

**MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRİYOJEL DİSKLERDEN  
FLOROURASİL SALINIMI**

**FLUOROURACIL DELIVERY FROM MOLECULARLY  
IMPRINTED CRYOGEL DISKS**

**KEMAL ÇETİN**

**Prof. Dr. ADİL DENİZLİ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2013

**KEMAL ÇETİN**'in hazırladığı '**Moleküler Baskılanmış Kriyojel Disklerden Florourasil Salınımı**' adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI**' nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman)

(Prof. Dr. Adil DENİZLİ)

Üye

(Prof. Dr. Serap ŞENEL)

Üye

(Doç. Dr. Ali KARA)

Üye

(Doç. Dr. Handan YAVUZ)

Üye

(Doç. Dr. Lokman UZUN)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

01/08/2013

Kemal ÇETİN

## ÖZET

# MOLEKÜLER BASKILANMIŞ KRIYOJEL DİSKLERDEN FLOROURASİL SALINIMI

KEMAL ÇETİN

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ

Ağustos 2013, 93 sayfa

Kontrollü salım sistemleri, ilacı hedef bölgeye gönderirken ilaç dozunu azaltma, dozlama aralığını uzatma, yan etkileri minimuma indirme gibi üstün özelliklere sahiptir. Kontrollü salım sistemlerinde ilacın bölgesel implantasyon yöntemiyle hedef bölgeye iletilmesi doz miktarını ve yan etkileri azaltan önemli etkindir. Moleküler baskılama teknolojisi ile istenilen moleküle duyarlı polimerler sentezlenebilmektedir. Bu teknoloji ile ortam şartlarına duyarlı akıllı polimerlerin üretilmesinin sağlanması, kontrollü ilaç salımı alanında bu yönteme duyulan ilgiyi artırmaktadır. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan biyomalzemelerden birisi de kriyojellerdir. Kriyojeller, çözücünün donma sıcaklığı altında üretilen jel matrislerdir. Por yapıcı olarak toksik organik bileşikler içeren birçok polimerin aksine, kriyojellerde por yapıcı malzeme buz kristalleridir. Bundan başka, biyouyumluluk, esneklik ve yüksek mekanik kararlılığa sahip olma gibi avantajları sayesinde kontrollü salım için ideal taşıyıcı yapılardır.

Sunulan çalışmada, antineoplastik ilaç olan florourasilin *in vitro* ortamda salımını incelemek amacıyla, farklı çapraz bağlayıcı oranlarına ve farklı ilaç miktarlarına sahip florourasil baskılanmış kriyojel diskler hazırlanmıştır. Öncelikle fonksiyonel monomer olan MAH, (L)-histidin metil ester ve metakrilolil klorürün tepkimesinden sentezlenmiş, ardından  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları aracılığıyla, MAH ile FU'nun metal-şelat kompleksi oluşturulmuştur. MIP kriyojel diski hazırlamak için bu kompleks 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ile  $-16^{\circ}\text{C}$ 'da kopolimerize olmuştur. Kontrol grubu olarak PHEMA kriyojel diskleri de sentezlenmiştir. Kriyojel disklerin denge şişme oranları incelendiğinde çapraz bağlayıcı oranının artması ile şişme oranı azalmıştır. PHEMA'nın yüzey alanı  $10.5 \text{ m}^2/\text{g}$  iken  $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$  molce oranı 4, 8 ve 16 olan P(HEMA-MAH- $\text{Cu}^{2+}$ ) kriyojel disklerin yüzey alanları sırasıyla  $12.4 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $15.2 \text{ m}^2/\text{g}$  ve  $16.1 \text{ m}^2/\text{g}$  olarak bulunmuştur. Kriyojel disklerin yüzey ve yığın yapısı taramalı

elektron mikroskobu (SEM) ile tanımlanmıştır. FU'nun, boş P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojelin ve FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojelin, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve X-ışınları difraktrometresi (XRD) spektrumları incelendiğinde, ilacın aktivitesini kaybetmeden kriyojel matrikste homojen bir şekilde dağıldığı gözlenmiştir. Farklı özelliklere sahip kriyojel disklerden ilaç salım hızının çapraz bağlayıcı oranı, ortam pH'ı ve sıcaklığı, ilaç yükleme miktarı ve ilaç polimer etkileşimleri ile değiştiği gözlenmiştir. Molce üç farklı oranda çapraz bağlayıcı içeren ( $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}} = 4, 8, 16$ ) kriyojel diskler üretilmiştir. Ortam pH'ının, salım hızı ve salınan ilaç miktarı üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerden 4 değişik pH'da (4.0, 6.0, 7.4 ve 9.0'da) ilaç salımı incelenmiştir. Ortamın salıma etkisini incelemek için değerlendirilen bir diğer parametre de sıcaklıktır. Bu amaçla 37.0°C ve oda sıcaklığındaki ilaç salım davranışları incelenmiştir. Farklı miktarda ilaç yüklü kriyojel diskler üzerinde yapılan çalışmalardan polimerdeki ilaç yükleme oranı arttıkça salım hızının da arttığı gözlenmiştir. PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojellerdeki salım hızı karşılaştırıldığında PHEMA disklerden salımın çok daha hızlı olduğu görülmüştür. Bu durum moleküler baskılama esnasında ilaç ile destek malzemesi arasındaki tercih edilen etkileşimlerden dolayı olmaktadır. Güç yasasına göre salım mekanizmasının türünü gösteren "n" üsteli 0.5'den küçük bulunmuş, buradan hazırlanan kriyojel disklerde difüzyon mekanizmasının non-Fickian olduğu sonucuna varılmıştır. Rezervuara konulan kriyojel disklerden, burst etkisine bağlı olarak ilk dakikalarda yüksek salım hızlarında, ardından daha düşük hızlarda gerçekleşen salım davranışları ile yüksek oranlarda ilaç salımı gerçekleşmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kontrollü ilaç salım sistemleri, Moleküler baskılama, Kriyojel diskler, Metal iyon etkileşimleri, Florourasil.

## **ABSTRACT**

# **FLUOROURACIL DELIVERY FROM MOLECULARLY IMPRINTED CRYOGEL DISKS**

**KEMAL ÇETİN**

**Master of Science, Department of Chemistry**

**Supervisor: Prof. Dr. ADİL DENİZLİ**

**August 2013, 93 pages**

Controlled drug delivery systems have outstanding properties such as reducing the drug dose, prolongation of dosing interval and minimizing side effects while delivering the drug to the target area. Delivering of the drug via local implantation method is an important factor to reduce amount of dose and side effects in controlled drug delivery systems. Sensitive polymers to the desired molecule can be synthesized by molecular imprinting technology. The production of smart polymers which are the sensitive to the environmental conditions is increasing the interest in this method in the area of controlled drug delivery systems. One of biomaterials used in controlled release systems is cryogels. Cryogels are the gel matrices which are produced below the freezing temperature of the solvent. Unlike many polymers containing toxic organic compounds as porogen, it is ice crystals in cryogels. Furthermore, they are ideal delivery structures for the controlled drug delivery systems with the advantage of biocompatibility, flexibility and having high mechanical stability.

In this study, fluorouracil imprinted cryogel disks which have different cross-linking ratios and different amounts of drug were prepared in order to examine *in vitro* release of fluorouracil. Firstly, functional monomer MAH was synthesized by reaction of (L)-histidine methyl ester and methacryloyl chloride, and then metal-chelate complex of MAH and FU formed via  $\text{Cu}^{2+}$  ions. This complex was copolymerized with 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) at  $-16^{\circ}\text{C}$  to prepare MIP cryogel disks. PHEMA cryogel disks were also synthesized as control group. As the swelling equilibrium of cryogel disks was investigated, the swelling ratio was decreased with the increase of cross-linking ratios. While surface area of PHEMA

was 10.5 m<sup>2</sup>/g, P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) with molar ratio of  $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$  4, 8 and 16 had surface areas with the value of 12.4 m<sup>2</sup>/g, 15.2 m<sup>2</sup>/g and 16.1 m<sup>2</sup>/g, respectively. Surface and bulk structures of cryogel disks were identified with scanning electron microscopy (SEM). When differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray diffractometry (XRD) spectra of FU, P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) cryogel and FU loaded P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) cryogel were analyzed, it was observed that FU was homogeneously dispersed in the cryogel network with no loss of activity. It was examined that drug release rate from cryogel disks was changed with cross-linking ratios, medium pH and temperature, amount of loaded drug and interactions of drug with polymer. Cryogel disks having three different molar ratios of cross-linker with HEMA ( $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}} = 4, 8, 16$ ) were produced. Drug release from FU loaded P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) cryogel disks was examined in different pH values (4.0, 6.0, 7.4, and 9.0) in order to identify the impact of medium pH on release rate and amount of released drug. Another parameter which was evaluated to find out the effect of media on release of drug was temperature. For this purpose, release behavior was reported at 37.0°C and room temperature. It was observed that the more loaded amount of drug causes the faster drug release rate, by the studies with the different amount of drug-loaded cryogel disks. When the release rates of PHEMA and P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) cryogels were compared, it was found that PHEMA disks had much more faster release rate. It was because of the interactions preferred between the drug and the polymer support. According to the power-law, the power “n” which indicates the type of release mechanism was found smaller than 0.5 and thus it was deduced that the diffusion mechanism for the prepared cryogel disks was non-Fickian. High amount of drug was released from the cryogel disks placed in reservoirs. The high release rate was observed due to the burst effect at the beginning, and then it was held at lower rates.

**Keywords:** Controlled drug delivery systems, Molecular imprinting, Cryogel disks, Metal-ion attractions, Fluorouracil.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın yürütülmesi ve sonuçlandırılması için engin bilgi ve tecrübeleriyle desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, disiplinli çalışması ve yol göstericiliğiyle her zaman örnek alacağım kıymetli bilim insanı, tez danışmanım, çok değerli hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Her zaman güler yüzüyle pozitif enerji veren, bilimsel katkı ve desteği için değerli hocam Doç. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e,

Çalışmalarımda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen; fikirlerini ve bilgisini paylaştan ve yol gösteren, kıymetli hocam Doç. Dr. Lokman UZUN'a,

Her başım sıkıştığında yanına koştuğum; her zaman vermiş olduğu destek ve yardımların yanında katmış olduğu bilgi, fikir ve sevgisini daima hissettiren Dr. Deniz Türkmen'e,

Çalışmalarımda özveri ve disipliniyle çok büyük emeği olan, tecrübeleri ve desteğiyle hep yanımda olduğunu bildiğim Dr. Nilay Bereli'ye,

Bilgi ve fikirleriyle her zaman yanımda hissettiğim değerli hocam Serhat Gündüz'e,

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini çekinmeden paylaşan Bahar Ergün'e,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle, dostlukları ve destekleriyle hep yanımda olduklarını bildiğim sevgili arkadaşlarım Mehmet Emin Çorman ve Canan Armutcu'ya,

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım her zorluğu çözmeme yardımcı olan, kısa çay molalarımaya doyumsuz sohbetleriyle renk katan, dostluğunu hiçbir zaman kaybetmek istemeyeceğim canım sıra arkadaşım Fatma Kartal'a,

Çalışma ortamıma güzellik katan sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Fatma Yılmaz, Dr. Müge Andaç, Dr. Erkut Yılmaz, Dr. Veyis Karakoç, Dr. Daryoush Majidi, Dr. Engin Bayram, Recep Üzek, Tuğba Doğan, Gülsu Şener, Yeşeren Saylan, Ilgım Göktürk, Duygu Çimen, Gözde Baydemir Peşint, Işık Perçin, Ahmet Hamdi Demirçelik, Cemil Aydoğan, Sevgi Aslıyüce Çoban, Mehmet Lütfi Yola, Emel



Tamahkar, Erdoğan Özgür, Semra Akgönüllü, Ali Derazshamshir, Huma Shaik, Kıvılcım Çaktü Güler, Emir Alper Türkoğlu, Kazım Köse, İlker Koç, Aykut Arif Topçu, Esmâ Sarı, Gizem Ertürk, Kadir Erol ve diğer BİOREG üyelerine,

En başından başlayarak yaptığım işlerde, ilerlediğim yolda bana her zaman inanan ve güvenen; bir kez olsun beni yalnız bırakmayan, desteklerini sonsuz kez hissettiğim; onlar olmadan asla düşünemediğim bir dünya da, bana şu hayatta bu yolda vermiş oldukları emeklerinden ve bitmeyen sevgilerinden dolayı canımdan çok sevdiğim anneciğime, babacığma ve kardeşlerime,

Tüm kalbimle çok teşekkür ederim...

Kemal Çetin

Ankara, 2013

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	3
2.1.1. Salım Mekanizmasına Göre Kontrollü Salım Sistemleri.....	3
2.1.1.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler.....	5
2.1.1.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler.....	7
2.1.1.3. Şişme Kontrollü Sistemler.....	8
2.1.1.4. Ayarlanmış Sistemler.....	8
2.1.2. İlaç Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi.....	8
2.1.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Uygulama Yolları.....	11
2.2. Antineoplastikler.....	13
2.2.1. Florourasil.....	14
2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi.....	18
2.3.1. Moleküler Baskılama Yöntemleri.....	21
2.3.1.1. Kovalent Baskılama Yöntemi.....	22
2.3.1.2. Kovalent Olmayan Baskılama Yöntemi.....	22
2.3.1.3. Yarı-Kovalent Baskılama Yöntemi.....	22
2.3.1.4. Metal İyon Etkileşimleri ile Baskılama Yöntemi.....	23

2.4. Moleküler Baskılanmış Kontrollü İlaç Salım Sistemleri.....	24
2.5. Kriyojeller.....	25
2.5.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu.....	26
2.5.2. Kriyojellerin Genel Özellikleri.....	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Deneysel Malzemeler.....	30
3.2. N-Metakriloil-(L)-Histidin (MAH) Monomerinin Sentezlenmesi.....	30
3.3. MAH-Cu <sup>2+</sup> Kompleksinin Hazırlanması.....	31
3.4. MAH-Cu <sup>2+</sup> Kompleksinin Florourasil ile Örganizasyonu.....	31
3.5. Florourasil Baskılanmış Poli(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) Kriyojel Disklerin Hazırlanması.....	32
3.5.1. Kriyojel Disklere İlaç Yükleme Veriminin Hesaplanması.....	34
3.6. Florourasil Baskılanmış Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	35
3.6.1. FTIR ile Yapı Analizi.....	35
3.6.2. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	35
3.6.3. Denge Şişme Oranının Belirlenmesi.....	35
3.6.4. Yüzey Morfolojisi.....	36
3.6.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC).....	36
3.6.6. X-Işınları Difraktometresi (XRD).....	37
3.7. In vitro Florourasil Salım Çalışmaları.....	37
3.7.1. UV-Vis Spektrofotometre İle Salım Analizleri.....	37
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Florourasil Baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) Kriyojel Diskler.....	38
4.1.1. MAH-Cu <sup>2+</sup> /Florourasil Kompleksinin Karakterizasyonu.....	38
4.1.2. Florourasil Baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) Kriyojel Disklerin Karakterizasyonu.....	42
4.1.2.1. Yüzey Alanı Ölçümü.....	42
4.1.2.2. Şişme Deneyi.....	43

4.1.2.3. Yüzey Morfolojisi.....	44
4.1.2.4. FTIR ile Yapı Analizi.....	46
4.1.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC).....	46
4.1.2.6. X-Işınları Difraktrometresi (XRD).....	48
4.2. Salım Deneyleri ve Sonuçları.....	49
4.2.1. Çapraz Bağlama Miktarının Salıma Etkisi.....	49
4.2.2. pH Değişiminin Salıma Etkisi.....	51
4.2.3. Sıcaklığın Salıma Etkisi.....	52
4.2.4. İlaç Yükleme Miktarının Salıma Etkisi.....	53
4.2.5. Metal İyon Etkileşiminin Salıma Etkisi.....	53
4.2.6. Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi.....	55
5. YORUM.....	58
6. KAYNAKLAR.....	61
7. EKLER.....	68
ÖZGEÇMİŞ.....	76

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Plazmadaki ilaç derişiminin zamanla değişimi (MED: Minimum Etkili Derişim; MTD: Minimum Toksik Derişim).....	4
Şekil 2.2.	Difüzyon kontrollü ilaç salım sistemlerinin sınıflandırılması (Co başlangıç ilaç derişimi; Cs ilaç çözünürlüğü).....	6
Şekil 2.3.	Biyobozunur sistemden ilaç salımı ((a) yığın erozyonu, (b) yüzey erozyonu).....	7
Şekil 2.4.	Zincire takılı sistemden ilaç salımı.....	7
Şekil 2.5.	Hidrojel tabletin camsı ve elastiğimsi halleri.....	8
Şekil 2.6.	İlaç molekülünün korun tabası boyunca zig-zag çizerek ilerlemesi.....	12
Şekil 2.7.	Enjeksiyonda ilaç bütün vücuda yayılırken, bölgeye özel salımda yalnızca hedeflenmiş bölgede salım meydana gelir.....	13
Şekil 2.8.	Florourasilin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.9.	Florourasil sentezi.....	16
Şekil 2.10.	Florourasilin etki mekanizması.....	17
Şekil 2.11.	Genel moleküler baskılama işlem.....	19
Şekil 2.12.	Yarı-kovalent baskılama yöntemi.....	23
Şekil 2.13.	Metal kompleksi ile moleküler tanımlama, R = format, asetat, propionat.....	24
Şekil 2.14.	Kriyojellerin gözenekliliği.....	26
Şekil 2.15.	Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: (1) Donma; (2) Polimerleşme; (3) Erime.....	27
Şekil 2.16.	Kriyojelin zamanla oluşumu ve hacimin, gözenekliliğin ve gözeneklik büyüklüğünün zamana bağlı değişimi.....	28
Şekil 2.17.	Elastik yapıdaki kriyojeller uygulanan mekanik güç kaldırıldığında tekrar eski hallerini alırlar.....	29
Şekil 3.1.	MAH-Cu <sup>2+</sup> kompleksinin florourasil ile önorganizasyonu.....	32
Şekil 3.2.	Kriyojel disklerin hazırlanışının şematik gösterimi.....	33
Şekil 4.1.	N-Metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentez tepkimesi.....	38
Şekil 4.2.	MAH monomerinin sentez tepkime mekanizması.....	39

Şekil 4.3.	MAH monomerinin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	40
Şekil 4.4.	A. Florourasilin protonasyon ve deprotonasyon bölgeleri (N <sub>1</sub> ve N <sub>3</sub> ).....	40
Şekil 4.5.	B. MAH-Cu <sup>2+</sup> /florourasil kompleksinin öngörülen yapısı.....	41
Şekil 4.6.	FTIR spektrumları; (a) MAH monomeri, (b) FU, (c) MAH Cu <sup>2+</sup> /florourasil.....	42
Şekil 4.7.	PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojel disklerin optik fotoğrafları... 44	
Şekil 4.8.	Şekil 4.8. SEM fotoğrafları. (A) PHEMA kriyojel ve (B) florourasil baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojel.....	45
Şekil 4.9.	FTIR spektrumları; (a) P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ), (b) MAH-Cu <sup>2+</sup> /florourasil kompleksi yüklü P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ), (c) salım sonrası P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ).....	46
Şekil 4.10.	MAH-Cu <sup>2+</sup> /florourasil kompleksinin DSC termogramı.....	47
Şekil 4.11.	Y. DSC termogramları; (a) FU, (b) boş P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojel ve (c) FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojel.....	48
Şekil 4.12.	XRD desenleri; (a) boş P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ), (b) 50 µg/mL FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ), (c) 100 µg/mL FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ), (d) 200 µg/mL FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojeller ve (d) FU....	49
Şekil 4.13.	n <sub>HEMA</sub> /n <sub>MBAAm</sub> oranının toplam salıma etkisi (pH=7.4 PBS, T=37°C).....	50
Şekil 4.14.	pH'in toplam salıma etkisi (n <sub>HEMA</sub> /n <sub>MBAAm</sub> =4, T=37°C).....	51
Şekil 4.15.	Sıcaklığın toplam salıma etkisi (pH=7.4, n <sub>HEMA</sub> /n <sub>MBAAm</sub> =4).....	52
Şekil 4.16.	İlaç yükleme oranının toplam salıma etkisi ((pH=7.4 PBS, n <sub>HEMA</sub> /n <sub>MBAAm</sub> =4, T=37°C).....	53
Şekil 4.17.	Polimer türlerinin toplam salıma etkisi (pH=7.4 PBS, n <sub>HEMA</sub> /n <sub>MBAAm</sub> =4, T=37°C).....	54
Şekil 4.18.	Florourasilin PHEMA ile öngörülen kovalent olmayan etkileşimleri.....	55
Şekil 7.1.	Florourasilin UV kalibrasyon grafiği.....	68
Şekil 7.2.	Kompleks/Kalıp molekülün farklı miktarlardaki oranlarında absorpsiyon değerindeki değişimler.....	69
Şekil 7.3.	Salım üsteli n ve karakteristik jel sabiti değerlendirilmesi için çizilen grafik.....	75

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: İlaç salım mekanizmaları ve salım üstelinin aldığı değerler.....	11
Çizelge 2.2: Antineoplastik ilaçlar.....	15
Çizelge 3.1: Kompleks/Kalıp molekülün farklı miktarlardaki oranları.....	31
Çizelge 3.2: $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$ (mol) farklı miktarlardaki oranları.....	34
Çizelge 3.3: Farklı miktarlarda eklenen ilaç miktarları ( $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$ mol oranı 4).....	34
Çizelge 4.1: PHEMA ve farklı çapraz oranlarına sahip P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojel disklerin yüzey alanı.....	43
Çizelge 4.2: Farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojel diskler için denge şişme ve makrogözenek oranları.....	44
Çizelge 4.3: Tüm farklı polimerik sistemler için n, k ve R <sup>2</sup> değerleri.....	57
Çizelge 7.1: Kriyojel disklerin polimer verimini hesaplamada kullanılan değerler.....	70
Çizelge 7.2: Yıkama sonrası P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> ) kriyojeldisklerdeki toplam ilaç miktarı ve verimi.....	71
Çizelge 7.3: Moleküler baskılanmış kriyojel disklerden FU salımına ait veriler....	73
Çizelge 7.4: FU salım kinetiğine ait veriler.....	74

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

FU	Florourasil
MAH	N-metakriloil-(L)-histidin metil ester
MOPS	3-(N-morfolino)propansülfonik asit
MBAAm	N,N'-Metilen bisakrilamit
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
PHEMA	Polihidroksietil metakrilat
MED	Minimum etkili derişim
MTD	Minimum toksik derişim
MIP	Moleküler baskılanmış polimer
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
BET	Brunauer–Emmett–Teller yöntemi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
XRD	X-Işınları Difraktrometresi
PHEMA-4	Molce $n_{HEMA}/n_{MBAAm}=4$ içeren PHEMA
PHEMA-8	Molce $n_{HEMA}/n_{MBAAm}=8$ içeren PHEMA
PHEMA-16	Molce $n_{HEMA}/n_{MBAAm}=16$ içeren PHEMA
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-4	Molce $n_{HEMA}/n_{MBAAm}=4$ içeren P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-8	Molce $n_{HEMA}/n_{MBAAm}=8$ içeren P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-16	Molce $n_{HEMA}/n_{MBAAm}=16$ içeren P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )



# 1. GİRİŞ

İlaç ile ilgili araştırmalarda, yeni bir etken madde sentezlemek önemli olduğu kadar, o etken maddenin hedef bölgeye optimum şartlarda ulaştırılmasını sağlayacak sistemlerin geliştirilmesi de çok önemlidir. Kolay kullanım, etken maddenin yapısını bozacak şekilde etken maddeyle etkileşime girmemek, minimum toksisiteye sahip olup biyoyumlu ve biyobozunur olmak, kolaylıkla üretilmek ve uzun raf ömrüne sahip olmak ilaç taşıyıcı sistemlerden beklenen özelliklerdendir [1, 2]. Kontrollü salım sistemleri bu ihtiyaçları karşılamaya yönelik geliştirilen sistemlerdendir. Bu sistemlerde, etkin madde istenen doku veya organa taşınarak en kısa zamanda istenen kan derişimini sağlamak ve bu derişimi öngörülen zaman aralığında devam ettirmek amaçlanmaktadır [3].

