ltd., 2018.
- [22] A.K. Bajpai, S.K. Shukla, S. Bhanu, S. Kankane, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Prog. Polym. Sci.* 33 (2008) 1088-1118.
- [23] G. Majid Khan, J.B. Zhu, Studies on drug release kinetics from ibuprofen-

- carbomer hydrophilic matrix tablets: Influence of co-excipients on release rate of the drug, *J. Control. Release.* 57 (1999) 197–203.
- [24] P. Hiren, D.A. Raval, Madamwar, Bioactive polymers; synthesis, characterization, release and antimicrobial property of macro- molecular prodrug of ampicillin., *Indian J. Pharm. Sci.* (1997) 153–157.
- [25] S. Lu, K.S. Anseth, Release behavior of high molecular weight solutes from poly(ethylene glycol)-based degradable networks, *Macromolecules.* 33 (2000) 2509–2515.
- [26] R.K. Verma, D.M. Krishna, S. Garg, Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems, *J. Control. Release.* 79 (2002) 7–27.
- [27] N.A. Peppas, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, Modelling of drug diffusion through swellable polymeric systems, *J. Memb. Sci.* 7 (1980) 241–253.
- [28] S.K. Shukla, A.K. Bajpai, J. Bajpai, Shukla S, Bajpai AK, Bajpai J. Swelling controlled delivery of antibiotic from a hydrophilic macromolecular matrix with hydrophobic moieties. *Macromol. Res.* 11 (2003) 273–282.
- [29] G.W.R. Davidson, N.A. Peppas, Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. V. Relaxation-controlled transport in P(HEMA-co-MMA) copolymers, *J. Control. Release.* 3 (1986) 243–258.
- [30] R.A. Grinsted, L. Clark, J.L. Koenig, Study of Cyclic Sorption–Desorption into Poly(methyl methacrylate) Rods Using NMR Imaging, *Macromolecules.* 25 (1992) 1235–1241.
- [31] P.L. Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *J. Control. Release.* 5 (1987) 23–36.
- [32] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016).
- [33] C.S. Brazel, N.A. Peppas, Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers, *Polymer (Guildf).* 40 (1999) 3383–3398.
- [34] D. Hariharan, N.A. Peppas, Characterization, dynamic swelling behaviour and

- solute transport in cationic networks with applications to the development of swelling-controlled release systems, *Polymer (Guildf)*. 37 (1996) 149–161.
- [35] R. Langer, New methods of drug delivery, *Science (80-.)*. 249 (1990) 1527 LP – 1533.
- [36] Z. Li, J. Guan, Thermosensitive hydrogels for drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 8 (2011) 991–1007.
- [37] N. Nadeem, M. Sohail, M.H.H. Bin Asad, M.U. Minhas, Mudassir, S.A. Shah, Thermosensitive hydrogels: From bench to market, *Curr. Sci.* 114 (2018) 2256–2266.
- [38] L. Xi, T. Wang, F. Zhao, Q. Zheng, X. Li, J. Luo, J. Liu, D. Quan, J. Ge, Evaluation of an injectable thermosensitive hydrogel as drug delivery implant for ocular glaucoma surgery, *PLoS One*. 9 (2014) 1-12.
- [39] T. Traitel, J. Kost, pH-Responsive Hydrogels: Swelling Model. *Biomaterials*, N. Hasirci, V. Hasirci (Eds.), Springer US, Boston, MA, (2004) 29-43.
- [40] P. Sahu, S.K. Kashaw, S. Jain, S. Sau, A.K. Iyer, Assessment of penetration potential of pH responsive double walled biodegradable nanogels coated with eucalyptus oil for the controlled delivery of 5-fluorouracil: In vitro and ex vivo studies, *J. Control. Release*. 253 (2017) 122–136.
- [41] L. Lalu, V. Tambe, D. Pradhan, K. Nayak, S. Bagchi, R. Maheshwari, K. Kalia, R.K. Tekade, Novel nanosystems for the treatment of ocular inflammation: Current paradigms and future research directions, *Jurnal of Controlled Release*. 268 (2017) 19-39.
- [42] P.W.J. Morrison, N.N. Porfiryeva, S. Chahal, I.A. Salakhov, C. Lacourt, I.I. Semina, R.I. Moustafine, V. V. Khutoryanskiy, Crown Ethers: Novel Permeability Enhancers for Ocular Drug Delivery, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 3528–3538.
- [43] H. Chen, H. Pan, P. Li, H. Wang, X. Wang, W. Pan, Y. Yuan, The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 143 (2016) 455–462.
- [44] K. Cholkar, S.P. Patel, A.D. Vadlapudi, A.K. Mitra, Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 29 (2013) 106–123.