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin çeşitli uygulama yolları vardır. Bunlardan birisi ilacın bölgesel olarak implantasyonudur [4]. Kontrollü salım yapan dozaj formunun implant olarak tasarlanması ile ilaç bütün kan dolaşımında bulunmayıp sadece tümörün bulunduğu yere etki eder. Böylelikle oral yoldan veya enjeksiyondan kaynaklanan yan etkiler implant sistemler ile azaltılır. Öte yandan oral yolla verilifte karşılaşılan etkin maddenin gastrointestinal sistemden etkilenmesi ve dozaj formunun burada sınırlı bir süre tutulabilmesinden kaynaklanan dezavantajlar da giderilmiş olmaktadır [5].

Moleküler baskılama teknolojisi, doğal ya da sentetik bir bileşikten oluşan kalıp moleküle özgün tanıma bölgelerine sahip akıllı polimerik sistemler oluşurma yöntemidir. Bu yöntemde kalıp molekül ile polimeri oluşturan fonksiyonel monomer arasında kovalent bağlar [6], kovalent olmayan etkileşimler [7], veya hem kovalent hem de kovalent olmayan etkileşimler oluşur [8]. Öte yandan metal iyon etkileşimleri de moleküler baskılama da başvurulan etkileşimlerdendir [9]. Moleküler baskılanmış polimerlerin, dış etkilere karşı fiziksel ve kimyasal kararlılığının yüksek olması, geri besleme kontrol mekanizmasına sahip olmaları, kalıp moleküle özgü üç boyutlu oyukları sayesinde enantiyo seçici olmaları sebebiyle bu akıllı polimerler kontrollü ilaç salım sistemleri için oldukça avantajlı malzemelerdir.

Kontrollü salım sistemlerini hazırlamakta kullanılan biyomalzemeler, doğal veya sentetik olarak elde edilebilen polimerik sistemlerdir ve her geçen gün çeşitleri artmaktadır. Bu sistemlerden birisi de hidrojellerin bir türevi olan kriyollerdir.

Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileri kullanılarak hazırlanan üç boyutlu, ağ yapılı ve çapraz bağlı jel matriksleridir. Kriyojel sistemler süpermakrogözenekli yapıları sayesinde birçok çalışmada kromatografik malzeme olarak kullanılmıştır [10]. Kriyojeller, yüksek hidrofilitiklik, suda çözünmeden önemli ölçüde şişebilme, biyouyumluluk, esneklik ve yüksek mekanik kararlılığa sahip olma gibi birçok avantajlarıyla kontrollü ilaç salım sistemleri için iyi bir alternatif malzemedir.

Florourasil, urasil antimetaboliti olarak etki eden pirimidin analogu bir antineoplastik ajandır. Florourasil (FU) hücre içinde üç ana metabolite dönüşür. Florourasilin aktif metabolitleri RNA sentezini bozar, nükleotid sentetik enzim olan timidilat sentezinin etkinliğini inhibe eder ve doğrudan DNA'ya katılarak DNA hasarına neden olur. Florourasil kolon, mide, pankreas, meme kanserlerinin tedavisinde kullanılırken mesane, serviks, prostat, karaciğer baş, boyun ve cilt kanserlerine de yararlı olduğu düşünülmektedir [11-14].

Sunulan tez çalışması kapsamında, farklı çapraz bağlayıcı oranlarına ve farklı ilaç miktarlarına sahip florourasil baskılanmış PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin hazırlanması ve bu disklerin *in vitro* koşullarda salım çalışmaları incelenmiştir. Fonksiyonel monomer olarak amino asit türevi olan N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeri, metal şelat yöntemi ile bakır(II) aracılığıyla kalıp molekül olan florourasil ile kompleks oluşturmuştur. Polimerik sistemler kriyopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Farklı çapraz bağlayıcı ve ilaç miktarlarına sahip bu disklerin salım davranışları incelenmesi amacıyla farklı pH ve sıcaklıklarda salım kinetiği yorumlanmıştır. MAH-Cu<sup>2+</sup>/FU kompleksinin salım kinetiğine etkisini incelemek amacıyla P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel diskleri ile PHEMA disklerin salım davranışları karşılaştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

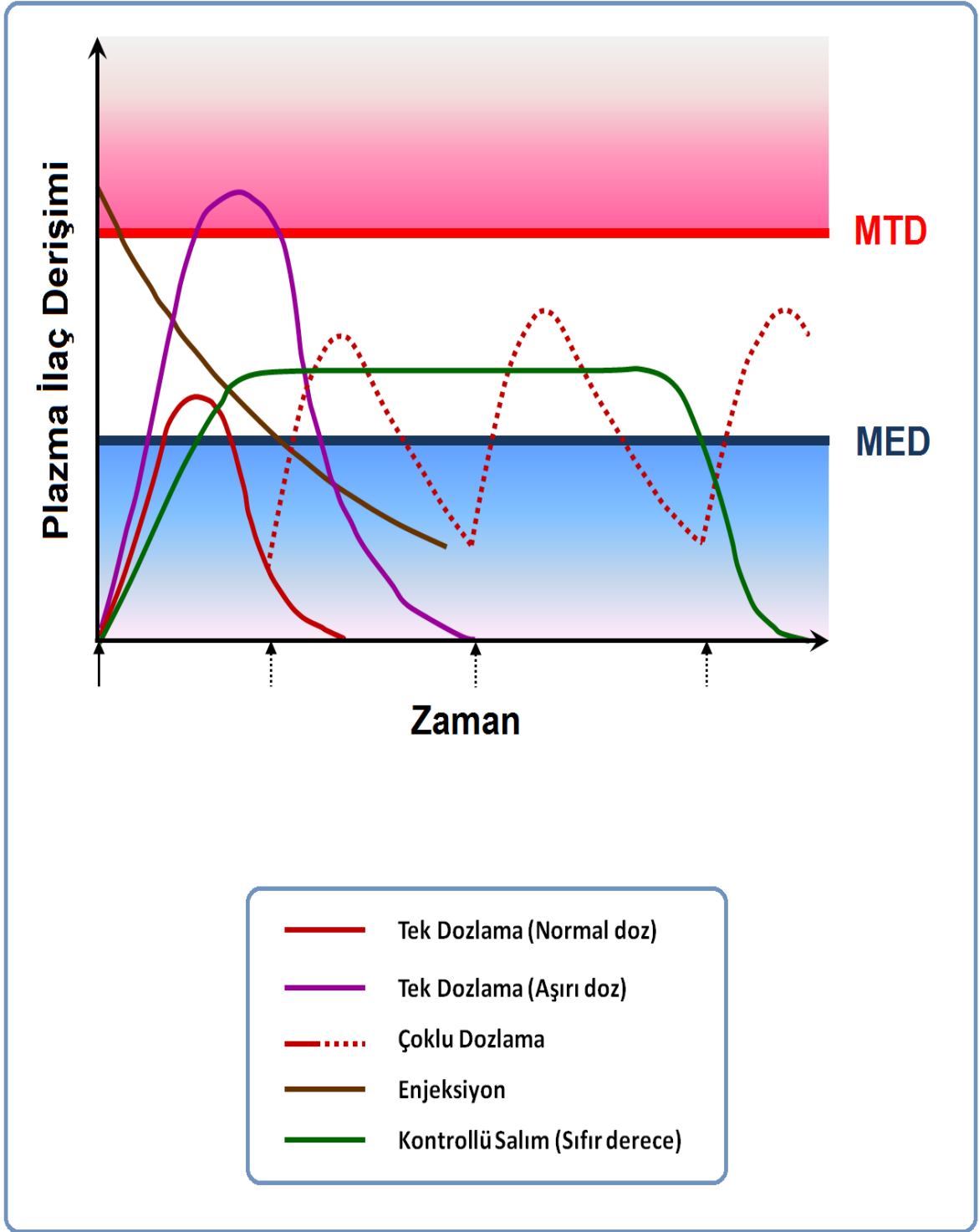
İlaç ile ilgili araştırmalarda, hastalıkların tedavisi için yeni moleküller geliştirmek kadar bu ilaçların hastalara verilif şekilleri de önemlidir. Son yıllarda ilaç dozunu minimuma indirmek, dozlama periyodunu uzatmak, hastanın yan etkilerden etkilenmemesini sağlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların başında kontrollü ilaç salım sistemleri gelmektedir [15]. Kontrollü salım sistemleri, ilaçları istenilen dozlama aralıklarında hedef dokuya vermeye dayanan etkin bir tedavi yöntemi sunmaktadır [16].

İlaç kana karıştıktan sonra, kandaki etken madde seviyesi etkili olduğu plazma aralığında (terapötik pencere) kalmalıdır. Geleneksel yöntemlerde, ilaç belli aralıklarda tablet ya da kapsül şeklinde oral yolla alınır veya enjeksiyon yoluyla doğrudan kana verilir. Bu tarz yöntemlerde minimum etkili derişim (MED) ile minimum toksik derişim (MTD) değerleri arasında dalgalanmalar oluşmaktadır ve her çıkış–inişten sonra, tekrar yüksek dozda ilaç almak gerekmektedir. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde ise ilacın terapötik pencere aralığında uzun bir periyot boyunca salımı gerçekteşebilmektedir.

#### 2.1.1. Salım mekanizmasına göre kontrollü salım sistemleri

İlaçların polimer sistemlerinden salımı için dört genel yöntem bulunmaktadır:

1. Difüzyon kontrollü sistemler
  - a. Rezervuar (zarlı) sistemler
  - b. Matriks (monolitik) sistemler
2. Kimyasal kontrollü sistemler
  - a. Biyobozunur sistemler
  - b. Zincire takılı sistemler
3. Şişme kontrollü sistemler
4. Ayarlanmış sistemler

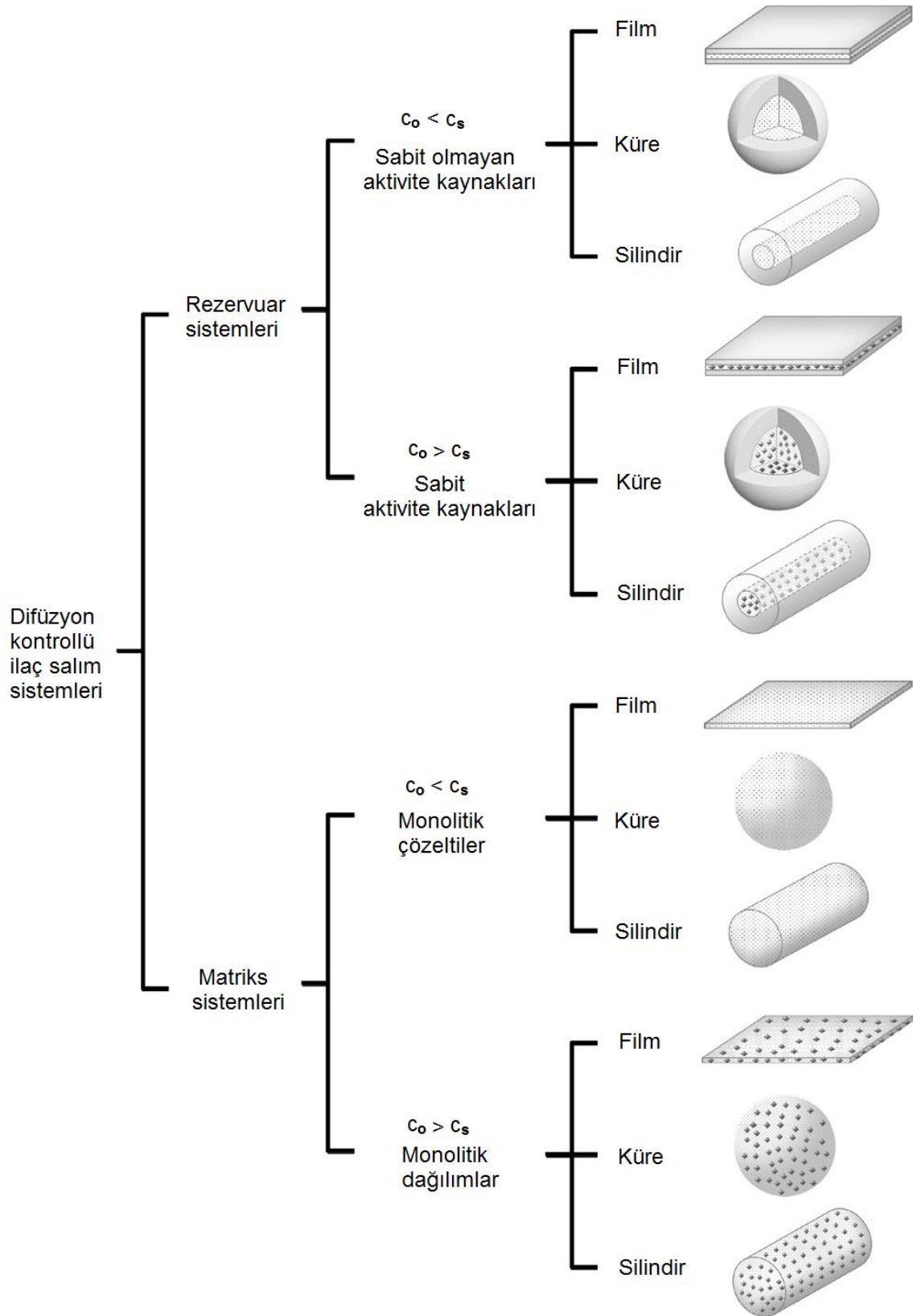


Şekil 2.1. Plazmadaki ilaç derişiminin zamanla değişimi (MED: Minimum Etkili Derişim; MTD: Minimum Toksik Derişim).

### 2.1.1.1. Difüzyon Kontrollü Sistemler

Difüzyon, ilaç salımını kontrol etmek için kullanılan en yaygın yöntemdir. Elde edilen salım kinetikleri dozaj formunun boyutuna ve şekline bağlıdır. Sistemin boyutlarının ve geometrisinin ayarlanması ile istenen salım profilleri elde edilebilir [17].

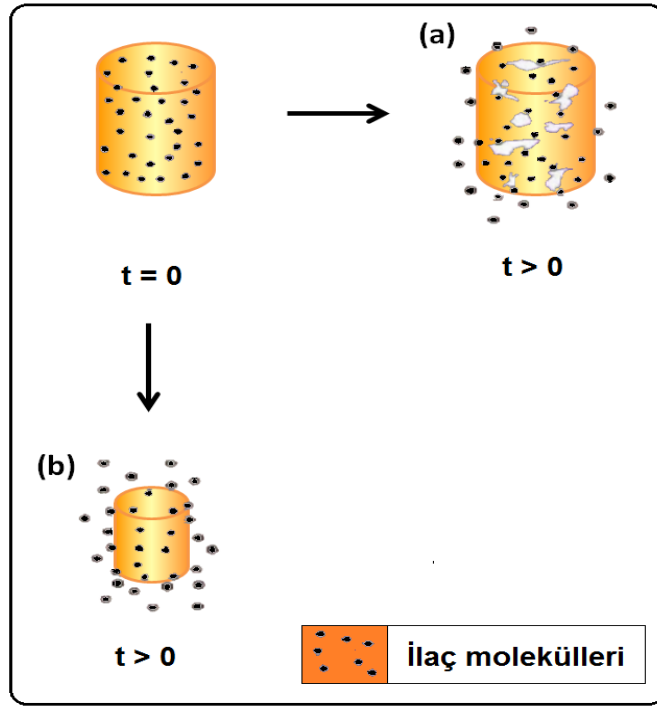
Difüzyon kontrollü sistemler, rezervuar (zarlı) ve matriks (monolitik) olmak üzere iki grupta incelenebilir. Rezervuar sistemlerde ilaç polimerik bir zarla çevrili konumdadır. Bu sistemlerde ilaç salımı zardan difüzyonla gerçekleşir. Bu sebeple ilacın difüzyon hızı zarın türü ve kalınlığı ile kontrol edilir [18]. İlaç parçacıklarının çevrelemesi gereken difüzyonun mesafesi ile salım sabit tutulur. Böylelikle rezervuar sistemlerde salım sıfırinci derece salım kinetiğiyle gerçekleşir. Bir diğer difüzyon kontrollü sistem olan matriks (monolitik) sistemlerde ilaç polimer içinde çözünmüş veya dağılmış şekildedir. Hazırlanması rezervuar sistemlere göre daha kolay olan matriks sistemlerinde en büyük dezavantaj ilacın salım hızının zamanla azalmasıdır (birinci dereceden salım davranışı). Bunun sebebi salım devam ettikçe artan difüzyon mesafesidir [19]. Şekil 2.2'de (i) sistemin iç yapısına göre; (ii) (ilaç çözünürlüğüyle bağlantılı olarak) başlangıç ilaç içeriğine göre; (iii) geometrik yapıya göre difüzyon kontrollü ilaç salım sistemlerinin sınıflandırılmıştır. Küçük noktacıklar çözünmüş ilaç moleküllerini gösterirken, büyük noktalar çözünmemiş ilaç parçacıklarını temsil ediyor. [20].



Şekil 2.2. Difüzyon kontrollü ilaç salım sistemlerinin sınıflandırılması ( $C_0$  başlangıç ilaç derişimi;  $C_s$  ilaç çözünürlüğü)

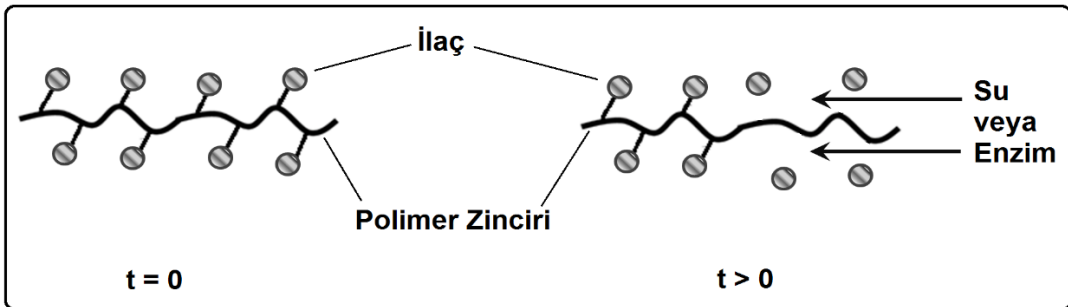
### 2.1.1.2. Kimyasal Kontrollü Sistemler

Kimyasal kontrollü sistemler biyobozunur sistemler ve zincire takılı sistemler olmak üzere temel olarak ikiye ayrılırlar. Biyobozunur sistemlerde, asit veya baz hidrolizi, enzimatik etki veya oksidasyon ile polimer zamanla aşınır. Polimer aşındıkça, ilaç salımı gerçekleşir. Bu sistemlerde polimerin zamanla aşınması sebebiyle cerrahi müdahaleye gerek kalmadan vücuttan atılması bir avantajdır. Ancak parçalanma ürünleri toksik veya kanserojen madde içermemelidir [19].



Şekil 2.3. Biyobozunur sistemden ilaç salımı ((a) yığın erozyonu, (b) yüzey erozyonu).

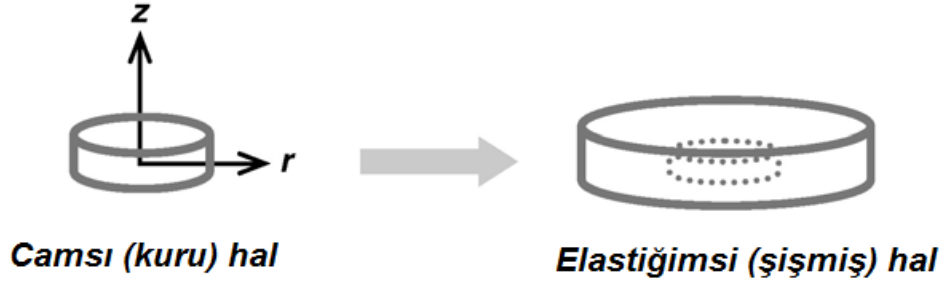
Zincire takılı sistemlerde, ilaç polimer ağına parçalanabilir kovalent bağlarla bağlıdır. Bağların parçalanması hidrolitik veya enzimatik yolla olur ve ilaç salımı bu kovalent bağların parçalanma hızı ile kontrol edilir [21].



Şekil 2.4. Zincire takılı sistemden ilaç salımı.

### 2.1.1.3. Şişme Kontrollü Sistemler

Şişebilen polimerlerden ilaç salımı, çözücünün polimer matrisine girmesi sonucu polimerin camsı-elastiğimsi geçişi esasına dayanır [22]. Çözücü polimer yapısına girdiği anda polimer şişerek camsı geçiş sıcaklığı düşer. Böylelikle camsı haldeki polimerik yapı elastiğimsi hale geçer ve ilaç salımı başlar.



Şekil 2.5. Hidrojel tabletin camsı ve elastiğimsi halleri [21].

### 2.1.1.4. Ayarlanmış Sistemler

Ayarlanmış sistemler substrat-duyarlı ya da sıcaklık, pH, iyonik güç, elektriksel alan ve UV ışığı gibi çevre-duyarlı olarak tasarlanabilirler. Bu sistemlerde genel olarak akıllı polimerik jeller kullanılmaktadır [19].

## 2.1.2. İlaç Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

### Higuchi eşitliği

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde, çözücünün polimerik matrisse difüzyonuyla birlikte, polimerik matristen ilaç salımı çeşitli mekanizmalara göre gerçekleşir. Bu mekanizmaları açıklayan çeşitli matematiksel modeller geliştirilmiştir. Higuchi ve çalışma arkadaşlarının 1961 yılında yayımladığı eşitlik bu modellerden birisidir [23]. Bu eşitlik başta sadece düzlemsel sistemler için geçerli iken, daha sonra gözenekli yapılar dahil olmak üzere farklı geometri ve matris özellikleri dikkate alınarak değiştirilmiş ve genişletilmiştir.

Higuchi modelinde,  $c_0 > c_s$  olduğu durumda temel eşitlik:

$$\frac{M_t}{A} = \sqrt{D(2c_0 - c_s)c_s t} \quad (2.1.)$$



$M_t$ : t zamanındaki toplam salım miktarı  
A: salım ortamına dik olan sistemin alanı  
D: polimerdeki ilaç difüzyon katsayısı  
 $c_0$ : başlangıç ilaç derişimi  
 $c_s$ : ilacın polimer içerisindeki çözünürlüğü  
“Eşitlik 2.1.”, şu şekilde de ifade edilebilir:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \sqrt{t} \quad (2.2.)$$

$M_\infty$ : denge anındaki toplam salım miktarı  
K: dizayn değişkenlerini yansıtan sabiti

Higuchi eşitliğini uygulamak için şu varsayımlar yapılmaktadır [24]:

- I. sistemdeki başlangıç ilaç derişimi, polimer içerisindeki çözünürlüğünden yüksektir,
- II. difüzyon tek yönlü olmaktadır,
- III. polimerin şişme ve bozunması ihmal edilmektedir,
- IV. ilacın difüzyonu sabittir,
- V. sistemin mükemmel çanak şartlarında (sink conditions) olduğu varsayılmaktadır.

### **İnce film şeklindeki sistemlerden Fickian difüzyonal salım**

L kalınlığındaki ince hidrofobik ya da hidrofilik polimer matrisinden x yönündeki difüzyonal salım

$$t = 0 \quad -L/2 < x < L/2 \quad c = c_0$$

$$t > 0 \quad x = \pm L/2 \quad c = 0$$

durumları gözönünde bulundurularak şu eşitlik ile belirtilir:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (2.3.)$$

Bu eşitlik şu şekilde yazılabilir [24]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left( \frac{Dt}{L^2} \right)^{1/2} \left( \frac{1}{\pi^{1/2}} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \operatorname{ierfc} \frac{nL}{2\sqrt{Dt}} \right) \quad (2.4.)$$

$M_t$ : t zamanındaki toplam salım miktarı

$M_\infty$ , denge anındaki toplam salım miktarı

D: polimerdeki ilaç difüzyon katsayısı

L: film kalınlığı

t: zaman

n: değişken

“Eşitlik 2.4.”de ikinci parantez içindeki terimler, kısa zaman yaklaşımı yapıldığı ve  $M_t/M_\infty \leq 0.60$  olduğu durumlarda ihmal edilebilir ve “Eşitlik 2.5.”de görüldüğü gibi sadeleşir:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \left( \frac{Dt}{\pi L^2} \right)^{1/2} \quad (2.5.)$$

### **Şişebilen sistemlerden ilaç salımı**

Şişebilen sistemlerde salım genellikle Higuchi ya da Fickian davranışı ile uyuşmayan şartlar altında gerçekleşir. Difüzyon kontrollü ve şişme-rahatlamalı kontrollü ilaç salımı için aşağıdaki eşitlik yazılabilir [23]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \sqrt{t} + k_2 t \quad (2.6.)$$

“Eşitlik 2.6.”da;  $k_1$ ,  $k_2$  ve m sabitleri ifade etmektedir. Eşitliğin sağındaki ilk terim Fickian difüzyonu (F), ikinci terim ise Case-II transportu (R) ifade etmektedir. Bu eşitlik daha genel bir ifadeyle şu şekilde yazılabilir [23]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2.7.)$$

Bu eşitlikte;  $M_t$ , t zamanındaki toplam salım miktarını;  $M_\infty$ , dengeye ulaştığı zamandaki toplam salım miktarını; k, sistemin geometrik karakteristikleri ile ilgili sabiti; n, ilaç salım mekanizmasını belirten salım üstelini ifade etmektedir.

Güç yasası olarak adlandırılan bu eşitlik ilk olarak 1985 senesinde Peppas ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [25]. Bu yüzden “Peppas eşitliği” olarak da bilinir. Peppas eşitliği ilk % 60’lık salım için geçerlidir.

Çizelge 2.1. İlaç salım mekanizmaları ve salım üstelinin aldığı değerler.

Salım üsteli, n			İlaç salım mekanizması
İnce film	Silindir	Küre	
0.5	0.45	0.43	Fickian difüzyon
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Anomalous transport
1.0	0.89	0.85	Case-II transport

### 2.1.3. Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Uygulama Yolları

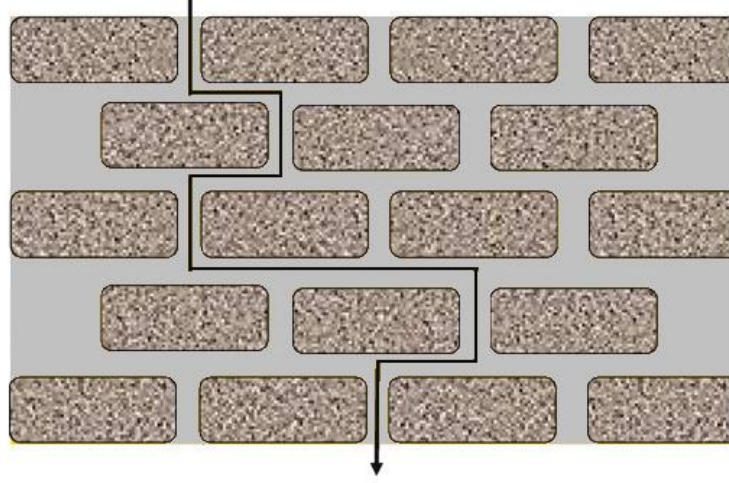
İlacın moleküler yapısına, salım sisteminin yöntemine, dozlama aralığına, maliyete ve hastanın durumuna göre çok çeşitli kontrollü salım uygulamaları bulunmaktadır [26]. İlacın verilmiş yolu terapötik sonucu doğrudan etkilemektedir.

**Oral Yol:** Ağızdan yutma şeklinde alınan ilaç sistemleri en sık kullanılan sistemlerdir. Midenin asidik ortamında çözünmeden ince bağırsağa ulaşabilen ve burada yüksek pH ortamında çözünen emülsiyonlar, süspansiyonlar ya da kaplamalar gibi ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiş bulunuyor [27].

**Parenteral Yol:** Ağızdan kullanımın daha uygun bir yol olacağına bilinmesine rağmen protein ve peptit gibi büyük moleküller içeren ilaçların oral yolla taşınımı henüz çözülememiş bir problemdir. En önemli sorun, proteinlerin midedeki gastrik enzimler ve incebağırsaktaki pankreatik enzimler tarafından sindirilmesidir. Bu tür ilaçlar genelde damar içi (intravenöz, i.v.), deri altı (subkütan, s.c.), kas içi (intramusküler, i.m.) ve karıncık içi (intraventriküler) yollarla kullanılmaktadır [28].

**Transdermal Yol:** Bazı ilaçların oral yolla emilimi düşüktür veya mide–bağırsak kanalında tahriş edici davranış gösterirler. Cildin kolayca erişilebilir ve geniş bir

yüzey alanına sahip olması bu tür ilaçların taşınımında, etkili bir yöntem olmuştur. Transdermal yolda lipofilik ilaçlar ölü hücrelerden oluşan korun tabakasını geçerek ilerler [29].



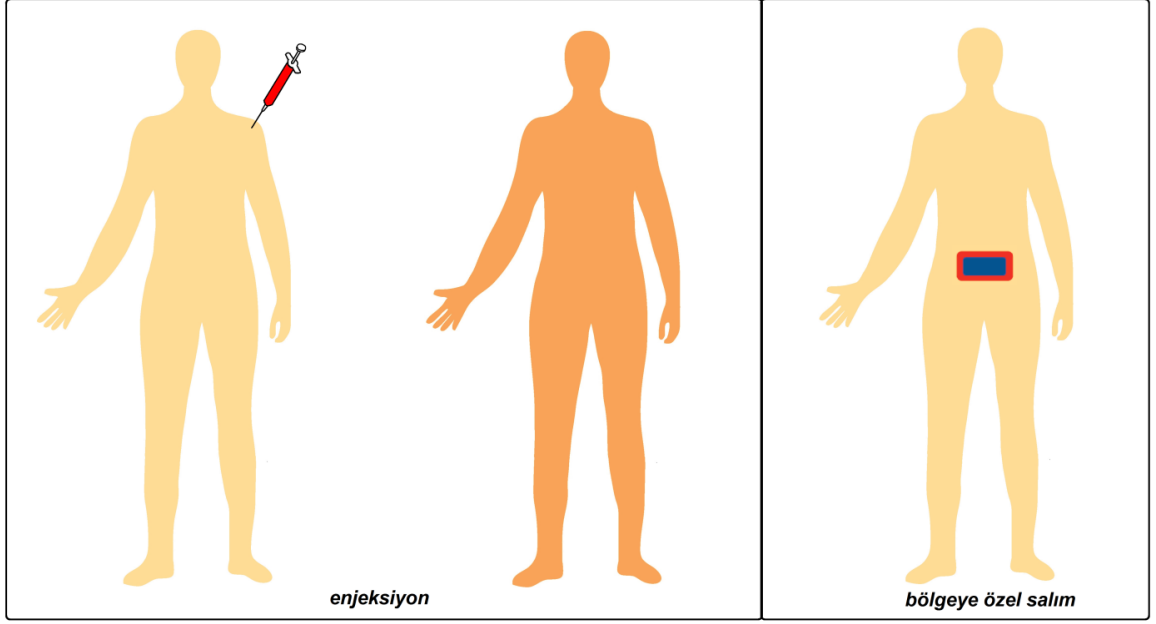
Şekil 2.6. İlaç molekülünün korun tabası boyunca zig-zag çizerek ilerlemesi [29].

**Pulmoner Yol:** Pulmoner yol, akciğerler aracılığıyla ilaç verme şeklidir. Bu sistemde ilaç ağız veya burundan püskürtme yolu ile uygulanır.

**Rektal Yol:** Anüs yoluyla kalın bağırsağın en alt bölgesine uygulanan bir sistemdir.

**Oküler Yol:** Polimerik sistemin gözün kenarına veya korneası üzerine yerleştirilmesi şeklinde uygulanan bir sistemdir. Oküler kontrollü salım sistemlerinde nanopartiküller, nanomiseller, lipozomlar ve mikroemülsiyonlar gibi çok çeşitli dozaj formları kullanılabilir [30]. Bu sistemin en önemli avantajı ilacın uzun süre kontrollü bir şekilde verilerek bölgesel etki sağlanabilmesidir.

**İmplant Sistemler:** Gelişen teknoloji ile tıp alanında artan beklentiler doğrultusunda uzun süreli bölgesel veya sistemik etki veya tedavi istenen uygulamalarda, dozaj formlarının kontrollü salım sağlayan sistemler olarak, özellikle de implant formunda tasarlanması önem kazanmıştır [31]. İmplant olarak tasarlanma ile karaciğerden ilk geçiş etkisine uğrayan etkin maddelerin kaybının önlenmesi, yan etkilerinin azaltılması gibi avantajlar ve oral yolla verilişte karşılaşılan gastrointestinal sistemden etkilenme ve burada sınırlı bir süre tutulabilmeden kaynaklanan dezavantajlar, klasik dozaj formlarının neden olduğu kan seviyelerindeki dalgalanmalar ve buna bağlı dezavantajlar da giderilmiş olmaktadır [5].



Şekil 2.7. Enjeksiyonda ilaç bütün vücuda yayılırken, bölgeye özel salımda yalnızca hedeflenmiş bölgede salım meydana gelir.

## 2.2. Antineoplastikler

Kanser, vücut dokusunun yapı ve normal fonksiyonun bozulmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır. Vücuttaki hücrelerin büyümesi ve çoğalması normalde bir düzen içerisinde olmaktadır. Ancak kanserde bir hücre grubunun farklılaşarak, aşırı ve kontrolsüz şekilde çoğalması ve diğer doku ve organlara yayılması (metastaz) söz konusudur. Kanserın çoğalan hücrenin kaynağına, tipine (karsinom, sarkom, lösemi ve lenfoma gibi) ve oluştuğu organa göre (akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri gibi) çeşitli şekilleri vardır. Kanser tedavisi cerrahi müdahale, radyasyon, immünoterapi ve kemoterapiyi içerir.

Kemoterapi, antineoplastik ilaçların kullanılmasıyla uygulanan bir tedavi şeklidir. Antineoplastik ilaçlar altı grupta incelenebilir [32]:

**Antimetabolitler:** Yapısal olarak folik asit, pirimidin, pürin gibi normal hücre bileşenlerine benzerler ve onların yerini alarak kanser hücrelerinin yaşamsal işlevlerini bozarak etki gösterirler [33].

**Alkilleyci ajanlar:** DNA'ya kovalent olarak bağlanarak hantal bir yapı meydana getirirler ve DNA'nın onarımı, replikasyon ve transkripsiyon dahil olmak üzere DNA'nın metabolik süreçlerini inhibe ederler [34]. Prensipte olarak, alkilleyci ilaçlar

guaninin N7 pozisyonunu alkilerler; ancak DNA'nın alkilenen kısmı alkilleyici ajanın türüne göre farklılık gösterebilir [35].

**Antibiyotikler:** Sitotoksik özelliğe sahip bu ilaçlar çeşitli mikroorganizmaların kültürlerinden elde edilirler.

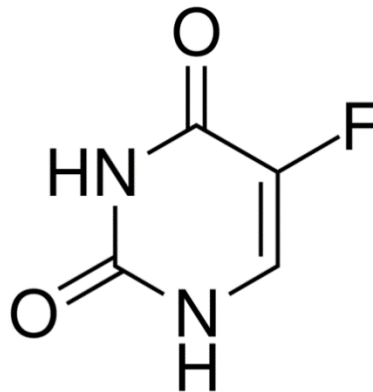
**Bitkilerden izole edilen antineoplastikler:** Bu bileşikler hücrelerin metafazda durmalarına neden olurlar ve mikrotübülleri inhibe ederler. Sonuç olarak nükleik asitlerin ve proteinlerin sentezini inhibe ederler.

**Hormonlar:** Tümörler hormona bağımlı ya da hormona duyarlı olabilirler. Hormonal aktivitenin giderilmesiyle hormona bağımlı tümörlerin gelişimi durabilir. Öte yandan belirli hormonların takviyesiyle hormona duyarlı tümörlerin ilerlemesi durdurulabilir [32].

**Diğer antineoplastikler:** Yukarıdaki sınıflandırmada yer almayan çeşitli antineoplastik ilaçlar da mevcuttur.

### 2.2.1. Florourasil

Beyaz kristal yapıya sahip florourasil, 5-floro-2,4 (1H,3H)-pirimidindion, pirimidinin florlanmış bir türevidir. Pirimidin sentezini inhibe eder ve böylece DNA oluşumunu engeller. Florourasil baş, boyun, kolon, rektum, meme, mide, mesane, pankreas kanserlerinin tedavisinde kullanılır.



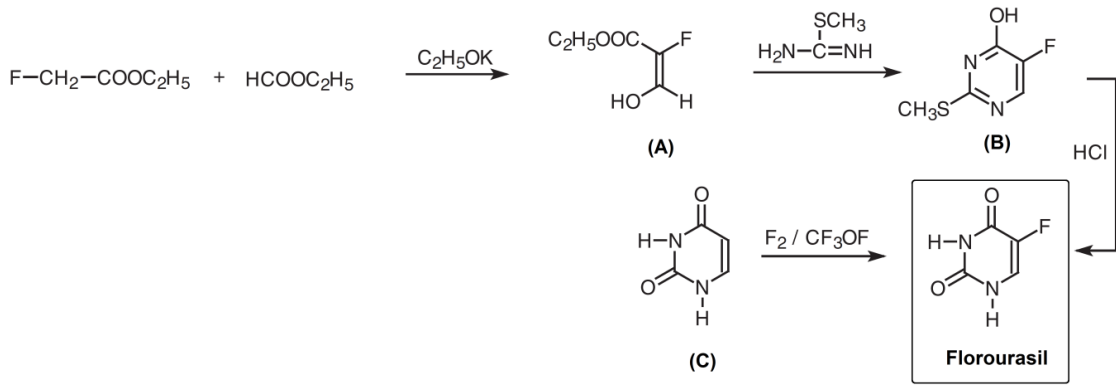
Şekil 2.8. Florourasilin kimyasal yapısı.

Çizelge 2.2: Antineoplastik ilaçlar.

<b>Antimetabolitler</b>	Folik asit antagonistleri	<i>metotreksat</i>
	Pürin türevleri	<i>merkaptopürin, tiyoguanin</i>
	Pirimidin türevleri	<i>florourasil, floksuridin, sitarabin</i>
<b>Alkileyici ajanlar</b>	Azotlu hardal türevleri	<i>mekloreタミン, klorambusil, melfalan, siklofosfamid, ifosfamid</i>
	Etilenimin türevleri	<i>tiyotepa</i>
	Alkil sülfonatlar	<i>busulfan</i>
	Nitrozoüreler	<i>lomustin, karmustin, streptozosin, sisplatin, karboplatin</i>
<b>Antibiyotikler</b>	Daktinomisinler	<i>daktinomisin</i>
	Bleomisinler	<i>bleomisin</i>
	Antrasiklinler	<i>doksorubisin, daunorubisin, mitomisin</i>
<b>Bitkilerden izole edilen antineoplastikler</b>		<i>vinblastin, vinkristin</i>
	Epipodofilotoksinler	<i>etoposid, teniposid</i>
<b>Hormonlar</b>	Androjenler	
	Östrojenler	
	Progestinler	
	Kortikosteroidler	
	Hormonal olmayan ilaçlar	<i>aminoglutetimid, flutamid, mitotan, tamoksifen, löprolid</i>
<b>Diğer antineoplastikler</b>		<i>hidroksiüre, mitoksantron, dakarbazin, prokarbazin, amsakrin, asparaginaz</i>

## Florourasil sentezi

Öncelikle floroasetik asitin etil esteri, potasyum etoksit varlığında etilformat ile yoğunlaştırılarak hidroksimetilfloroasetik ester **(A)** elde edilir. Daha sonra hidroksimetilfloroasetik asit ester, S-metilzotiyoüre ile reaksiyona girerek halkalı yapı olan 2-metiltiyo-4-hidroksi-5-floropirimidin **(B)** oluşur. Bu yapı hidroklorik asit varlığında hidrolize olur ve son olarak florourasil elde edilir. Florourasil sentezine alternatif yöntem ise urasilin **(C)** florin veya triflorometilhipoflorid ile doğrudan florlanmasıdır [32].



Şekil 2.9. Florourasil sentezi.

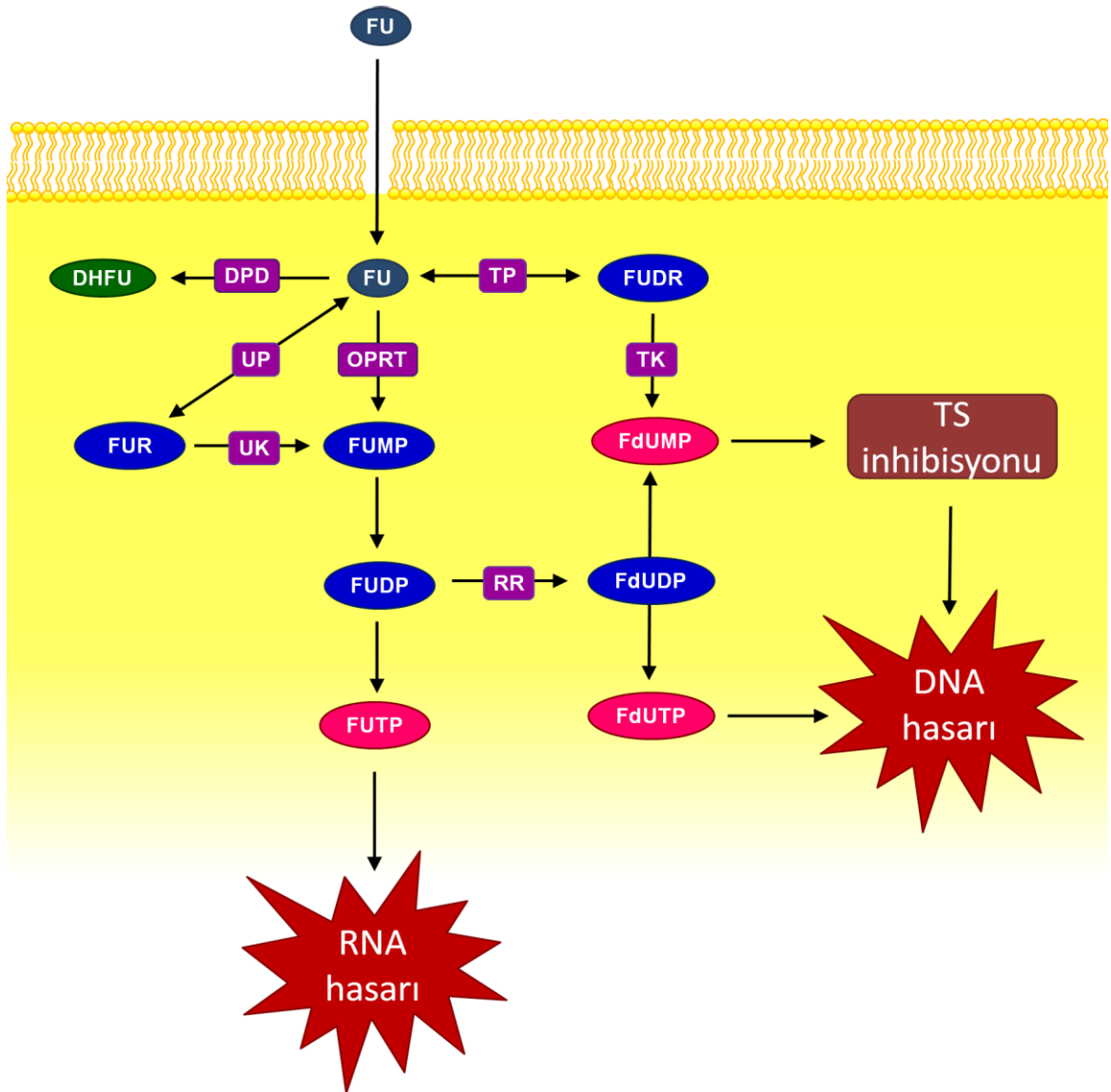
## Florourasilin etki mekanizması

Florourasil (FU) hücre içinde üç ana metabolite dönüşür: florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiüridin trifosfat (FdUTP) ve floroüridin trifosfat (FUTP). Florourasilin aktif metabolitleri RNA sentezini bozar (FUTP), nükleotid sentetik enzim olan timidilat sentazın etkinliğini inhibe eder (FdUMP), ve doğrudan DNA'ya katılarak DNA hasarına neden olur (FdUTP). FU aktivasyonunun ana mekanizması, florourasilin (FU), floroüridin monofosfata (FUMP) dönüşümüdür. Burada doğrudan ve dolaylı olmak üzere iki farklı yol izlenir. İlk yolda FU, orotat fosforibosil transferaz (OPRT) sayesinde doğrudan FUMP'ye dönüşür. İkinci yolda ise FU ilk önce üridin fosforilaz yoluyla floroüridine (FUR) ve ardından üridin kinaz ile floroüridin monofosfata (FUMP) dönüşür. Ardından FUMP fosforlanarak floroüridin difosfata (FUDP), ve FUDP da tekrar fosforlanarak floroüridin trifosfata (FUTP) veya ribonükleotid reduktaz (RR) enzimi sayesinde florodeoksiüridin difosfat'a (FdUDP) dönüşür. Ardından FdUDP fosforlanarak ya da defosforile



edilerek sırasıyla aktif metabolitler olan FdUTP'ye ve FdUMP'ye dönüşür. Bu aktivasyon yoluna alternatif bir başka aktivasyon yolu daha vardır. Buna göre, timidin fosforilaz FU'yu florodeoksiüridin'e (FUDR) katalizler ve ardından FUDR de timidin kinaz (TK) sayesinde timidilat sentaz (TS) inhibitörüne fosforlanır [36].

FU'yu dihidroflorourasil'e (DHFU) çeviren enzim olan dihidropirimidin dehidrojenaz FU katabolizmasındaki hız belirleyen enzimdir. Uygulanan FU'nun % 80'inden fazlası karaciğerde normal yollarla katabolize edilir [37].



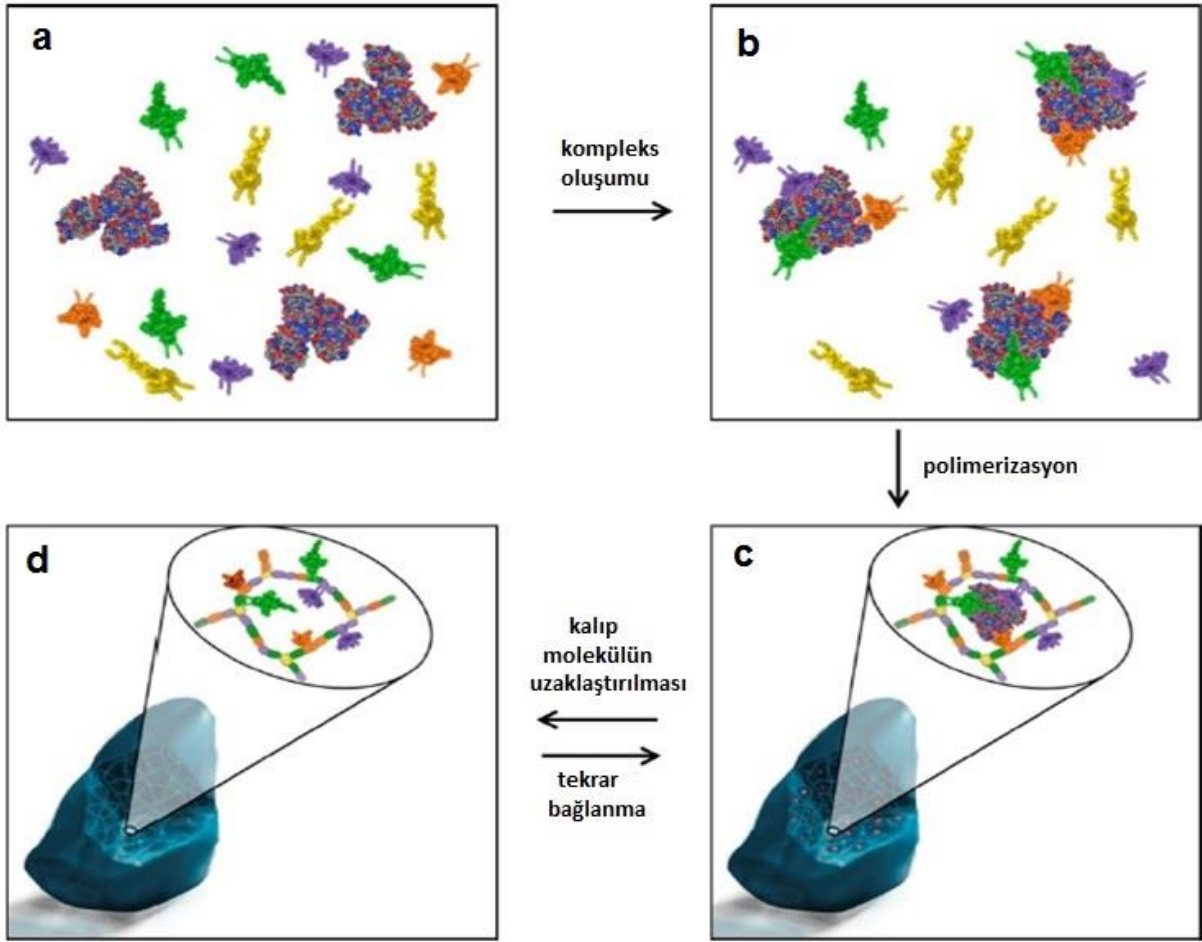
Şekil 2.10. Florourasilin etki mekanizması [36].