- [45] U.K. Sharma, A. Verma, S.K. Prajapati, H. Pandey, A.C. Pandey, In vitro, in vivo and pharmacokinetic assessment of amikacin sulphate laden polymeric nanoparticles meant for controlled ocular drug delivery, *Appl. Nanosci.* 5 (2015) 143–155.
- [46] P. Arora, S. Sharma, S. Garg, Permeability issues in nasal drug delivery, *Drug Discov. Today.* 7 (2002) 967–975.
- [47] M. Dahlin, E. Björk, Nasal administration of a physostigmine analogue (NXX-066) for Alzheimer's disease to rats, *Int. J. Pharm.* 212 (2001) 267–274.
- [48] M. Alagusundaram, B. Chengaiah, K. Gnanaprakash, S. Ramkanth, C.M. Chetty, An Overview on Nasal Drug Delivery System, *Int. J. Pharm. Res.* 13 (2020).
- [49] F. Kong, R.P. Singh, Disintegration of solid foods in human stomach, *J. Food Sci.* 73 (2008) 67–80.
- [50] G. Traverso, R. Langer, Special delivery for the gut, *Nature.* 519 (2015).
- [51] S.L. Tao, T.A. Desai, Gastrointestinal patch systems for oral drug delivery, *Drug Discov. Today.* 10 (2005) 909–915.
- [52] S. Eaimtrakarn, Y. V. Rama Prasad, S.P. Puthli, Y. Yoshikawa, N. Shibata, K. Takada, Possibility of a patch system as a new oral delivery system, *Int. J. Pharm.* 250 (2003) 111–117.
- [53] A. Dam, J. Major, P. Tasko, Buccal Drug Delivery, WO2005023226, 2005. https://patentscope.wipo.int/search/docs2/pct/WO2005023226/pdf/4sSEelA6Lf35N0iNMIpe5WWI7738j4hCeNsCcFD1XIfEiGm7GIKxo8EvuxFNokRWAt-Xepaasq2BZ0sdW79ZAK8_-AlIB-LFmWvaUc-e9_jnLudlO1JrrLpyaTdqmBTS?docId=id00000001829769 (Erişim Tarihi: 20 Haziran 2021) .
- [54] A. Azagury, L. Khoury, G. Enden, J. Kost, Ultrasound mediated transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 72 (2014) 127–143.
- [55] J. das Neves, R. Nunes, A. Machado, B. Sarmiento, Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 92 (2015) 53–70.
- [56] L. Wu, D.R. Janagam, T.D. Mandrell, J.R. Johnson, T.L. Lowe, Long-acting injectable hormonal dosage forms for contraception, *Pharm. Res.* 32 (2015)

2180–2191.