### 2.3. Moleküler Baskılama Teknolojisi

Moleküler tanımlama kavramı oldukça eski bir kavram olup ilk kez 1894'de Fischer'in enzim-substrat etkileşimini açıklayan ünlü "anahtar-kilit" modelini öne sürmesiyle birlikte ortaya çıkmıştır. Bu tanıma göre enzimin üzerinde substratın üç boyutlu yapısını tamamlayan aktif bölgeler bulunmaktadır. Böylelikle substrat bir anahtar gibi kendisine özgü enzimin aktif bölgeleriyle etkileşir. Moleküler tanımlama doğada birçok yerde karşılaşıcağımız temel biyolojik bir mekanizmadır. Bu doğal tanımlama genel olarak iyonik etkileşimler, hidrojen bağı, van der Waals kuvvetleri, pi etkileşimleri ve hidrofobik etki gibi entropik etkileri içine alan, kovalent olmayan etkileşimler sayesinde gerçekleşir. Antibadillerde, enzimlerde, nükleik asitlerde ve hücrelerde yaşamsal fonksiyonlar moleküler tanımlama sayesinde meydana gelir. Moleküler tanımlamanın doğada bu derece yaygın ve önemli bir yere sahip olması bilim adamlarını doğal tanımlamayı taklit etmeye yöneltmiştir [38].

Sentetik tanımlama yapılarının doğal tanımlamaya göre en önemli üstünlüğü moleküler tasarımda getirdiği serbestliktir. Öyle ki, sentetik bu yapılar doğada bulunan amino asitleri, aromatik halkaları, çeşitli karbon zincirlerini içerebilecekleri gibi, doğada bulunmayan sentetik polimer yapılarını da içerebilir. Böylelikle kararlılıkları, esneklikleri ve diğer özellikleri ihtiyaca göre tasarlanabilir. Gerekliğinde pH ve sıcaklık değişimi, elektrik ve manyetik alan gibi dış etkilere karşı tepkiler, uygun fonksiyonel gruplar kullanılarak sağlanabilir.

Moleküler tanımlama kavramının en yeni ve büyük çapta ilgi gören uygulamalarından biri de moleküler baskılanmış polimerlerdir [38]. Moleküler baskılanmış polimerler, hedef molekülün bulunduğu ortamda organik monomerlerin çapraz bağlanması ile oluşan sentetik sistemlerdir. Moleküler baskılamanın oluşumundaki genel basamaklar Şekil 2.11'de açıklanmıştır. Şekil 2.11.a'da, hedef molekül, çapraz bağlayıcı monomer (sarı) ve fonksiyonel monomerlerden (yeşil, mor, turuncu) oluşan çözelti karışımı görülmektedir. Şekil 2.11.b'de, kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler ile fonksiyonel monomerler ve hedef molekül arasında kompleks oluşumu söz konusudur. Şekil 2.11.c, polimer ağının oluşumunu gösterirken, Şekil 2.11.d'de hedef molekülün uzaklaştırılması ile hedef moleküle spesifik oyukların oluşumu görülmektedir [38].



Şekil 2.11. Genel moleküler baskılama işlemi.

Moleküler baskılanmış polimer hazırlama süreci üç adımdan oluşur [39]:

- 1) Ön-kompleksleşme: Hedef molekül ve fonksiyonel monomerler arasında kovalent bağlar ya da kovalent olmayan etkileşimler aracılığı ile kompleks oluşturulur.
- 2) Polimerleşme: Monomer-hedef molekül kompleksi, uygun bir çapraz bağlayıcı ve başlatıcı kullanılarak fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir. Polimer içindeki monomerlerin fonksiyonel grupları hedef molekül varlığında belli bir dizilime ve oryantasyona göre sabitlenirler. Böylelikle tanıma yeteneğine sahip üç boyutlu gözenekli polimer yapısı elde edilir [40].
- 3) Yıkama (elüsyon): Hedef moleküller uygun çözücüler yardımıyla polimerden uzaklaştırılır ve üç boyutlu yapısıyla hedef molekülün büyüklüğüne ve fonksiyonel gruplarına özgün bellekler meydana gelir.

Moleküler baskılama işleminde hedef molekül (baskılanacak molekül veya iyon), fonksiyonel monomerler, çapraz bağlayıcılar, başlatıcılar ve çözücüler kullanılır.

**Hedef (Baskılanan) Molekül:** Moleküler baskılama tekniğinde aminoasitler ve türevleri gibi küçük yapıdaki moleküller; protein gibi makro yapılar, çok moleküllü hücreler, metal iyonları gibi çok çeşitli maddeler hedef molekül olarak seçilebilir. Hedef molekül merkezi bir öneme sahiptir ve moleküler baskılama süreci boyunca monomerlerin fonksiyonel gruplarının organizasyonunu yönetir. Baskılanan molekül polimerleşme şartları altında kimyasal olarak inert olmalıdır. Serbest radikal polimerizasyonunu engelleyecek veya yavaşlatacak grup içermemeli ve polimerleşme müddetince çıkılan sıcaklıkta baskılanan molekül kararlı olmalıdır [41].

**Fonksiyonel Monomerler:** Monomerler, moleküler baskılama işleminde kilit rol oynarlar. Bu monomerler baskılanmış bağlanma bölgelerinde bağlanma etkileşimlerinden sorumludur. Bu yüzden baskılama işlemi sırasında monomer-hedef molekül kompleksinin kararlı olabilmesi için hedef moleküle uygun fonksiyonel gruplar içeren monomerler seçmek önemlidir. Kovalent moleküler baskılama yönteminde, baskılanan molekülün fonksiyonel monomere oranını değiştirmenin etkilerini incelemek gereksizdir, çünkü baskılanan molekül kovalent olarak bağlanabilecek fonksiyonel sayısını belirler. Yani fonksiyonel monomerler hedef moleküle stokiyometrik biçimde bağlanır. Kovalent olmayan moleküler baskılamada, hedef molekül/fonksiyonel monomer oranı deneysel olarak saptanır [42]. Kovalent olmayan baskılamada, baskılamanın gerçekleşmesi için genellikle daha fazla miktarda baskılanacak molekül kullanılır.

**Çapraz Bağlayıcılar:** Çapraz bağlayıcılar doğrusal polimer zincirleri arasında adeta köprü vazifesi görerek bir polimer ağı oluşturur. Ayrıca polimer zinciri oluşumunu destekler ve düzenler. Moleküler baskılanmış polimerlerin sentezinde çapraz bağlayıcıların rolü üç farklı açıdan incelenebilir:

- (a) Moleküler baskılanmış polimerlerin (MIP'lerin) morfolojilerini kontrol eder.
- (b) Baskılanmış tanımlama bölgelerinin kararlı kalmasını sağlar.
- (c) MIP diziliminin mekanik kararlılığını etkiler.

Fonksiyonel monomer/çapraz bağlayıcı oranının moleküler baskılanmış polimerlerin özelliklerinin üzerindeki etkisi büyüktür. Çapraz bağlayıcı miktarı az olduğu zaman,

MIP'lerin özgün tanıma bölgeleri olan oyuklar kendilerine özgü şekillerini devam ettiremezler. Bu durum moleküler baskılanmış polimerlerin tanımlama yeteneklerinin düşmesiyle sonuçlanır. Öte yandan aşırı çapraz bağlayıcı miktarı birim kütledeki fonksiyonel monomer sayısını düşürür ve bu durum tanımlama bölgesi sayısında düşüşe neden olur [41].

**Çözücüler:** Çözücüler baskılanmış polimerlerin gözenekli yapıda olmasını sağlar. Çözücü molekülleri tarafından kaplanan boşluklar, çözücünün yıkama basamağında giderilmesi ile gözenek formunu alırlar. Çözücü miktarının az olması sebebiyle oluşan polimer çok yoğun olacak ve hedef molekülün bağlanma ve salınma basamaklarında difüzyonuna izin vermeyecektir. Çözücü sadece yüksek çözünürlüğe sahip olmamalı, ayrıca hedef molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimleri kolaylaştırmalı. Genel olarak polar çözücüler baskılanacak molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki hidrojen bağlarının oluşumunu düşürerek, hedef molekül-monomer kompleksi oluşumunu negatif yönde etkiler. Bu yüzden benzen, toluen, ksilen, kloroform ve metilen klorür gibi düşük dielektrik sabitlerine sahip çözücüler tercih edilir [39].

**Başlatıcılar:** Moleküler baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında kullanılan başlatma yöntemleri radikal polimerizasyonu, radyasyon polimerizasyonu ve elektrokimyasal polimerizasyon yöntemleri olarak sınıflandırılabilir [39]. Başlatıcılar monomere göre oldukça az miktarlarda (yaklaşık % 1) kullanılırlar [41]. Başlatıcı seçilken hedef molekül, fonksiyonel polimerler, polimerleşme türü göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, eğer baskılanacak molekül fotokimyasal ya da termal olarak kararlı değilse fotokimyasal ya da termal yoldan tetikleyen başlatıcılar kullanmak anlamsızdır [43].

### 2.3.1. Moleküler Baskılama Yöntemleri

Moleküler baskılama yöntemi hedef molekülü ve fonksiyonel grupları arasındaki etkileşime göre kovalent baskılama, kovalent olmayan baskılama ve yarı-kovalent baskılama olmak üzere incelenebilirler. Bu yöntemlerden başka, metal iyon etkileşimleri de moleküler baskılamada kullanılabilir.

### **2.3.1.1. Kovalent Baskılama Yöntemi**

Kovalent baskılama yöntemi 1970'lerin başında Almanya'daki Heinrich-Heine Üniversitesi'nden Wulff ve çalışma arkadaşları tarafından tanımlanmıştır [44, 45]. Bu yöntemde göre, hedef molekül-monomer kompleksi arasında tersinir kovalent etkileşimler (ester bağları, disülfid bağları, Schiff bazları, imin asetal türevleri gibi) gerçekleşir. Polimerleşme meydana geldikten sonra tersinir kovalent bağlar çözücü (eluent) varlığında seçici olarak kırılarak hedef molekül ortamdaki uzaklaştırılır. Polimer, hedef molekül ile etkileştirildiğinde aynı kovalent bağlar tekrar oluşturulur. Bu yöntem kullanılarak kararlı ve homojen bağlanma yerleri oluşturulabilir; ancak bu yöntemin en büyük dezavantajı yeniden bağlanma için yavaş bir kinetiğe sahip olmasıdır [46].

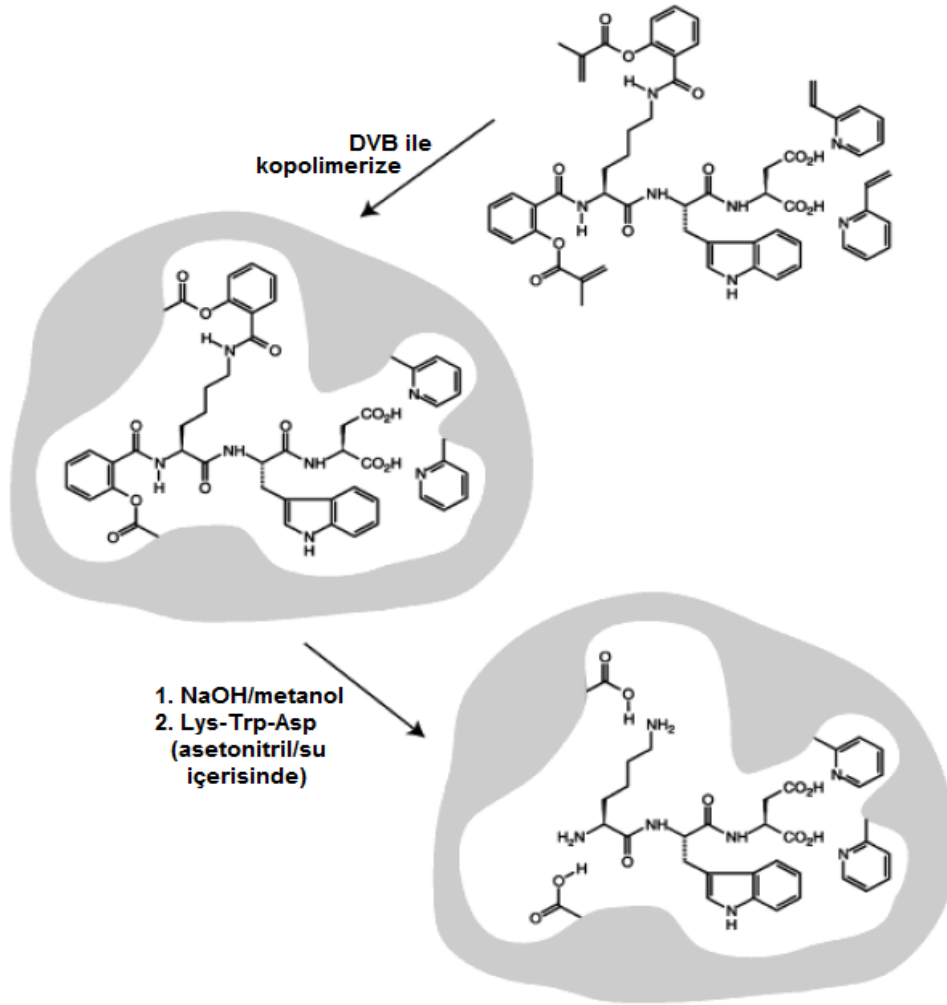
### **2.3.1.2. Kovalent Olmayan Baskılama Yöntemi**

Kovalent olmayan baskılama Mosbach ve Arshady tarafından 1981'de öne sürülen bir yöntemdir [47]. Bu yaklaşımda elektrostatik kuvvetler, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim, yük transferi, metal şelat ve hatta van der Waals gibi zayıf kovalent olmayan etkileşimler sayesinde hedef molekül ve seçilen monomerler ile önkompleks oluşur. Ardından polimerleşme vasıtasıyla bu önkompleks dizilimi korunur. Polimerleşmeden sonra uygun çözücülerle hedef molekül polimerden uzaklaştırılır. Hedef molekülün uygun oyuqlara tekrar bağlanması aynı kovalent olmayan etkileşimlere dayanır. Kovalent olmayan baskılama yöntemi kolaylığından dolayı bakılanmış polimer hazırlamak için en etkili ve en yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [48].

### **2.3.1.3. Yarı-Kovalent Baskılama Yöntemi**

1990'ların sonunda Whitcombe ve ekibi tarafından yarı-kovalent baskılama sistemi geliştirildi. Bu melez yöntem kovalent ve kovalent olmayan baskılamanın avantajlarının birleştirilmesine olanak sağlar. Bu yöntemde, hedef molekül-monomer kompleksi kovalent bağlar ile oluşur. Hedef molekül ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra, hedef molekülün tekrar bağlanması kovalent olmayan etkileşimler sayesinde gerçekleşir [49-51]. Yarı-kovalent baskılama yöntemini geliştirmek için yapılan çalışmalardan biri de hedef molekül ile fonksiyonel monomer

arasına hedef molekülle birlikte ortamdan uzaklaşan aracı gruplar eklemektir. Bu gruplar hem polimer oluşumu esnasında hedef molekül ile monomerin birbirine bağlanmasını sağlar hem de kovalent olmayan geri bağlanmada sterik engellemeleri ortadan kaldırır. Bu amaçla, kullanılan aracı gruplardan biri karbonat esterinin karbonil grubudur. Karbonil grubu aracılığıyla baskılanmış moleküllere üre, üretan, kolesterol örnek verilebilir [52].

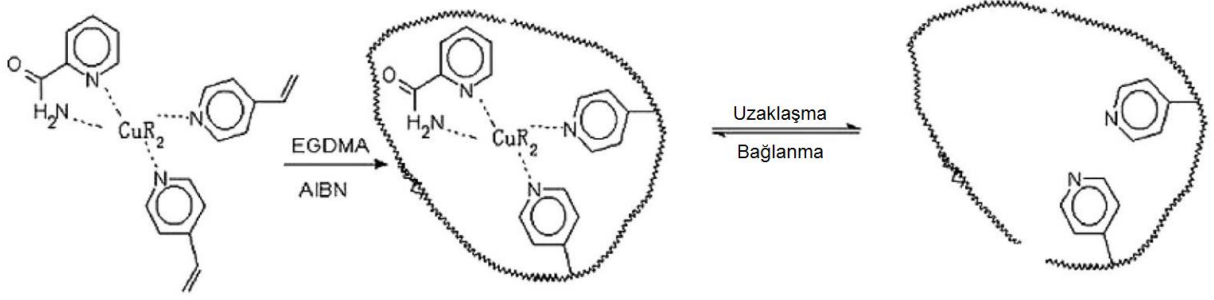


Şekil 2.12. Yarı-kovalent baskılama yöntemi [52].

#### 2.3.1.4. Metal İyon Etkileşimleri ile Baskılama Yöntemi

Metal iyon etkileşimleri doğada yapısal ve katalitik alanlarda önemli roller üstlenmektedir. Hemoglobinin oksijen atomlarını  $Fe^{2+}$  iyonu içeren hem molekülleri ile bağlaması ya da genetik materyalin (DNA ve RNA) sentezi, metabolizması ve

tamirinde önemli görev üstlenen fosforil transferaz enzimlerinde metallerin katalitik etki göstermesi [53] metal koordinasyon etkileşimlerine örnek olarak verilebilir. Metal iyon etkileşimleri katalitik antikorlar [54], iyon seçici kromatografi [55], protein saflaştırma yöntemleri [56], biyosensör [57] gibi seçici tanıma sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır.



Şekil 2.13. Metal kompleksi ile moleküler tanımlama, R = format, asetat, propionat [58].

Metal iyon etkileşimlerinde metal merkezi ve substrat arasında diğer kovalent olmayan etkileşimlerden daha seçici ve güçlü bir etkileşim meydana gelir. Çünkü farklı metal iyonlarının farklı fonksiyonel gruplara daha fazla ilgisi söz konusudur. Örneğin hedeflenen ligand histidinin imidazol grupları ise, Cu<sup>2+</sup> ve Fe<sup>2+</sup> kullanılırken, fosforil grupları için Ni<sup>2+</sup> ve Zn<sup>2+</sup> kullanılabilir [59]. Böylelikle aşırı miktarda bağlama grubuna gerek kalmaz ve dolayısıyla spesifik olmayan bağlanma bölgelerinin oluşumu en aza indirilmiş olur. Bu sebeple moleküler baskılama teknolojisi metal iyonları sayesinde yüksek seçiciliğe ve afiniteye sahip polimerik sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlar. Bu sistemler yapay enzim sistemleri, biyokromatografik ayırım, biyosensörler ve kontrollü ilaç salım sistemleri gibi alanlarda kullanılabilir [60].

#### 2.4. Moleküler Baskılanmış Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

Kontrollü ilaç salım sistemleri ilacın doğru zamanda, doğru yerde ve doğru miktarda salımını sağlamalıdır. Bu sistemler aynı zamanda biyo-uyumlu ve biyobozunur olmalıdır. Sistemin kendisi ya da parçalanma ürünleri toksik olmayıp vücuttan zararsız bir şekilde atılabilmelidir.



Geleneksel kontrollü salım sistemlerinde ilaç, matriksin istenmeyen şekilde kırılması/bozunması ile minimum toksik derişimini (MTD) aşarak vücuda salınabilir (Şekil 2.1). Bu durum hasta için tehlikeli sonuçlara yol açabilir. Bu sebepten ötürü araştırmacılar moleküler tanımlama özelliğine sahip ilaç salım sistemlerine yönelmişlerdir. Sadece spesifik bir molekülün (örnek, ilaç etken maddesi) matrikse bağlanma-salınma dengesi ilacın ortamdaki derişimine bağlı olarak sağlanıp, *in vivo* ortamdaki ilaç düzeyinin dengede tutulması amaçlanmıştır.

Moleküler baskılanmış ilaç salım sistemlerinde, geri besleme kontrol mekanizması ile salım hızı ve miktarı düzenlenebilir. Örneğin, kandaki glukoz seviyesi minimum eşik şiddeti düzeyine çıktığı an, polimerik sistemden insülin salımı başlar. Diğer bir örnek de, protein ya da hücre yüzeyi reseptörü gibi belirli bir hedef maddeye duyarlı ilaç salım sistemleri bu hedef madde ile karşılaştığında ilaç salımını başlatır [61].

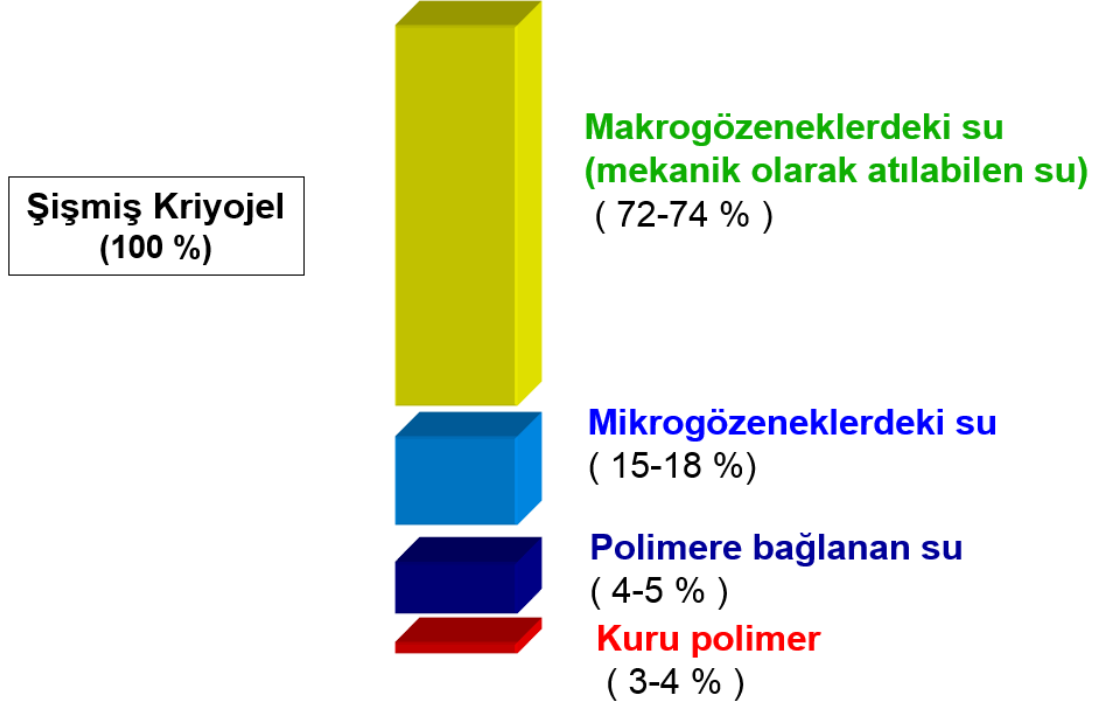
Moleküler baskılama teknolojisi ilaç salımını geri besleme ile belli bir düzeyde tutmaya imkan verdiği gibi enantiyomere özgü ilaç salımına da olanak sağlar. Baskılama esnasında hedef molekülün uzaydaki 3-boyutlu yapısına özgü tanıma bölgeleri oluşturulur. Bu sayede ilacın rasemik karışımı kullanıldığında, etkili enantiyomerin seçici olarak salımı sağlanmış olur [62]. Enantiyomerlerin saflaştırılmasının hem zaman hem de maliyet olarak külfetli olduğu düşünüldüğünde moleküler baskılama teknolojisi ilaç salım sistemleri için hem çok pratik hem de ucuz bir sistemdir.