- [57] F. Notario-Pérez, A. Martín-Illana, R. Cazorla-Luna, R. Ruiz-Caro, L.M. Bedoya, A. Tamayo, J. Rubio, M.D. Veiga, Influence of chitosan swelling behaviour on controlled release of tenofovir from mucoadhesive vaginal systems for prevention of sexual transmission of HIV, *Mar. Drugs*. 15 (2017) 1–16.
- [58] L.W. Kleiner, J.C. Wright, Y. Wang, Evolution of implantable and insertable drug delivery systems, *J. Control. Release*. 181 (2014) 1–10.
- [59] B. Candy, L. Jones, P.J. Larkin, V. Vickerstaff, A. Tookman, P. Stone, Laxatives for the management of constipation in people receiving palliative care, *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015 (2015).
- [60] W.W. Muir, J.A.E. Hubbell, *Handbook of veterinary anesthesia*, Elsevier Health Sciences, 2014.
- [61] B.B. Aggarwal, Y.-J. Surh, S. Shishodia, *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, Springer US, 2007.
- [62] P. Scartezzini, E. Speroni, Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity, *J. Ethnopharmacol.* 71 (2000) 23–43.
- [63] S. Prasad, B.B. Aggarwal, Chapter 13, Turmeric, the Golden Spice From Traditional Medicine to Modern Medicine, in: *Herb. Med. Biomol. Clin. Asp.*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), 2011.
- [64] B.B. Aggarwal, I.D. Bhatt, H. Ichikawa, Curcumin — Biological and Medicinal Properties, *Turmeric*. (2020) 317–388.
- [65] V. Lampe, J. Milobedzka, Studien Uber Curcumin, *Ber Deut Chem Ges.* 46 (1913).
- [66] K.R. Srinivasan, A Chromatographic Study Of The Curcuminoids In *Curcuma Longa*, *J. Pharm. Pharmacol.* 5 (1953) 448–457.
- [67] A. Oppenheimer, Turmeric (Curcumin) In Biliary Diseases, *Lancet*. 229 (1937) 619–621.
- [68] R. Kuttan, P. Bhanumathy, K. Nirmala, M.C. George, Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*), *Cancer Lett.* 29 (1985) 197–202.
- [69] B.B. Aggarwal, A. Kumar, A.C. Bharti, Anticancer potential of curcumin:

- Preclinical and clinical studies, *Anticancer Res.* 23 (2003) 363–398.
- [70] S. Shome, A. Das Talukdar, M.D. Choudhury, M.K. Bhattacharya, H. Upadhyaya, Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective, *J. Pharm. Pharmacol.* 68 (2016) 1481–1500.
- [71] P. Anand, C. Sundaram, S. Jhurani, A.B. Kunnumakkara, B.B. Aggarwal, Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution, *Cancer Lett.* 267 (2008) 133–164.
- [72] J. Kruse, Curcumin und synthetische Derivate als umgebungssensitive Fluoreszenzsonden, *Dissertationsschrift.* (2003).
- [73] M. Gera, N. Sharma, M. Ghosh, D.L. Huynh, S.J. Lee, T. Min, T. Kwon, D.K. Jeong, Nanoformulations of curcumin: an emerging paradigm for improved remedial application, *Oncotarget.* 8 (2017) 66680–66698.
- [74] K.A. Jung, M.K. Kwak, The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants, *Molecules.* 15 (2010) 7266–7291.
- [75] J.D. Houghton, G.A.F. Hendry, *Natural Food Colorants*, 2nd ed., Springer, Boston, MA, 1996.
- [76] Y.J. Wang, M.H. Pan, A.L. Cheng, L.I. Lin, Y.S. Ho, C.Y. Hsieh, J.K. Lin, Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1997) 1867–1876.
- [77] K. Mahmood, K.M. Zia, M. Zuber, Z. i. H. Nazli, S. Rehman, F. Zia, Enhancement of bioactivity and bioavailability of curcumin with chitosan based materials, *Korean J. Chem. Eng.* 33 (2016) 3316–3329.
- [78] H.M. Wortelboer, M. Usta, J.J. Van Zanden, P.J. Van Bladeren, I.M.C.M. Rietjens, N.H.P. Cnubben, Inhibition of multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 by a series of α,β -unsaturated carbonyl compounds, *Biochem. Pharmacol.* 69 (2005) 1879–1890.
- [79] P. Basnet, N. Skalko-Basnet, Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment, *Molecules.* 16 (2011) 4567–4598.
- [80] P. Anand, S.G. Thomas, A.B. Kunnumakkara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, B. Sung, S.T. Tharakan, K. Misra, I.K. Priyadarsini, K.N. Rajasekharan, B.B.

- Aggarwal, Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature, *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1590–1611.
- [81] Y. Bei, The Holy Grail of Curcumin and its Efficacy in Various Diseases: Is Bioavailability Truly a Big Concern?, *Physiol. Behav.* 176 (2017) 139–148.
- [82] P. Anand, B. Sung, A.B. Kunnumakkara, K.N. Rajasekharan, B.B. Aggarwal, Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: role of Michael acceptors and Michael donors, *Biochem. Pharmacol.* 82 (2011) 1901—1909.
- [83] J.G. Devassy, I.D. Nwachukwu, P.J.H. Jones, Curcumin and cancer: Barriers to obtaining a health claim, *Nutr. Rev.* 73 (2015) 155–165.
- [84] P.N. Kelly, A. Dakic, J.M. Adams, S.L. Nutt, A. Strasser, Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells, *Science* (80-.). 317 (2007) 337.
- [85] S. Heavey, K.J. O’Byrne, K. Gately, Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC, *Cancer Treat. Rev.* 40 (2014) 445–456.
- [86] R.M.T. Mcfadden, C.B. Larmonier, K.W. Shehab, M. Midura-Kiela, R. Ramalingam, C.A. Harrison, D.G. Besselsen, J.H. Chase, J.G. Caporaso, C. Jobin, F.K. Ghishan, P.R. Kiela, The role of curcumin in modulating colonic microbiota during colitis and colon cancer prevention, *Inflamm. Bowel Dis.* 21 (2015) 2483–2494.
- [87] M. Ohno, A. Nishida, Y. Sugitani, K. Nishino, O. Inatomi, M. Sugimoto, M. Kawahara, A. Andoh, Nanoparticle curcumin ameliorates experimental colitis via modulation of gut microbiota and induction of regulatory T cells, *PLoS One.* 12 (2017) 1–16.
- [88] C.T. Peterson, A.R. Vaughn, V. Sharma, D. Chopra, P.J. Mills, S.N. Peterson, R.K. Sivamani, Effects of Turmeric and Curcumin Dietary Supplementation on Human Gut Microbiota: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study, *J. Evidence-Based Integr. Med.* 23 (2018) 1–8.
- [89] C. Selvam, S.L. Prabu, B.C. Jordan, Y. Purushothaman, A. Umamaheswari, M.S. Hosseini Zare, R. Thilagavathi, Molecular mechanisms of curcumin and its analogs in colon cancer prevention and treatment, *Life Sci.* 239 (2019) 117032.

- [90] H. Batra, S. Pawar, D. Bahl, Curcumin in combination with anti-cancer drugs: A nanomedicine review, *Pharmacol. Res.* 139 (2019) 91–105.
- [91] S.P. Singh, M. Sharma, P.K. Gupta, Cytotoxicity of curcumin silica nanoparticle complexes conjugated with hyaluronic acid on colon cancer cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 74 (2015) 162–170.
- [92] A.M. Alizadeh, M. Khaniki, S. Azizian, M.A. Mohaghheghi, M. Sadeghizadeh, F. Najafi, Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier-curcumin, *Eur. J. Pharmacol.* 689 (2012) 226–232.
- [93] M.J.D. Esmatabadi, B. Farhangi, Z. Safari, H. Kazerooni, H. Shirzad, F. Zolghadr, M. Sadeghizadeh, Dendrosomal curcumin inhibits metastatic potential of human SW480 colon cancer cells through down-regulation of claudin1, Zeb1 and Hef1-1 gene expression, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 16 (2015) 2473–2481.
- [94] B.N. Waghela, A. Sharma, S. Dhumale, S.M. Pandey, C. Pathak, Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells, *PLoS One.* 10 (2015).
- [95] K.-S. Park, S.-Y. Yoon, S.-H. Park, J.-H. Hwang, Anti-Migration and Anti-Invasion Effects of Curcumin via Suppression of Fascin Expression in Glioblastoma Cells, *Brain Tumor Res. Treat.* 7 (2019) 16.
- [96] M.C. Perry, M. Demeule, A. Régina, R. Moundjian, R. Béliveau, Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts, *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 1192–1201.
- [97] F.E. Parodi, D. Mao, T.L. Ennis, M.B. Pagano, R.W. Thompson, Oral administration of diferuloylmethane (curcumin) suppresses proinflammatory cytokines and destructive connective tissue remodeling in experimental abdominal aortic aneurysms, *Ann. Vasc. Surg.* 20 (2006) 360–368.
- [98] C. you Sun, S. shuang Qi, S. hong Sun, [Effect of curcumin on the learning, memory and hippocampal Ca⁺/CaMK II level in senescence-accelerated mice], *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 31 (2011) 376–380.
- [99] D. Coban, D. Milenkovic, A. Chanet, J. Khallou-Laschet, L. Sabbe, A. Palagani, W. Vanden Berghe, A. Mazur, C. Morand, Dietary curcumin inhibits