## 2.5. Kriyojeller

Hidrojeller fiziksel ya da kimyasal yolla çapraz bağlanmış, bol miktarda su absorbe edebilen polimer ağlarıdır. Hidrojeller, hazırlama yöntemi, mekanik ve yapısal özellikleri dahil olmak üzere çeşitli parametrelere bağlı olarak farklı kategorilere ayrılabilir [63].

Hidrojellerin bir türü de biyoteknolojide büyük bir öneme sahip olan kriyojellerdir. (Yunanca'da krios (kryos) donma veya buz anlamına gelmektedir [64].) Kriyojelleşme (ya da sıfırın altındaki sıcaklıklarda jelleşme), gözeneklilik derecesi kontrol edilebilen makro gözenekli kriyojellerin oluşumuna olanak sağlar [65]. Kriyojellerin süngerimsi yapısı ve makrogözeneklere sahip olması çeşitli

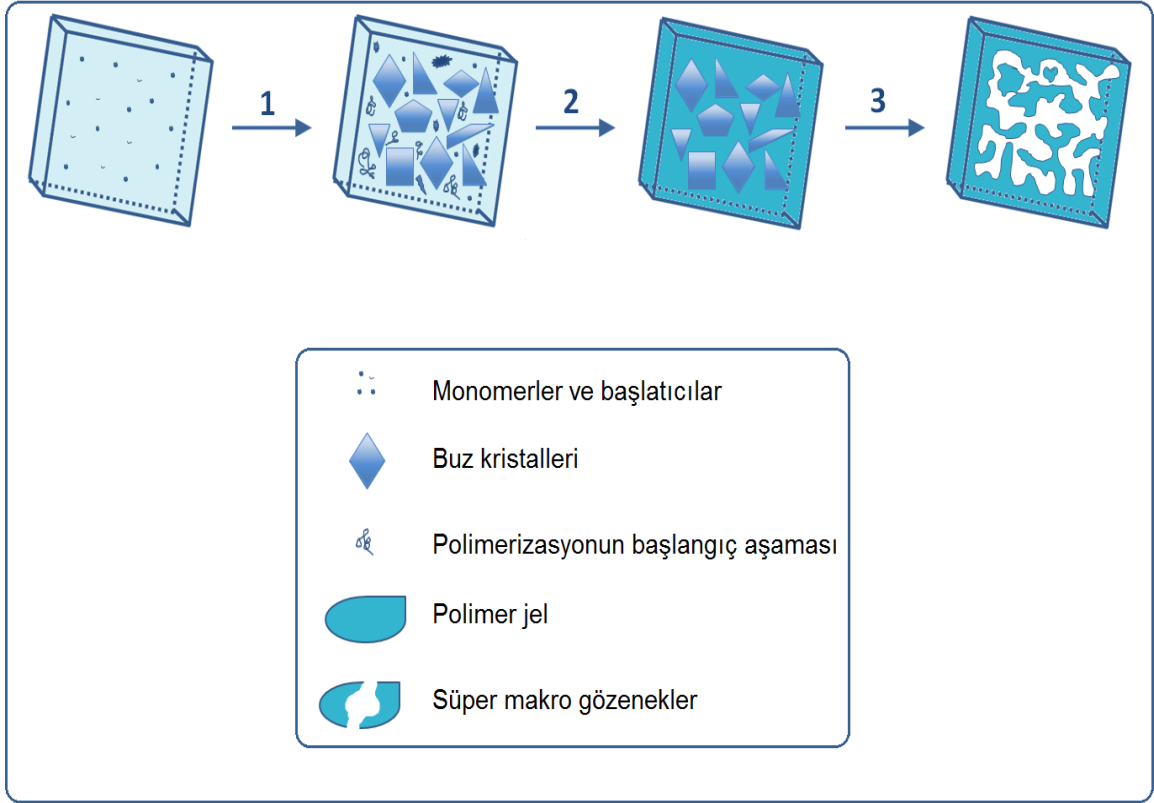
büyükölükteki kütle aktarımının hem difüzyonla hem de taşınımila rahat bir şekilde gerçekleşmesine olanak sağlar.



Şekil 2.14. Kriyojellerin gözenekliliği.

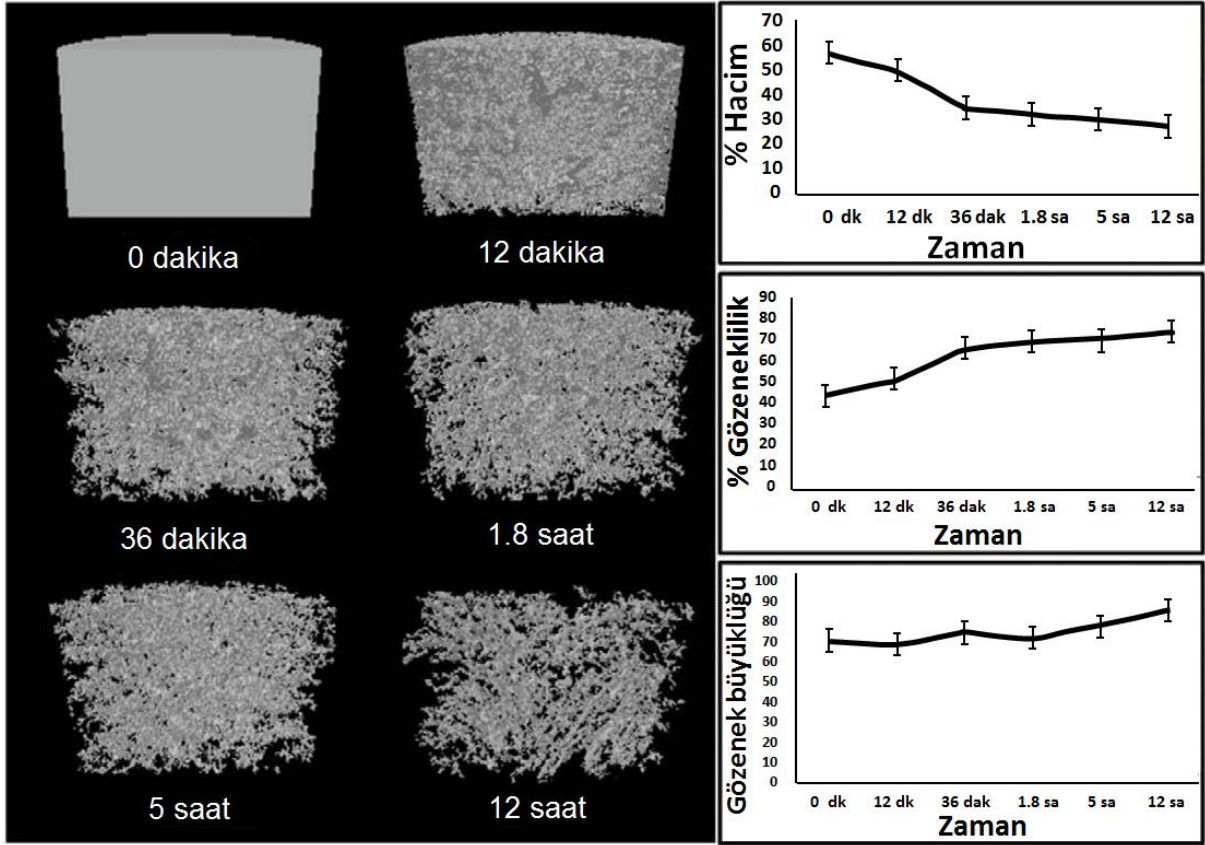
### 2.5.1. Kriyojellerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

Kriyojellerin oluşumu çözücünün donma noktasının altında gerçekleşir. Böylelikle zamanla çözücünün büyük bir kısmı donup birbirine bağlı buz kristalleri oluştururken, bu buz kristallerinin etrafında donmamış sıvıda bulunan polimer öncülleri polimerleşerek buz kristallerinin etrafında bir ağ yapı oluştururlar. Donmuş çözücü kristalleri gözenek oluşturucu ajan olarak görev görür. Polimerleşmeden sonra donmuş karışım oda sıcaklığına getirildiğinde buz kristalleri erir ve makrogözeneklere sahip polimer ağ yapı elde edilir [66].



Şekil 2.15. Kriyojel üretiminin şematik gösterimi: (1) Donma; (2) Polimerleşme; (3) Erime.

Kriyojelleşme olgusu kritik monomer/polimer derişimini ve jelleşme için gereken tepkime süresini ilginç bir şekilde azaltır [67]. Çözücünün kristalleşmesinden dolayı, donmamış sıvı mikro fazın toplam hacmi başlangıç hacminden daha düşüktür. Diğer bir ifadeyle, donmamış sıvı fazdaki polimer ya da monomer derişimi başlangıç derişiminden daha yüksektir. Jel oluşturucu ajanların derişiminin hızla artması, jel oluşumunu tetikleyerek jelleşme hızını artırır. Polimer matriksin gözenek boyutu 10  $\mu\text{m}$  ile 200  $\mu\text{m}$  arasında değişebilir.



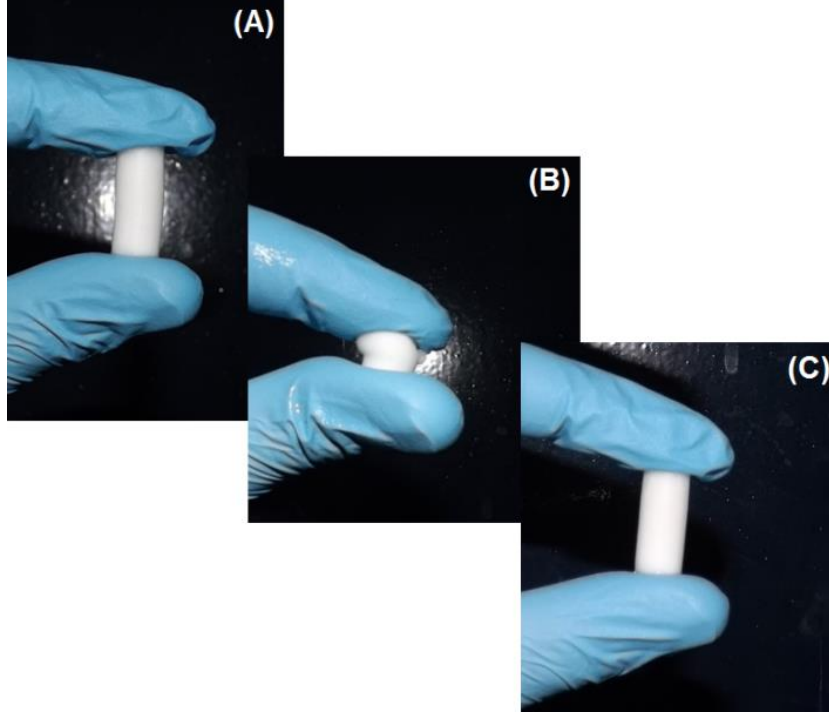
Şekil 2.16. Kriyojelin zamanla oluşumu ve hacimin, gözenekliliğin ve gözeneklik büyüklüğünün zamana bağlı değişimi [67].

### 2.5.2. Kriyojellerin Genel Özellikleri

**Yüksek Şişme Oranı:** Hidrojellerin su içinde şişebilmeleri için gereken zaman uzundur [68]. Bunun en büyük sebebi yoğun polimer zincirlerinin içerisine suyun yavaş bir şekilde difüzyonlanmasıdır. Bazı uygulamalar için yavaş şişme özelliğine sahip hidrojellerin kullanımı avantajlı olmasına karşın, kuru hidrojellerin çok hızlı bir biçimde şişmelerinin istendiği uygulamalar da mevcuttur. Süper makro gözeneklere sahip kriyojellerde şişme saatler yerine dakikalar gibi kısa bir sürede gerçekleşir. Hızlı şişme özelliğine sahip kriyojellerin şişme oranları (şişmiş kriyojel ağırlığı/kuru kriyojel ağırlığı) da çok büyük boyutlara erişmektedir [69].

**Elastiklik:** Kriyojellerin oluşumu sırasında buz kristalleri monomer çözeltisini ilk hacimden daha küçük bir hacime iterler. Böylelikle gözeneklerin etrafı kalın duvarlarla örülür. Kriyojellerin mekanik güç sağlayan bu kalın gözenek duvarları ve makro gözeneklere sahip olmaları onların elastik bir yapıda olmalarını sağlar [70].

Elastik yapıdaki kriyojeller doku mühendisliği uygulamalarından kontrollü salım formülasyonlarına kadar birçok uygulama alanları için idealdir.



Şekil 2.17. Elastik yapıdaki kriyojeller uygulanan mekanik güç kaldırıldığında tekrar eski hallerini alırlar.

**Hızlı Cevap Verme Yeteneği:** Geleneksel polimer jeller pek çok uygulama için ortamdaki değişimlere çok yavaş bir biçimde tepki verirler. Oysaki kriyojellerin kısa zamanda yüksek şişme özelliğine sahip olmaları, onların çevresel değişimlere duyarlılıklarını artırmaktadır. Öte yandan kriyojellerin çevredeki değişimlere (pH, sıcaklık, iyonik kuvvet, manyetik alan gibi) karşı duyarlı formları hazırlanabilmektedir.

Kriyojeller herhangi bir kalıpta sentezlenebilir ve böylece istenilen şekle sahip üç boyutlu yapı kolaylıkla hazırlanabilir. Kriyojellerin çok basit bir yöntemle hazırlanmaları, makro gözeneklere sahip olmaları, kullanılacak uygulama alanına göre modifiye edilebilmeleri kriyojellere olan ilgiyi artırmaktadır. Kriyojeller bu eşsiz özellikleri sayesinde günümüzde kromatografik ayrımlar [71], biyosensörler [72], ilaç taşıyım araçları [73] gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamında yapılan deneysel çalışmaları 5 başlık altında toplamak mümkündür:

- Fonksiyonel monomer N-Metakriloil-(L)-Histidin metil ester (MAH) sentezi
- MAH-Cu<sup>2+</sup> ön kompleksinin sentezi
- MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksinin florourasil ile önorganizasyonu
- Florourasil baskılanmış Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin hazırlanması ve karakterizasyonu
- In vitro florourasil salım çalışmaları

#### 3.1. Deneysel Malzemeler

Kriyojellerin hazırlanmasında temel bileşen olan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve N,N-metilen bisakrilamid (MBAAm) Sigma Aldrich (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Reaktifler kullanılabildiği kadar 4°C'da muhafaza edilmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/N,N,N',N'-tetra-metiletildiamin (TEMED) ve amonyum persülfat (APS) Sigma (Sigma Chemical Co., ABD) firmasından temin edilmiştir. Kalıp molekül (ilaç) Florourasil (Fluorouracil Koçak) Koçak Farma İlaç ve Kimya A.Ş. (Türkiye) firmasından tıbbî tedavi için kullanılacak saflıkta temin edilmiştir. MAH monomerinin sentezi laboratuvarında yapılmış olup metakriloil klorür ve (L)-Histidin metil ester, Sigma Aldrich firmasından sağlanmıştır. MAH ile kompleks oluşturmak için kullanılan bakır(II)-nitrat hemipantahidrat Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters osmoz 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 (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

#### 3.2. N-Metakriloil-(L)-Histidin metil ester (MAH) Monomerinin Sentezlenmesi

N-Metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentezlenmesi için aşağıdaki deneysel yöntem uygulandı: 5.0 g L-histidin metil ester ve 0.2 g of hidrokinon 100 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> çözeltilisinde çözüldü. Bu çözelti 0°C'ye kadar soğutuldu

ve 12.74 g trietilamin çözeltiye eklendi. 5.0 mL metakriloil klorür yavaşça bu çözeltiye azot gazı altında döküldü ve bu çözelti oda sıcaklığında 2 saat boyunca manyetik olarak karıştırıldı. Bu kimyasal tepkime sürecinin sonunda, reaksiyona girmemiş olan metakriloil klorür % 10'luk NaOH ile ekstrakte edildi. Su fazı döner buharlaştırıcı vasıtasıyla buharlaştırıldı. Kalan kısım (MAH) etanolde çözüldü [74].

### 3.3. MAH-Cu<sup>2+</sup> Kompleksinin Hazırlanması

MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksini hazırlamak için, MAH (0.223 g, 1.0 mmol) 15 mL etanolde çözüldü. Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 2.5H<sub>2</sub>O (1.0 mmol, 0.232 g) oda sıcaklığında bu çözeltiye karıştırılarak eklendi. Bu çözelti 3 saat boyunca karıştırıldı ve çözeltinin rengi maviye döndü. Ardından çözücü döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı ve etanol/asetonitril ile rekristalize edilen 0.201 g turkuaz katı bir ürün elde edildi (% 62.3 verim).

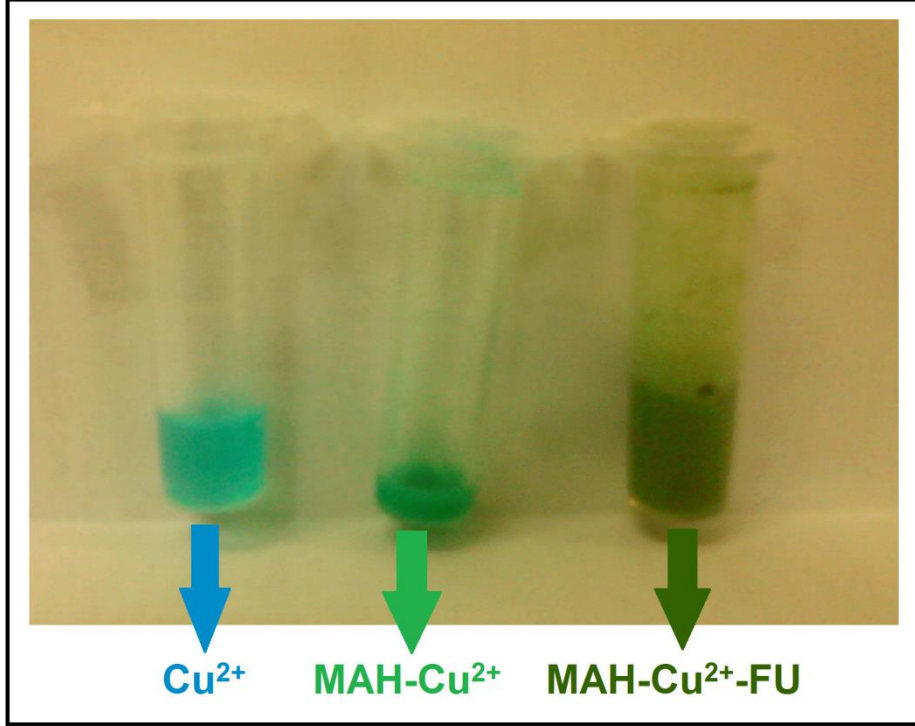
### 3.4. MAH-Cu<sup>2+</sup> Kompleksinin Florourasil ile Önorganizasyonu

Çizelge 3.1'de farklı oranlardaki karışımları gösterilen Florourasil (kalıp molekül) ve fonksiyonel monomer/ligand (MAH-Cu<sup>2+</sup>) 1.0 mL MOPS tamponu (pH 7.4) içeren eppendorf tüplerinde çözüldü.

Çizelge 3.1: Kompleks/Kalıp molekülün farklı miktarlardaki oranları.

	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	4. Örnek	5. Örnek	6. Örnek	7. Örnek
<b>MAH-Cu<sup>2+</sup></b> (µg)	7,5	15	22,5	30	37,5	45	52,5
<b>MAH-Cu<sup>2+</sup></b> (µmol)	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15	0,175
<b>Florourasil</b> (µg)	13	13	13	13	13	13	13
<b>Florourasil</b> (µmol)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Bu karışımlar florourasil ve MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksinin önorganizasyonu için 3 saat boyunca rotatör (Dragon Lab MX-RD-Pro, Çin) ile karıştırıldı. Önorganizasyondan sonra, ependorflarda yeşil renkte çökelti meydana geldi (Şekil 2.1.)



Şekil 3.1. MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksinin florourasil ile önorganizasyonu.

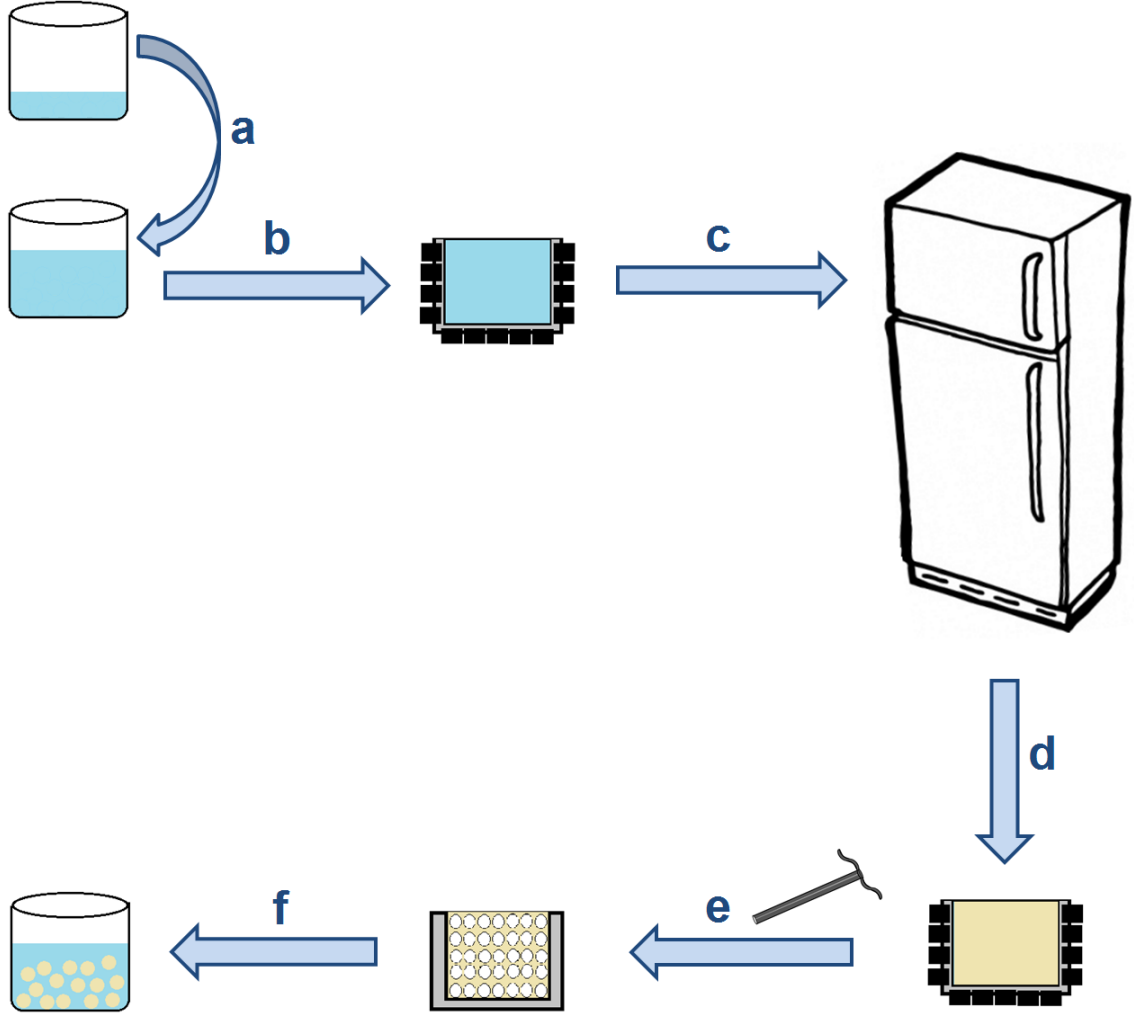
### 3.5. Florourasil Baskılanmış Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) Kriyojel Disklerin Hazırlanması

Çizelge 3.2'de belirtildiği üzere molce farklı n<sub>HEMA</sub>/n<sub>MBAA</sub> oranlarına sahip Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojellerinin hazırlanmasında aşağıda belirtilen yöntem izlenmiştir:

N,N-Metilen bisakrilamid (MBAAm) 7.0 mL suda çözülmüştür. HEMA, MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve bu karışım 1.8 mL suda çözülerek MBAAm çözeltisine eklenmiştir (Şekil 3.2.a). Bu karışımın üzerine 0.016 g amonyum persülfat (APS) eklenmiş ve ardından başlatıcı olarak da 20 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamin (TEMED) kullanılmış ve iki cam arasına hızlı ve dikkatli bir şekilde aktarılmıştır (Şekil 3.2.b). Polimerizasyon -16°C'da 24 saatte gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.c). Bu süre tamamlandıktan sonra iki cam arasında oluşan kriyojel oda sıcaklığına getirildikten sonra (Şekil 3.2.d) cam yüzeyinden



ayırımı sağlanarak yuvarlak diskler şeklinde kesilmiştir (Şekil 3.2.e). Tepkimeye girmemiş monomerlerin ve diğer artıkların polimerik yapıdan uzaklaştırılması için kriyojeller su ile yıkanmıştır (Şekil 3.2.f).