- atherosclerosis by affecting the expression of genes involved in leukocyte adhesion and transendothelial migration, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 1270–1281.
- [100] S. Zhang, J. Zou, P. Li, X. Zheng, D. Feng, Curcumin Protects against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mice by Inhibiting Toll-like Receptor 4 Expression, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 449–456.
- [101] J.F. Zhao, L.C. Ching, Y.C. Huang, C.Y. Chen, A.N. Chiang, Y.R. Kou, S.K. Shyue, T.S. Lee, Molecular mechanism of curcumin on the suppression of cholesterol accumulation in macrophage foam cells and atherosclerosis, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 691–701.
- [102] D. Hong, X. Zeng, W. Xu, J. Ma, Y. Tong, Y. Chen, Altered profiles of gene expression in curcumin-treated rats with experimentally induced myocardial infarction, *Pharmacol. Res.* 61 (2010) 142–148.
- [103] M.Y. Khorasani, H. Langari, S.B.T. Sany, M. Rezayi, A. Sahebkar, The role of curcumin and its derivatives in sensory applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 103 (2019) 109792.
- [104] R. Patil, P.R. Gangalum, S. Wagner, J. Portilla-Arias, H. Ding, A. Rekechenetskiy, B. Konda, S. Inoue, K.L. Black, J.Y. Ljubimova, E. Holler, Curcumin Targeted, Polymalic Acid-Based MRI Contrast Agent for the Detection of A β Plaques in Alzheimer's Disease, *Macromol. Biosci.* 15 (2015) 1212–1217.
- [105] D.P. Bhopate, P.G. Mahajan, K.M. Garadkar, G.B. Kolekar, S.R. Patil, A highly selective and sensitive single click novel fluorescent off-on sensor for copper and sulfide ions detection directly in aqueous solution using curcumin nanoparticles, *New J. Chem.* 39 (2015) 7086–7096.
- [106] A. Saithongdee, N. Praphairaksit, A. Imyim, Electrospun curcumin-loaded zein membrane for iron(III) ions sensing, *Sensors Actuators B Chem.* 202 (2014) 935–940.
- [107] S.A. Zaidi, Molecular imprinted polymers as drug delivery vehicles, *Drug Deliv.* 23 (2016) 2262–2271.
- [108] P. Öncel, K. Çetin, A.A. Topçu, H. Yavuz, A. Denizli, Molecularly imprinted

- cryogel membranes for mitomycin C delivery, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 28 (2017) 519–531.
- [109] J.K. Park, N. Shah, M. Ul-Islam, M. Haneef, A Brief Overview of Molecularly Imprinted Polymers: From Basics to Applications, *J. Pharm. Res.* 5 (2012) 3309–3317.
- [110] C. Algieri, E. Drioli, L. Guzzo, L. Donato, Bio-mimetic sensors based on molecularly imprinted membranes, 2014.
- [111] Y. Saylan, F. Yilmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, H. Yavuz, A. Denizli, Molecular imprinting of macromolecules for sensor applications, *Sensors (Switzerland)*. 17 (2017).
- [112] M.E. Byrne, K. Park, N.A. Peppas, Molecular imprinting within hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 (2002) 149–161.
- [113] M. Bakhshpour, E. Tamahkar, M. Andaç, A. Denizli, Surface imprinted bacterial cellulose nanofibers for hemoglobin purification, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 158 (2017) 453–459.
- [114] M. Bakhshpour, H. Yavuz, A. Denizli, Controlled release of mitomycin C from PHEMAH–Cu(II) cryogel membranes, *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* 46 (2018) 946–954.
- [115] R.A. Scott, N.A. Peppas, Compositional effects on network structure of highly cross-linked copolymers of PEG-containing multiacrylates with acrylic acid, *Macromolecules*. 32 (1999) 6139–6148.
- [116] J. Pan, W. Chen, Y. Ma, G. Pan, Molecularly imprinted polymers as receptor mimics for selective cell recognition, *Chem. Soc. Rev.* 47 (2018) 5574–5587.
- [117] W.B. Liechty, D.R. Kryscio, B. V. Slaughter, N.A. Peppas, Polymers for drug delivery systems, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 1 (2010) 149–173.
- [118] A.E. Bodoki, B.C. Iacob, E. Bodoki, Perspectives of molecularly imprinted polymer-based drug delivery systems in cancer therapy, *Polymers (Basel)*. 11 (2019).
- [119] K. Çetin, A. Denizli, 5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 126

- (2015) 401–406.
- [120] C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, Handbook of Molecularly Imprinted Polymers, Smithers Rapra: Shawbury, UK, **2013**.
- [121] N.A. Peppas, P. Bures, W. Leobandung, H. Ichikawa, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (**2000**) 27–46.
- [122] R. Narayanaswamy, V.P. Torchilin, Hydrogels and their applications in targeted drug delivery, *Molecules.* 24 (**2019**).
- [123] P. Gupta, K. Vermani, S. Garg, Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discov. Today.* 7 (**2002**) 569–579.
- [124] G. Chen, J. Li, Y. Cai, J. Zhan, J. Gao, M. Song, Y. Shi, Z. Yang, A glycyrrhetic acid-modified curcumin supramolecular hydrogel for liver tumor targeting therapy, *Sci. Rep.* 7 (**2017**) 1–8.
- [125] M. Zhai, F. Ma, J. Li, B. Wan, N. Yu, Preparation and properties of cryogel based on poly(hydroxypropyl methacrylate), *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 29 (**2018**) 1401–1425.
- [126] Y. Saylan, A. Denizli, Supermacroporous Composite Cryogels in Biomedical Applications, *Gels* 5 (**2019**) 20.
- [127] J. WANG, Q.M. WANG, L.L. TIAN, C. YANG, S.H. YU, C. YANG, Research Progress of the Molecularly Imprinted Cryogel, *Chinese J. Anal. Chem.* 43 (**2015**) 1777–1784.
- [128] A. Memic, T. Colombani, L.J. Eggermont, M. Rezaeeyazdi, J. Steingold, Z.J. Rogers, K.J. Navare, H.S. Mohammed, S.A. Bencherif, Latest Advances in Cryogel Technology for Biomedical Applications, *Adv. Ther.* 2 (**2019**) 1800114.
- [129] T.M.A. Henderson, K. Ladewig, D.N. Haylock, K.M. McLean, A.J. O’Connor, Cryogels for biomedical applications, *J. Mater. Chem. B.* 1 (**2013**) 2682–2695.
- [130] J. Wang, H. Yang, Superelastic and pH-Responsive Degradable Dendrimer Cryogels Prepared by Cryo-aza-Michael Addition Reaction, *Sci. Rep.* 8 (**2018**) 1–10.
- [131] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.* 6 (**2015**) 105–121.

- [132] N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang, Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 83–99.
- [133] F.M. Plieva, M. Karlsson, M.R. Aguilar, D. Gomez, S. Mikhalovsky, I.Y. Galaev', Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels, *Soft Matter*. 1 (2005) 303–309.
- [134] V.M. Gun'ko, I.N. Savina, S. V. Mikhalovsky, Cryogels: Morphological, structural and adsorption characterisation, *Adv. Colloid Interface Sci.* 187–188 (2013) 1–46.
- [135] Ö.B. Ünlüer, A. Ersöz, A. Denizli, R. Demirel, R. Say, Separation and purification of hyaluronic acid by embedded glucuronic acid imprinted polymers into cryogel, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 934 (2013) 46–52.
- [136] B. Garipcan, A. Denizli, A novel affinity support material for the separation of immunoglobulin G from human plasma, *Macromol. Biosci.* 2 (2002) 135–144.
- [137] M. Garcia-Alloza, L.A. Borrelli, A. Rozkalne, B.T. Hyman, B.J. Bacsikai, Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model, *J. Neurochem.* 102 (2007) 1095–1104.
- [138] M.Y. Khorasani, H. Langari, S.B.T. Sany, M. Rezayi, A. Sahebkar, The role of curcumin and its derivatives in sensory applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 103 (2019) 109792.
- [139] B. Singh, N. Chauhan, Preliminary evaluation of molecular imprinting of 5-fluorouracil within hydrogels for use as drug delivery systems, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1244–1254.
- [140] K. ÇetİN, Moleküler Baskılanmış Kriyojel Disklerden Florourasil Salınımı, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2013.