Şekil 3.2. Kriyojel disklerin hazırlanışının şematik gösterimi.

Bu işlem Çizelge 3.3'de görüldüğü üzere farklı miktarlarda MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil eklenerek tekrarlanmıştır.

Buna ek olarak kontrol PHEMA kriyojeller de ortama fonksiyonel monomer MAH-Cu<sup>2+</sup> önkomplesi eklenmeden aynı yöntemle sentezlenmiştir.

Çizelge 3.2: n<sub>HEMA</sub>/n<sub>MBAAm</sub> (mol) farklı miktarlardaki oranları.

n <sub>HEMA</sub> /n <sub>MBAAm</sub> (mol)	HEMA (mL)	MBAAm (g)	APS (g)	TEMED (µL)	Toplam Su Miktarı (mL)	MAH-Cu (mg)	FU (mg)	Toplam Monomer Kütlesi (g)
4	1,006	0,310	0,016	20	8,8	2,31	1	1,4554
8	1,136	0,175	0,016	20	8,8	2,31	1	1,460
16	1,214	0,094	0,016	20	8,8	2,31	1	1,463

Çizelge 3.3: Farklı miktarlarda eklenen ilaç miktarları (n<sub>HEMA</sub>/n<sub>MBAAm</sub> mol oranı 4)

n <sub>HEMA</sub> /n <sub>MBAAm</sub> (mol)	MAH-Cu (mg)	FU (mg)
4	1,155	0,5
4	2,31	1
4	4,62	2

### 3.5.1. Kriyojel Disklere İlaç Yükleme Veriminin Hesaplanması

Perforatör yardımıyla hazırlanan diskler 20 mL saf su ile yıkanmış ve florourasilin kriyojel disklere yüklenme verimliliği şu şekilde hesaplanmıştır:

$$\% \text{ ilaç yükleme} = \frac{[\text{ortama eklenen FU } (\mu\text{g}) - \text{yıkamayla uzaklaştırılan FU } (\mu\text{g})]}{[\text{ortama eklenen FU } (\mu\text{g})]} \times 100 \quad (3.1)$$

Ölçümler UV-Vis spektrofotometrede (Shimadzu UV-mini 1240, ABD) 266 nm dalga boyunda uygulanmıştır. Örnek hesaplama Ek-4'te verilmiştir.

### **3.6. Florourasil Baskılanmış Kriyojellerin Karakterizasyonu**

Sentezlenen kriyojellerin karakterizasyonu FTIR, BET, SEM, DSC, XRD ve şişme deneyleri ile yapılmıştır.

#### **3.6.1. FTIR ile Yapı Analizi**

Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojellerinin yığın yapısı FTIR (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) ile incelenmiştir. Analizden önce kriyojel diskler -60°C'da 24 saat boyunca liyofilize edilerek kurutulmuştur. Daha sonra, 2.0 mg polimer örneği 98 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm<sup>2</sup> basınçta ince bir pelet haline getirilmiştir. Hazırlanan peletin 4600-400 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığında spektrumu FTIR cihazında alınmıştır.

#### **3.6.2. Yüzey Alanı Ölçümleri**

Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojellerin spesifik yüzey alanı, yüzey alanı ölçüm cihazı (BET) (Quantachrome NOVA 2000, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Kriyojeller tartılıp öncelikle azot ortamında 100°C'da gazı alınıp ardından tekrar tartılıp örnek haznesine yerleştirilmiştir. Ardından örneklerin gaz adsorpsiyonu -210°C'da ve desorpsiyonu oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon basamağında elde edilen sonuçlar spesifik yüzey alanı hesaplamalarında kullanılmıştır.

#### **3.6.3. Denge Şişme Oranının Belirlenmesi**

Salım kinetiğini etkileyen faktörlerden biri de polimer yapının su alarak şişme özelliğidir. Bu sebeple farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren kriyojel disklerin şişme özellikleri incelenmiştir. Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel sistemin denge şişme oranının belirlenmesinde izlenen yol şu şekildedir: Liyofilizatör (Chris Alpha 1-2 LD plus, M Christ GmbH, Almanya) yardımı ile -60°C'da kurutulmuş olan kriyojel diskler ±0.0001 duyarlıkla tartılmıştır. Ardından 50 mL saf su içeren bir behere konulup sabit sıcaklıkta 25±0.5°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra sulu ortamdan alınmış ve süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeyindeki su uzaklaştırılarak tartımı yapılmıştır. Aşağıdaki eşitlik yardımı ile Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin su içeriği belirlenmiştir:

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{W_s - W_o}{W_o} \times 100 \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte  $W_o$  kriyojel diskin şişmeden önceki,  $W_s$  ise şişmeden sonraki ağırlığına (g) karşılık gelmektedir.

Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojellerin makrogözenek miktarının belirlenmesinde aşağıda belirtilen yöntem uygulanmıştır. 50 mL saf su içeren bir beherde denge şişme oranına ulaşan kriyojel diskler tartılmıştır. Ardından şişmiş diskler hassas bir şekilde sıkılarak kriyojellerin makrogözeneklerinde bulunan su uzaklaştırılmış ve tartılmıştır. Kriyojellerin sahip olduğu makrogözenek miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Makrogözenek miktarı (\%)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte  $W_1$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin ağırlığını (g) ifade ederken,  $W_2$  denge şişme oranına ulaşmış kriyojellerin sıkıldıktan sonraki ağırlığını (g) ifade etmektedir.

#### **3.6.4. Yüzey Morfolojisi**

Florourasil baskılanmış poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojellerinin yüzey ve yığın yapılarının belirlenmesinde taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmıştır. Kriyojel diskler liyofilizatör ile -60°C'da kurutulmuştur. Daha sonra örnekler altın-paladyum (40:60) ile kaplandıktan sonra SEM fotoğrafları JEOL, JEM 1200EX, (Tokyo, Japonya) kullanılarak alınmıştır.

#### **3.6.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)**

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) verileri Shimadzu DSC-60 kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler dinamik azot atmosferi ortamında 10°C/dak hızıyla 400°C'ye kadar ısıtılmıştır.

### **3.6.6. X-Işınları Difraktometresi (XRD)**

PXRD desenlerini elde etmek için toz örnekler numune tutucuya paketlenmiş ve ölçümler Cu K $\alpha$  radyasyonu ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) kullanarak Rigaku DMAX-2200 difraktometreye  $2\theta = 2 - 60^\circ$  arasında elde edilmiştir.

### **3.7. In vitro Florourasil Salım Çalışmaları**

İlaç salım kinetiğinin belirlenebilmesi için yapılan çalışmalar,  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  sabit sıcaklığa sahip etüv ( Binder etüv, Almanya) içerisinde 20 rpm hızda çalışan rotatörde yürütülmüştür. Liyofilize edilerek kurutulan florourasil yüklü Poli(HEMA-MAH-Cu $^{2+}$ ) kriyojel disklerden salım, farklı pH'lara (pH 4.0, 6.0, 7.4 ve 9.0) sahip 4 mL tampon ortamlarında sağlanmıştır. Ortamdan belirli zaman aralıklarında örnek alınmış ve ortama taze tampon çözeltisi eklenerek sürücü güç sabit tutulmaya çalışılmıştır (çanak şartları/sink conditions). Deneysel çalışma PBS (pH=7.4) ortamı baz alınarak oda sıcaklığında tekrar edilmiştir. Yüklenen ilaç miktarının salınan ilaç miktarına etkisini incelemek amacıyla farklı florourasil derişimlerine sahip kriyojel disklerden ortalama 5 saatlik salım miktarları değerlendirilmiştir. Salınan florourasil miktarı UV-Vis spektrofotometre kullanılarak belirlenmiş ve toplam salım değerleri hesaplanmıştır. Örnek hesaplama Ek-5'te verilmiştir.

#### **3.7.1. UV-Vis spektrofotometre ile salım analizleri**

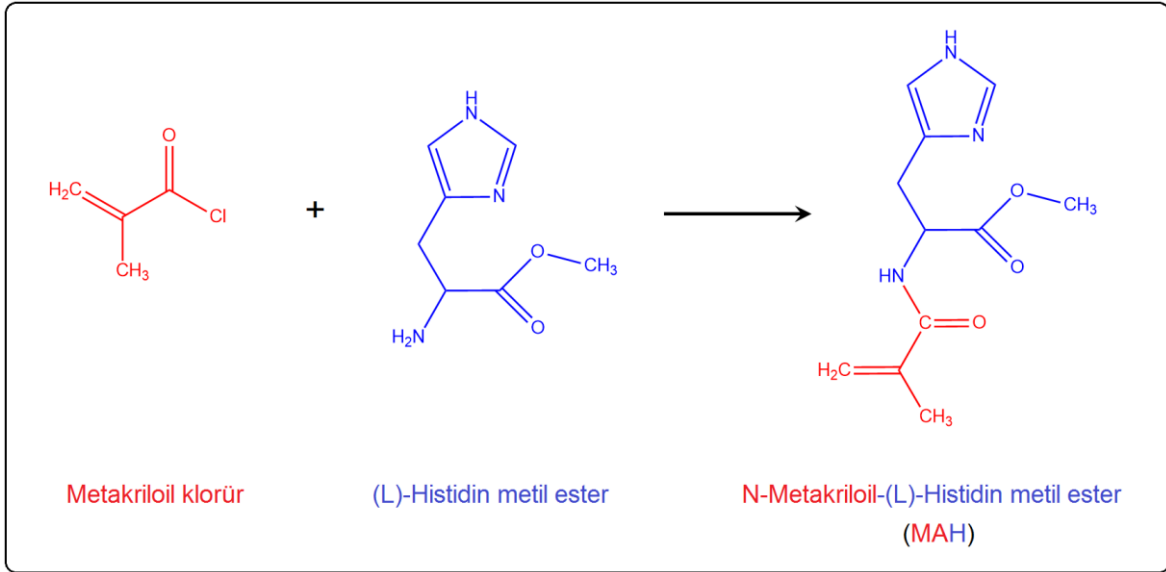
Florourasilin salınan miktarı, UV-Vis spektrofotometrede 266 nm dalga boyunda gözlenmiştir. Salım ortamından alınan 400  $\mu\text{L}$  tampon örnekleri, 100  $\mu\text{L}$  metanol eklenerek seyreltilmiştir. Kalibrasyon grafiği hazırlamak için değişik derişimlerde florourasil çözeltileri (tampon çözelti+etanol karışımında) hazırlanmıştır. Elde edilen grafik yardımıyla salınan florourasil miktarları hesaplanmıştır. UV-Vis spektrofotometrede hazırlanan kalibrasyon grafiği Ek-1'de verilmiştir.

## 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Florourasil Baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) Kriyojel Diskler

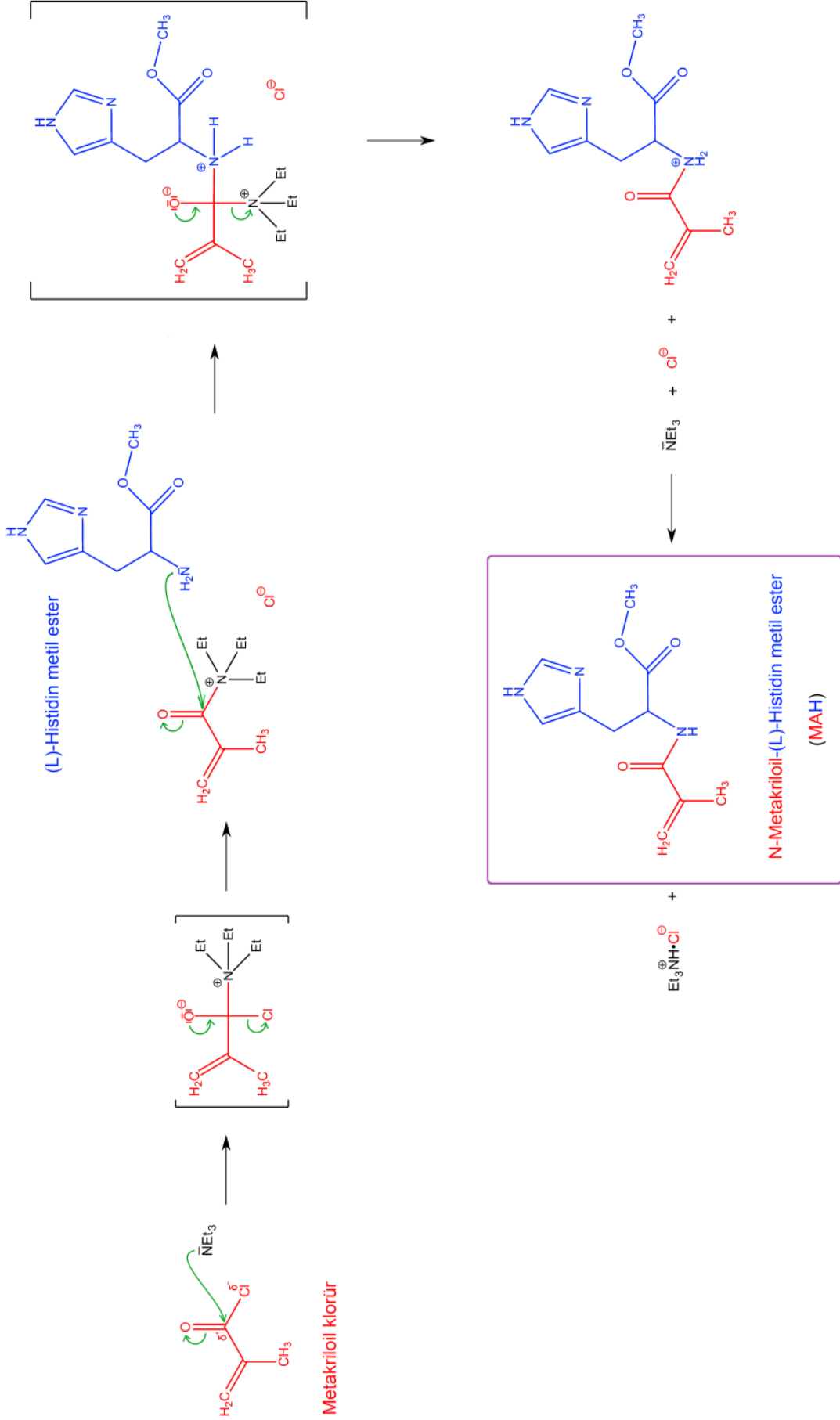
#### 4.1.1. MAH-Cu<sup>2+</sup>/Florourasil Kompleksinin Karakterizasyonu

Florourasil baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin üretiminde ilk önce, (L)-histidin amino asidinin metil esterini içeren MAH monomeri metakrilolil klorür kullanılarak sentezlenmiştir.



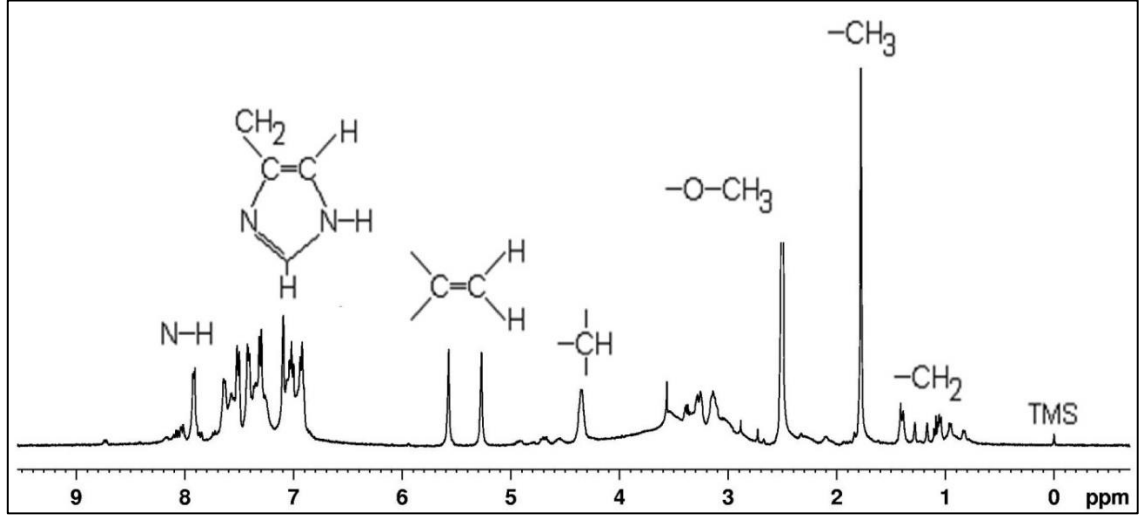
Şekil 4.1. N-Metakrilolil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentez tepkimesi.

MAH monomerinin sentezlenmesinde gerçekleşen tepkime mekanizması Şekil 4.2' de verilmiştir. Bu mekanizmaya göre, sentez tepkimesi trietilaminin (NEt<sub>3</sub>) metakrilolil klorüre saldırmasıyla başlar. Trietilamin tepkime sırasında oluşan HCl'nin histidin ile amin tuzu oluşturmasını engeller. Trietilaminin diğer bir avantajı da, bu organik baz varlığıyla tepkime süresince bazik pH koşulu sağlanmış olur.



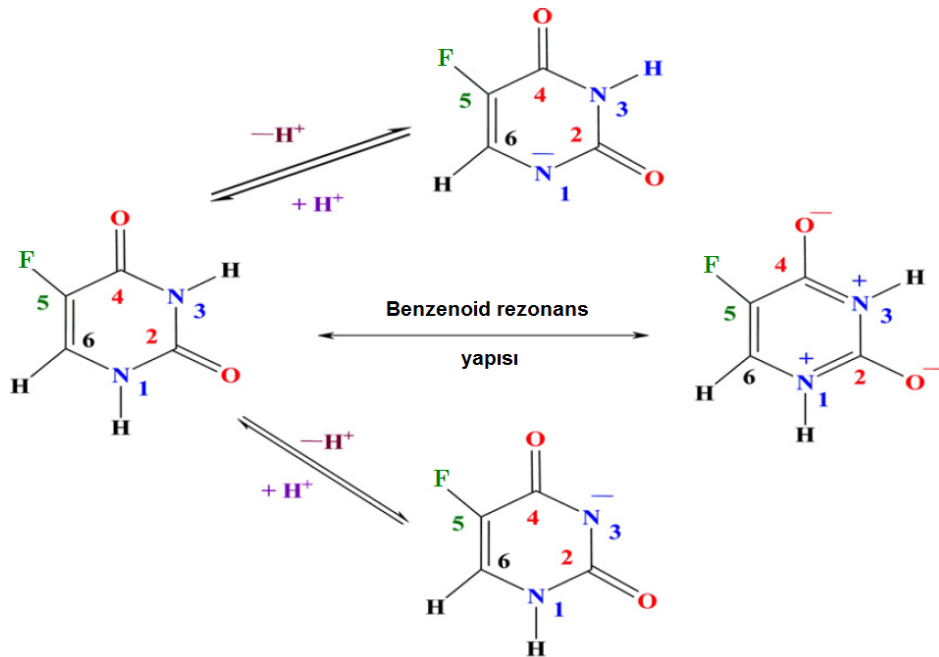
Şekil 4.2. MAH monomerinin sentez tepkime mekanizması

MAH monomerinin yapısını saptamak için  $^1\text{H-NMR}$  yöntemi kullanıldı. Şekil 4.3'de  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu MAH monomerinin gruplarına özgün pikleri göstermektedir.



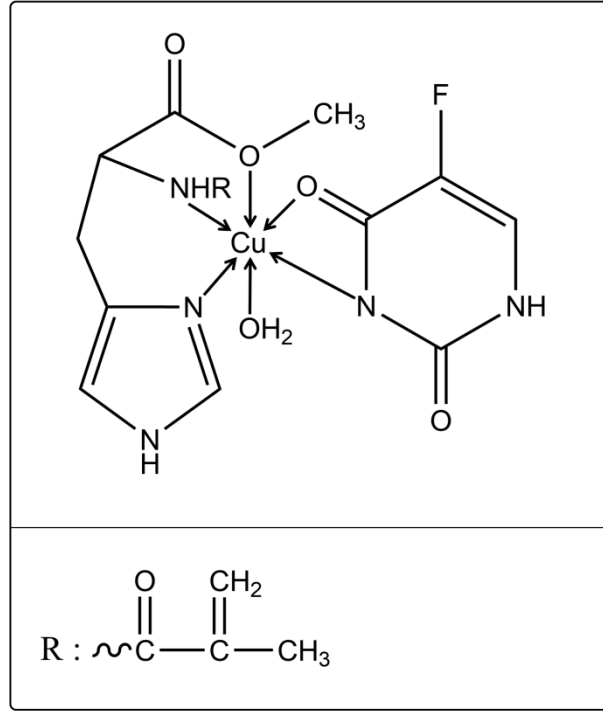
Şekil 4.3. MAH monomerinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu.

Kriyojel disklerin hazırlanmasındaki bir diğer evre de MAH- $\text{Cu}^{2+}$  kompleksinin florourasil ile önorganizasyonudur. Genel olarak, florourasil,  $\text{N}_1 - \text{H}$ ,  $\text{C}_2 = \text{O}$ ,  $\text{N}_3 - \text{H}$ ,  $\text{C}_4 = \text{O}$  olmak üzere 4 adet koordinasyon bölgesine sahiptir. (Şekil 4.4) [75]. MAH- $\text{Cu}^{2+}$ /florourasil kompleksinin kuramsal yapısı Şekil 4.5' de belirtilmiştir.



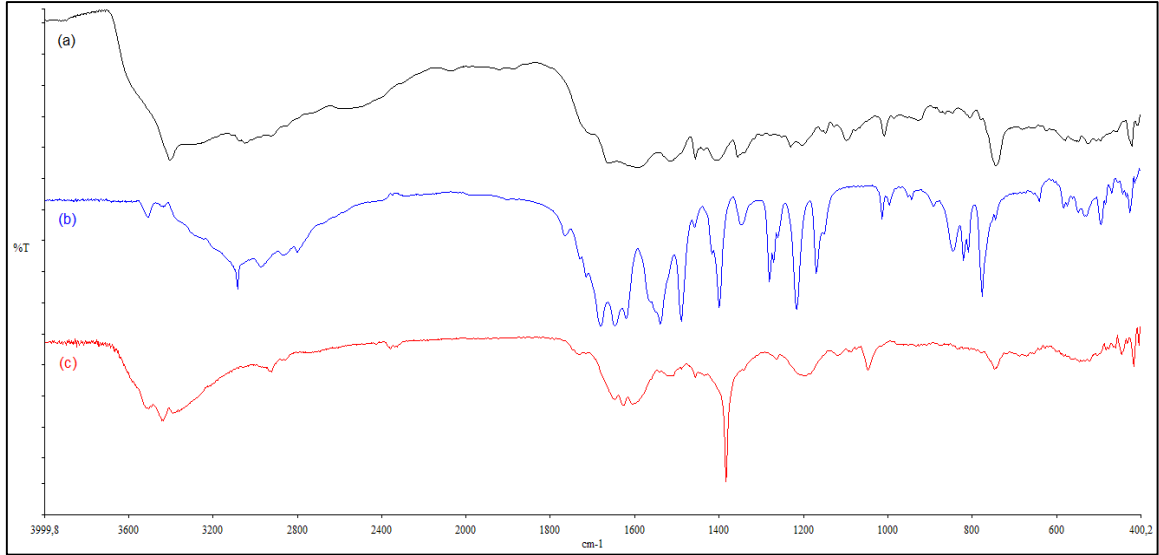
Şekil 4.4. Florourasilin protonasyon ve deprotonasyon bölgeleri ( $\text{N}_1$  ve  $\text{N}_3$ ) [75].





Şekil 4.5. MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kompleksinin öngörülen yapısı [75].

Şekil 4.6'da MAH monomerinin, florourasilin ve MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kompleksinin FTIR spektrumları verilmiştir. MAH'a ait spektrum incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1716 ve 1662 cm<sup>-1</sup>'de, amid gerilme titreşim bandı ise 1513 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. (Şekil 4.6.a) Bununla birlikte, 3407 cm<sup>-1</sup>'de N-H gerilme bandı, 3000-3100 cm<sup>-1</sup>'de aromatik ve alifatik C-H gerilme bandından dolayı geniş bir pik görülmektedir. İmidazol grubuna ait aromatik C=C gerilme bandı ise 1593 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmektedir. 1716 cm<sup>-1</sup>'de ise ester bandı görülmektedir. Florourasile ait spektrumda 3657 ve 3510 cm<sup>-1</sup>'deki pikler N-H gerilme bandından kaynaklanmaktadır. (Şekil 4.6.b) Karbonil bandları 1681 ve 1641 cm<sup>-1</sup>'de ve karakteristik C-F gerilme bandı 1400 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kompleksine ait FTIR spektrumu incelendiğinde MAH ve FU her ikisi de amid, karbonil, aromatik halka gibi fonksiyonel gruplara sahip olmasından ötürü bu gruplara ait pikler spektrumda yayvan pikler halinde görülmüştür. (Şekil 4.6.c) Bundan başka, karakteristik C-F gerilme bandı (1384 cm<sup>-1</sup>'de) kompleksin spektrumunda da belirgin bir şekilde gözlenmiştir.



Şekil 4.6. FTIR spektrumları; (a) MAH monomeri, (b) FU, (c) MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil.

Daha sonra HEMA ve MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kullanılarak poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojeller sentezlenmiştir.

#### 4.1.2. Florourasil Baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) Kriyojel Disklerin Karakterizasyonu

Florourasil baskılanmış poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel diskler HEMA ve MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kullanılarak kopolimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Hazırlanan kriyojel diskler, yüzey alanı ölçümleri, şişme deneyleri, SEM, FTIR, DSC, XRD yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

##### 4.1.2.1. Yüzey Alanı Ölçümü

Yüzey alanı ve gözenek boyutu dağılımı moleküler baskılanmış polimerlerde önemli parametrelerdir. Bu özellikler sıvı azot sıcaklığında azot adsorpsiyon/desorpsiyon izotermi ve 0.005-1.0 arası bağıl basınçları (P/P<sub>0</sub>) ile ölçülmüştür. Farklı çapraz bağlayıcı miktarlarına sahip PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin yüzey alanları ölçülmüştür. Çizelge 4.1'de de belirtildiği gibi çapraz bağlayıcı miktarı azaldıkça spesifik yüzey alanı artmaktadır.

Çizelge 4.1: PHEMA ve farklı çapraz oranlarına sahip P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin yüzey alanı.

Polimer kodu	Yüzey Alanı (m <sup>2</sup> /g)
PHEMA-4	10.5
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-4	12.4
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-8	15.2
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-16	16.1

#### 4.1.2.2. Şişme Deneyi

Kriyojel diskler suya bırakıldığında birkaç saniye içerisinde şişerek orjinal boyutlarını alırlar. Bu çalışmada farklı oranlarda çapraz bağlama/fonksiyonel monomer içeren PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin şişme ve makrogözeneklilik oranlarına bakıldı. Çizelge 4.2'den de görüldüğü üzere çapraz bağlayıcı miktarı arttıkça şişme oranı azalmaktadır. Bunun en önemli nedeni, çapraz bağlayıcı miktarının artması kriyojeldeki çapraz bağ yoğunluğunun artmasına ve dolayısıyla polimerik yapının daha sert olmasına yol açar. Yoğun çapraz bağların olduğu ortamda suyun difüzyonu zorlaşır ve kriyojelin şişme oranı azalır. İkinci olarak, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan MBAAm hidrofobik yapıdadır. Kriyojelde MBAAm oranının artması suyu daha az seven grupların polimer yapısında artması demektir.

PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin şişme oranları karşılaştırıldığında P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) disklerinin şişme oranının daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuçta çeşitli faktörler etkili olabilir. Birincisi baskılama ile birlikte polimerik yapıda moleküler nano-oyuklar meydana gelir ve bu durum spesifik yüzey alanının artmasına neden olur. İkinci olarak baskılama ile birlikte MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksinin HEMA ile tepkimesi polimer zincirinin uzunluğunu etkili bir biçimde artırmaktadır. Böylece su molekülleri polimer zincir içerisine kolaylıkla girebilir ve bu durum şişme derecesinin artmasına olanak sağlar.

Çizelge 4.2: Farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel diskler için denge şişme ve makrogözenek oranları.

Polimer kodu	Şişme oranı (%)	Makrogözenek oranı (%)
PHEMA-4	753	69.80
PHEMA-8	837	77.58
PHEMA-16	898	80.31
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-4	785	74.56
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-8	868	79.75
P(HEMA-MAH-Cu <sup>2+</sup> )-16	922	82.71

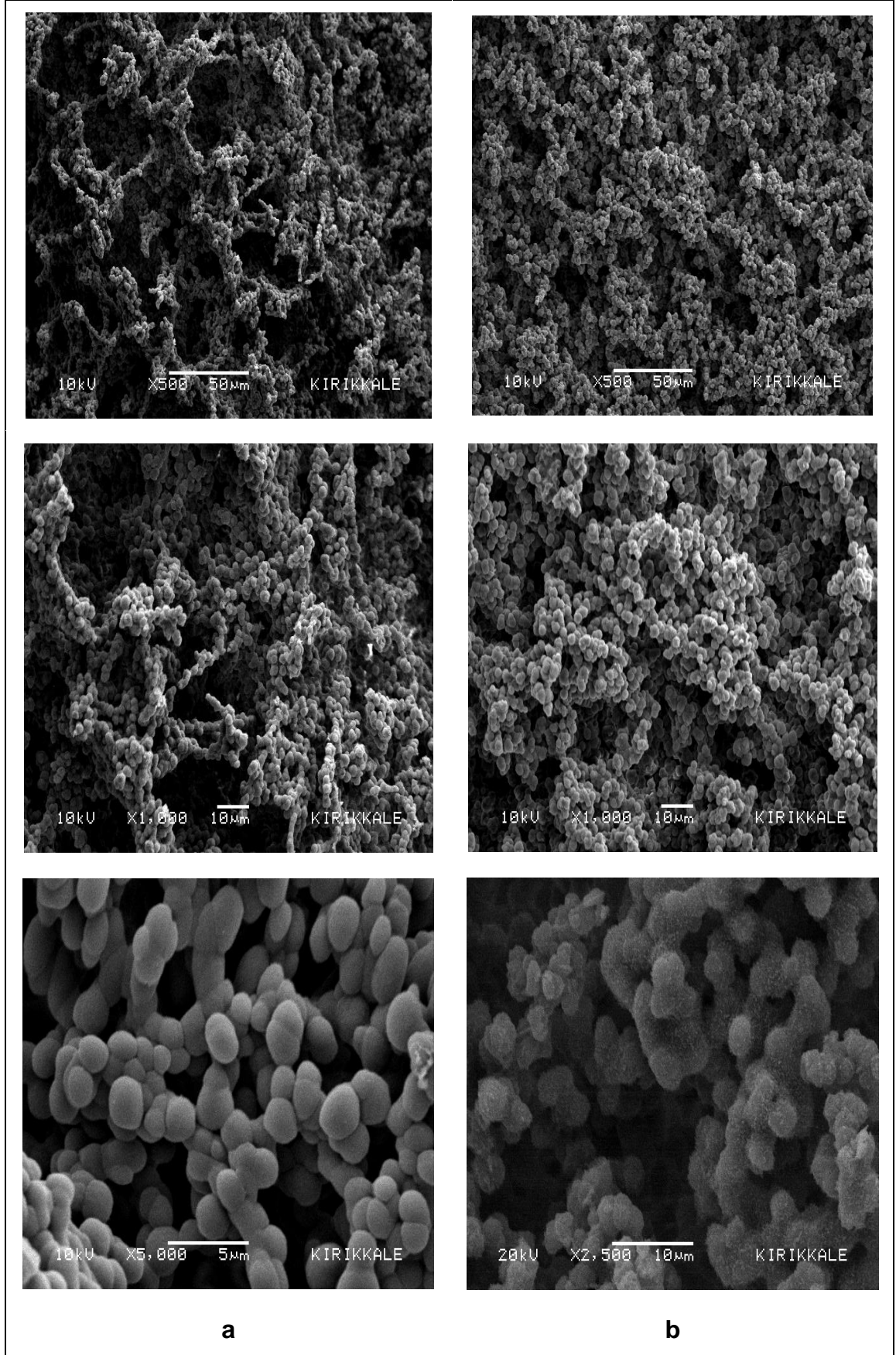
#### 4.1.2.3. Yüzey Morfolojisi

PHEMA kriyojelin ve florourasil baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojelin yüzey morfolojisi ve içyapısı optik ve taramalı elektron mikroskop fotoğrafları ile incelenmiştir. Şekil 4.7'de de görüldüğü gibi, P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojelin (sağdaki disk) yapısındaki Cu(II) iyonlarının varlığı renkteki değişiklikten (açık mavi) açıkça görülmektedir.



Şekil 4.7. PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin optik fotoğrafları.

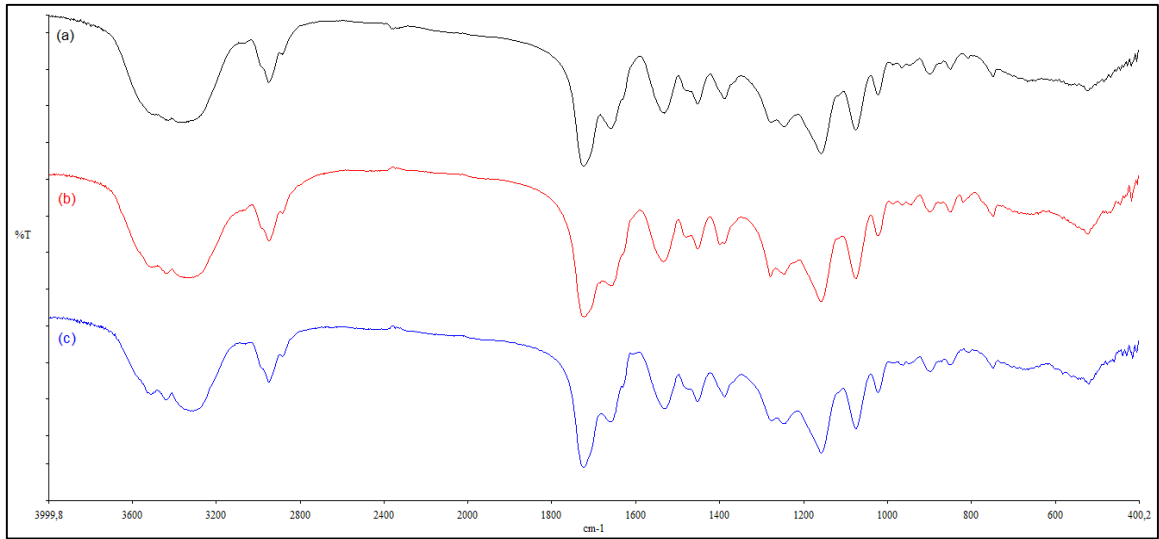
PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin SEM fotoğrafları Şekil 4.18'de verilmiştir. Yeterli büyüklükte gözeneklere sahip kriyojel disklerden florourasil salımı hiçbir engel teşkil etmeden gerçekleşebilmektedir.



Şekil 4.8. SEM fotoğrafları. (a) PHEMA kriyojel ve (b) florourasil baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel.

#### 4.1.2.4. FTIR ile Yapı Analizi

Poli(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>)'ya ait FTIR spektrumunda; N-H gerilme pikleri (3432 ve 3511 cm<sup>-1</sup>), OH gerilme (3359 cm<sup>-1</sup>), alifatik CH gerilme (2951 cm<sup>-1</sup>), ester (C=O) gerilme (1724 cm<sup>-1</sup>), C=C gerilmesi (1659 cm<sup>-1</sup>), asimetrik CH<sub>2</sub> ve CH<sub>3</sub> bükülmesi (1533 ve 1454 cm<sup>-1</sup>), düzlem içi CH bükülmesi (1388 cm<sup>-1</sup>), eter (COC) asimetrik gerilme (1278 ve 1248 cm<sup>-1</sup>) ve düzlem dışı CH bükülme (900 cm<sup>-1</sup>) bandları görülmektedir (Şekil 4.9.a). MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kompleksi yüklü poli(HEMA)'ya ait spektrumda OH gerilme bandı genişleyip 3327 cm<sup>-1</sup>'e kaymıştır (Şekil 4.9.b).

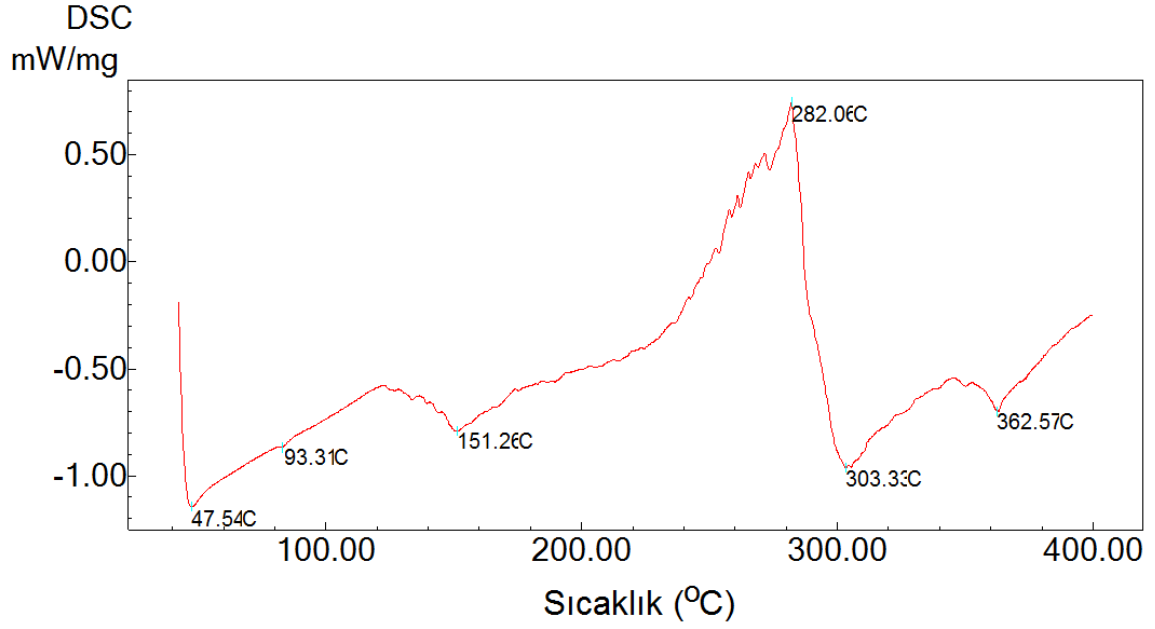


Şekil 4.9. FTIR spektrumları; (a) P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>), (b) MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kompleksi yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>), (c) salım sonrası P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>).

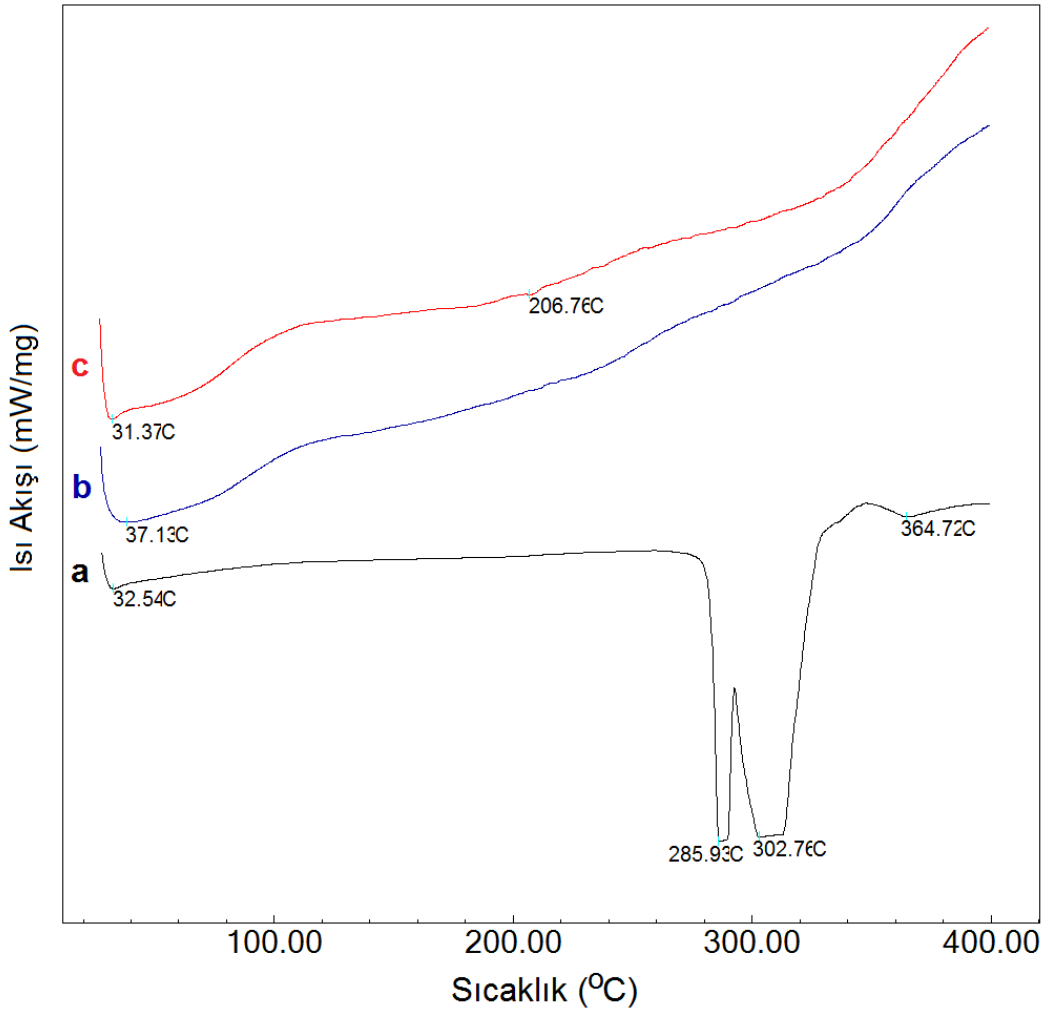
#### 4.1.2.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)

Numune fiziksel veya kimyasal bir değişikliğe uğradığı zaman entalpide bu değişikliklere bağlı bir değişim gözlenir. Örnek ısıtılırken, soğutulurken veya sabit bir sıcaklıkta tutulurken soğurulan veya salınan enerji miktarı diferansiyel taramalı kalorimetri cihazı (DSC) ile ölçülür. MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kompleksinin ve (a) FU, (b) boş P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel ve (c) FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojelin DSC termogramları sırasıyla Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir. Şekil 4,10'da fiziksel adsorbe olmuş su, yapıyı 93°C'da terketmiştir. Örnekler liyofilizatörde kurutulduğu için bu pik çok belirgin görünmemiştir. 151°C'daki pik, hetero atomlardan oluşan fonksiyonel grupların kütle kaybına ait olabilir (deaminasyonu ve dekarboksilasyonu). 303°C'daki pik saf florourasilin DSC piki ile örtüşmektedir.

362°C'daki pik monomerin bozulmasına dayandırılabilir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi saf florourasilin erime piki 285.93°C'da gözlenmiştir. Ancak ilaç yüklü polimerde florourasile ait karakteristik pik gözlenmemiştir. Bu durum ilacın kriyojel matriksinde moleküler düzeyde dağıldığına kanıt olarak gösterilebilir [76, 77].



Şekil 4.10. MAH-Cu<sup>2+</sup>/florourasil kompleksinin DSC termogramı.



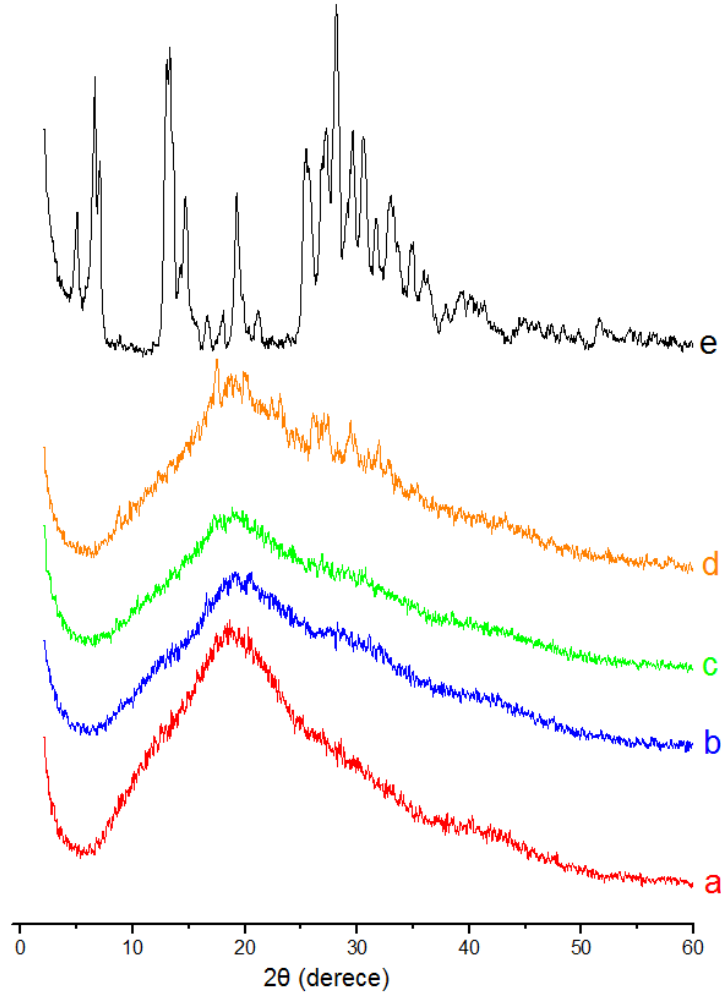
Şekil 4.11. DSC termogramları; (a) FU, (b) boş P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel ve (c) FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel.

#### 4.1.2.6. X-Işınları Difraktrometresi (XRD)

X-Işını Kırınım yöntemi (XRD), her bir kristalin fazın kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak X-ışınları karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Kriyojel disklerdeki florourasil dağılımının incelenmesinde X-ışını kırınım yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.12'de florourasil, boş P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) ve üç farklı miktarda ilaç yüklemesine sahip örneklerin desenleri verilmiştir. İlaç yüklü olmayan örneğin kırınım deseninde belirgin piklerin olmayışı, polimer yapının amorf karakterde olduğunu kanıtlar. Florourasile ait kırınım deseninden görüldüğü üzere ilaç kristalin karaktere sahiptir. İlaç yüklü örneklerin kırınım desenleri incelendiğinde, florourasile ait pikler gözlenmemektedir. Bu durum ilacın polimer ağına moleküler



düzeyde dağıldığını göstermektedir [76, 78]. Diğer yandan artan yükleme oranıyla birlikte yapıdaki ilaç dağılımında artış görülmektedir [79].

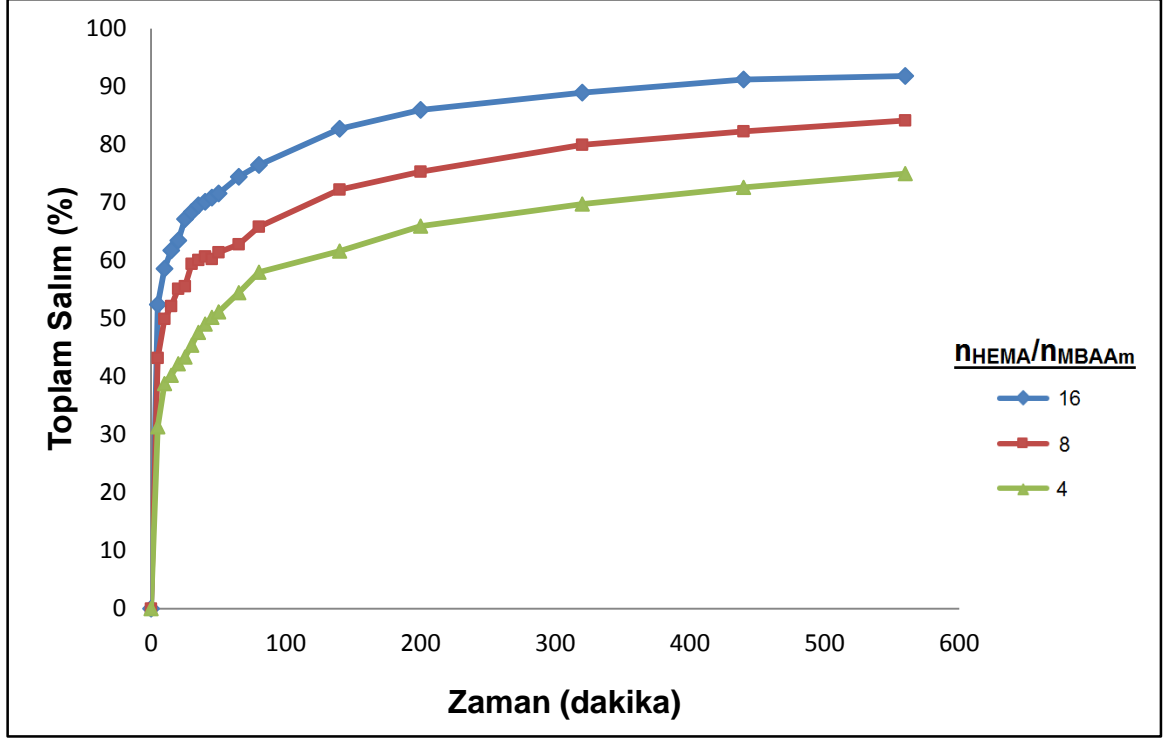


Şekil 4.12. XRD desenleri; (a) boş P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>), (b) 50 µg/mL FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>), (c) 100 µg/mL FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>), (d) 200 µg/mL FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojeller ve (e) FU.

## 4.2. Salım Deneyleri ve Sonuçları

### 4.2.1. Çapraz Bağlama Miktarının Salıma Etkisi

Polimerik yapının sahip olduğu çapraz bağlayıcı miktarı salım hızını etkileyen parametreler arasında yer almaktadır. Bu çalışmada kriyojellik polimer sisteminde kontrollü çapraz bağ oluşumunu sağlamak amacıyla molce üç farklı oranda MBAAm ( $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}} = 4, 8, 16$ ) kullanılmıştır. Bunun amacı farklı miktarlardaki çapraz bağlayıcının polimer yapısına ve salım kinetiğine etkisini incelemektir.



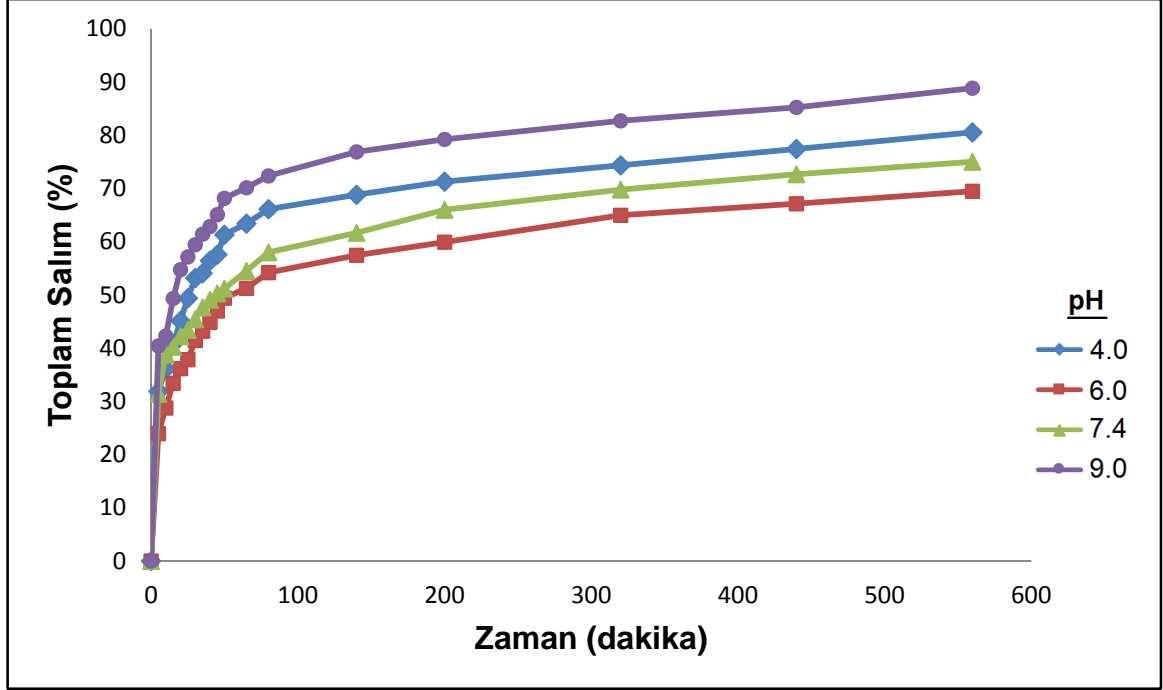
Şekil 4.13.  $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$  oranının toplam salıma etkisi (pH=7.4 PBS, T=37°C).

Şekil 4.13.'ten de anlaşılacağı üzere, MBAAm oranı arttıkça salım hızı düşmüştür. Bu sonuç, şişme deneyleriyle de uyumlu olup; MBAAm miktarının artmasının yapının çapraz bağ oranını arttırdığını göstermektedir. Çapraz bağ oranının artmasıyla daha sert bir yapı ortaya çıkmış ve bu durum toplam salım hızını düşürmüştür. Öte yandan hidrofobik MBAAm'in yapıdaki oranının artmasıyla hidrofobik etkileşimlerin moleküler baskılamadaki etkisi artmış olabilir. Böylelikle de salım hızında düşüş gözlenmiş olabilir.

Molce  $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}$  oranı 4 olan kriyojel diskler salım hızı yönünden en uygun oldukları için bundan sonraki çalışmalarda bu kriyojeller kullanılmıştır.

#### 4.2.2. pH Değişiminin Salıma Etkisi

Bu bölümde salım ortamı pH'ının, salım hızı ve salınan ilaç miktarı üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla florourasil (100 µg/mL) yüklenmiş P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerden 4 değişik pH'da (4.0, 6.0, 7.4 ve 9.0'da) ilaç salımı incelenmiştir.

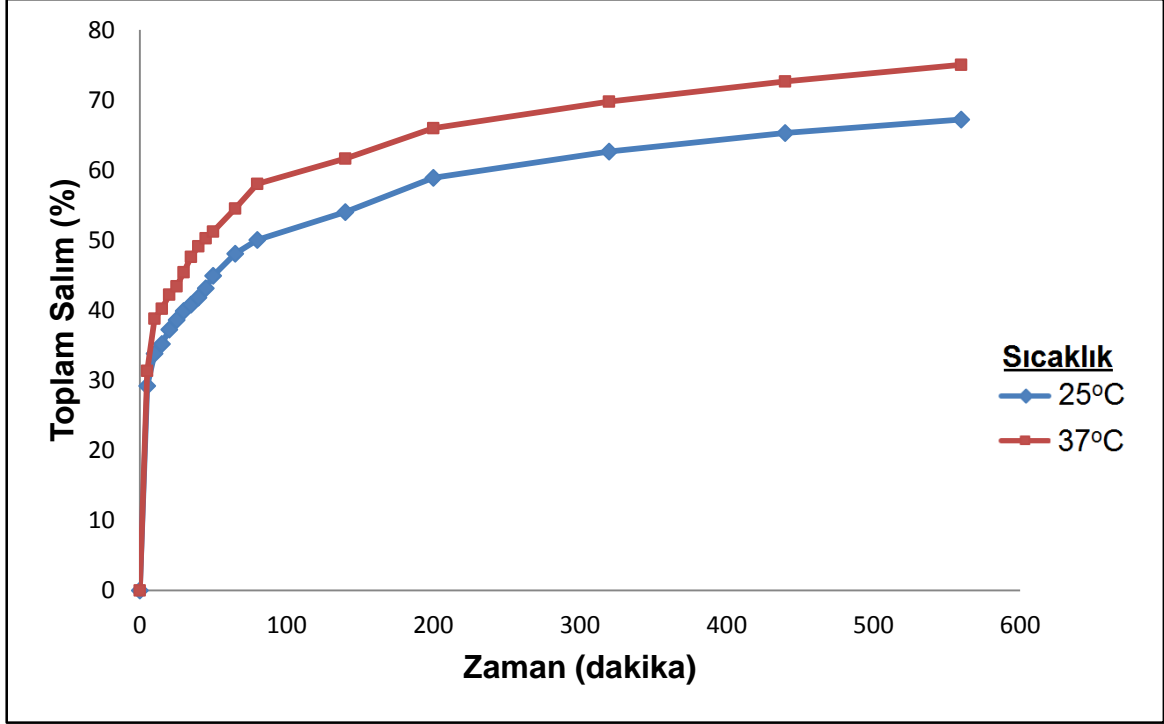


Şekil 4.14. pH'ın toplam salıma etkisi ( $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=4$ ,  $T=37^{\circ}\text{C}$ ).

Koordine kovalent etkileşimler ortamın pH değerlerinden etkilenirler. Florourasil, N<sub>1</sub> ve N<sub>3</sub> bölgelerinden deprotonasyona uğrama eğilimine sahiptir (Şekil 4.4). Öte yandan bakır(II) iyonu, florourasil ile yüksek oranda N<sub>1</sub> ve daha az olmak üzere C<sub>4</sub>'e bağlı oksijen yoluyla metal şelat bağı oluşturur (Şekil 4.5). Bu durumdan anlaşılacağı üzere proton, bakır(II) iyonu için bir nevi yarışmacı ajan görevi görür. Salım hızının pH 4.0'da pH 6.0 ve 7.4'ten daha hızlı olmasının sebebi bu durumla açıklanabilir. pH değerlerine bağlı toplam salım hızı grafiğinde dikkat çeken bir diğer husus da pH 9.0'da salımın en hızlı şekilde gerçekleşmiş olmasıdır. Burada da pH 4.0'daki duruma benzer bir durum söz konusudur. Hidroksi (-OH) iyonları belli bir derişimin üzerine çıktığı zaman ligand olarak Cu(II) iyonuna bağlanırlar. pH 8.5'un üzerindeki değerlerde Cu(II) iyonu bakır hidroksit [Cu(OH)<sub>2</sub>] olarak çökmeye başlar [75]. Bundan başka, florourasilin çözünürlüğü pH arttıkça artar. Bu iki sebepten dolayı % toplam salım hızı pH 9.0'da en yüksektir.

### 4.2.3. Sıcaklığın Salıma Etkisi

Salım kinetiği incelenirken üzerinde durulan bir diğer parametre de salım ortamının sıcaklığının salım üzerindeki etkisidir. Bu çalışma için, aynı miktar (100 µg/mL) ilaç yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerden 37.0°C ve oda sıcaklığındaki ilaç salım davranışları incelenmiştir.

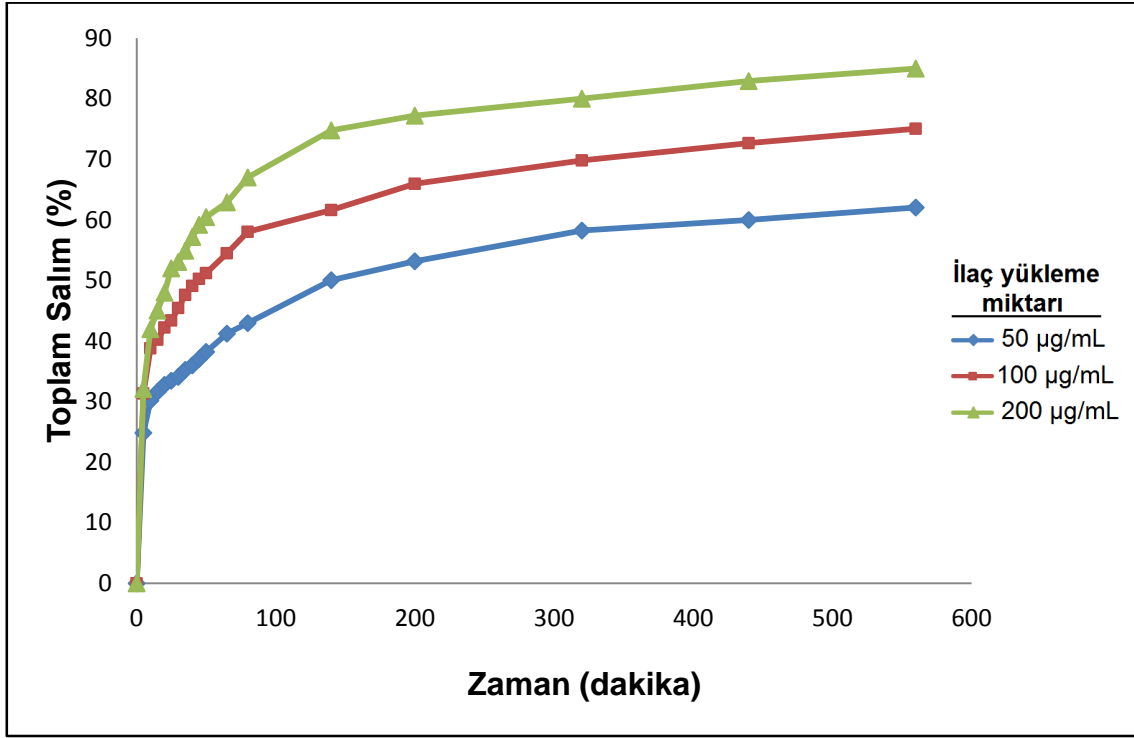


Şekil 4.15. Sıcaklığın toplam salıma etkisi (pH=7.4, n<sub>HEMA</sub>/n<sub>MBAAm</sub>=4).

Grafik incelendiğinde, iki farklı sıcaklıktaki burst etkisine bağlı olarak salım hızı farklılığı özellikle ilk dakikalarda daha belirgindir. Ancak ilerleyen dakikalarda salım hızı eğimi birbirine yakındır. Polimerik sistemde baskılanmış ilaç molekülleri ile birlikte polimerleşme esnasında moleküler baskılamaya katılmayan belli bir orandaki ilaç molekülleri de mevcuttur. Baskılamaya katılmayan bu ilaç molekülleri ortam sıcaklığının artmasıyla daha kolay difüzlenip salınmış olabilirler ve bu durum da ilk dakikalardaki sıcaklığa bağlı salım hızı farkını artırmış olabilir. Diğer yandan, ilerleyen dakikalardaki sıcaklığa bağlı salım hızı farkının azalmasının nedeni metal-şelat etkileşiminin sıcaklıktan daha az etkilenmiş olmasından dolayı olabilir.

#### 4.2.4. İlaç Yükleme Miktarının Salıma Etkisi

İlaç salım hızını etkileyen önemli parametreler arasında polimerik sisteme başlangıçta yüklenen ilaç miktarı yer almaktadır. Kriyojel disklerden florourasil salımının incelendiği bu çalışmada, üç farklı derişimde (50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL) florourasil, komonomer karışımına ilave edilmiştir. Yükleme oranının salım kinetiğine etkisinin belirlenebilmesi amacıyla; salım pH'ı (pH 7.4 PBS) ve sıcaklığı (T=37°C) sabit tutulmuştur.



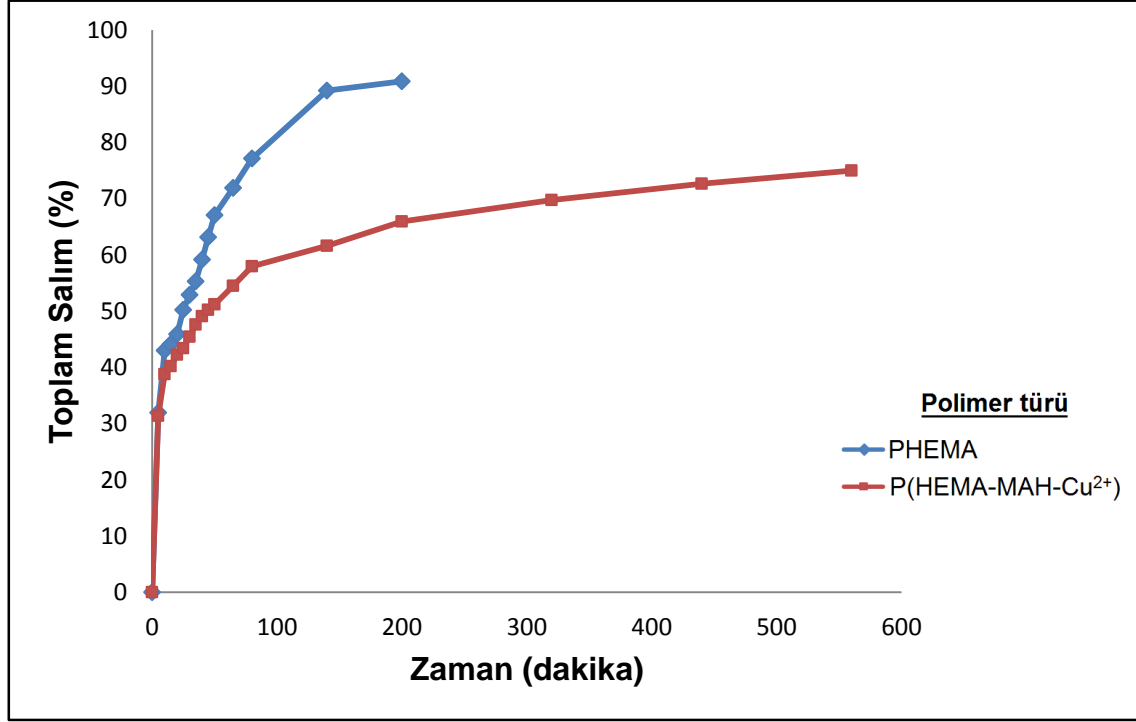
Şekil 4.16. İlaç yükleme oranının toplam salıma etkisi ((pH=7.4 PBS,  $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=4$ , T=37°C).

Dikkat edileceği gibi ilaç yükleme miktarının artması ile birlikte salım hızı da artmaktadır. Bu beklenen bir sonuç olup, polimer sistemdeki ilaç miktarının artması ile florourasilin kriyojel diskten difüzyonu için sürücü gücün (derişim farkı) artışı ile açıklanabilir.

#### 4.2.5. MAH-Cu<sup>2+</sup> Kompleksinin Salıma Etkisi

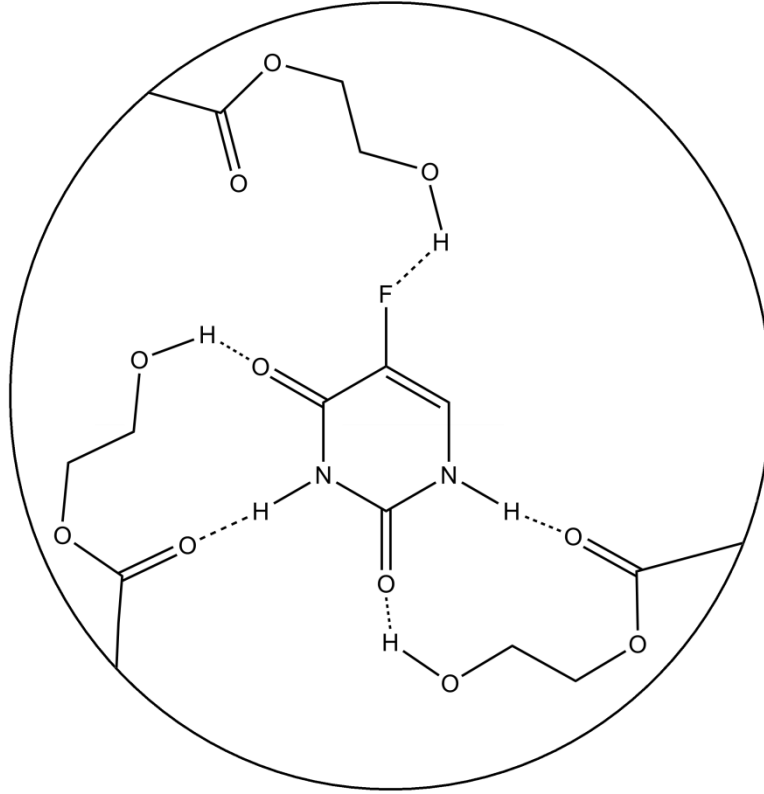
Metal şelat etkisinin salım üzerindeki etkisini incelemek amacıyla PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) olmak üzere iki farklı tür kriyojelik yapı sentezlenmiştir. Her iki

kriyojel yapısına da eşit miktarda (100 µg/mL) florourasil eklenmiş ve 37.0°C'da pH=7.4 fosfat tamponu ortamında salım hızları incelenmiştir.



Şekil 4.17. Polimer türlerinin toplam salıma etkisi (pH=7.4 PBS,  $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}}=4$ ,  $T=37^{\circ}\text{C}$ ).

Toplam salım grafiği incelendiğinde PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin salım hızları arasında belirgin bir fark gözlenmiştir. Bunun temel nedeni olarak moleküler baskılama esnasında tercih edilen etkileşimler gösterilebilir. PHEMA kriyojelde ilaç Şekil 4.18'de öngörülen hidrojen bağları gibi kovalent olmayan etkileşimler sayesinde baskılanmıştır. Buna benzer etkileşimler P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) için de öngörülmeyle birlikte, bu polimerik sistem için Şekil 4.5.'de kuramsal yapısı verilen koordine kovalent bağların etkisi büyüktür. Metal iyon etkileşimleri, bağlanma gücü, seçiciliği ve yönlendirme açısından sulu çözeltilerdeki elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağları ile karşılaştırıldığında kovalent etkileşimlere daha çok benzemektedir. Bununla birlikte, kalıp molekülün yapıdan uzaklaştırılması kovalent baskılamada olduğu kadar güçlü değildir [80].



Şekil 4.18. Florourasilin PHEMA ile öngörülen kovalent olmayan etkileşimleri.

#### 4.2.6. Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

Polimerik jel sisteminde çevreden su absorpsiyonu sistemin boyutlarını ve fizikokimyasal özelliklerini ve dolayısıyla ilaç salım kinetiğini değiştirir. Şişebilen polimerik sistemlerden ilaç salımını modelleyen birçok matematiksel model bulunmasına rağmen, tek bir model tek başına bütün deneysel gözlemleri tahmin edebilecek kadar başarılı değildir. En karmaşık modeller dahi uygun formülü vermemeleri ve pek çok çözüm tekniğine ihtiyaç duyduğu için, ilaç salımında genelleşmiş ampirik eşitlikler sıkça kullanılmaktadır [81].

Bu çalışmada kriyojellerin salım mekanizmasının belirlenmesi amacıyla Bölüm 2.1.2'de de ayrıntılı olarak yer verilen, Peppas tarafından tanımlanan "Eşitlik 4.1." kullanılmıştır. Makromoleküler gevşemenin ilaç salım mekanizması üzerindeki bağıl etkisi, deneysel verilerin bu eşitliğe modifiye edilmesiyle kolayca tayin edilebilir. Ancak bu eşitlik, salınan toplam ilaç miktarının ilk % 60'ı için uygulanabilir. Burada;  $M_t$  ve  $M_\infty$ , sırasıyla  $t$  anında ve dengede salınan ilaç miktarını,  $k$  orantı sabitini ve  $n$  difüzyonel üsteli göstermektedir [82].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4.1.)$$

“Eşitlik 4.1.” çözücünün polimerdeki genel transport davranışını tanımlamak için kullanılır ve n değerine bağlı olarak difüzyon mekanizmasının türünü açıklar. n üsteli, bu eşitlikteki verilerin logaritmik ekseninde grafiğe geçirilmesi ve lineer regresyon ile doğru eğiminin hesaplanmasıyla bulunmuştur. Çizelge 4.3’de florourasil içeren kriyojel disklerden farklı koşullarda salımına yönelik n ve k değerleri, regresyon katsayılarıyla birlikte sunulmuştur. Çizelgeden de açıkça görüldüğü gibi, n değerlerinin 0,45’den küçük olduğu belirlenmiştir. Bu durum ilacın kriyojel disklerden non-Fickian türü bir difüzyon mekanizmasıyla salındığına işaret eder. Benzer sonuçlar Singh ve arkadaşları tarafından da gözlenmiştir [81].



Çizelge 4.3: Tüm farklı polimerik sistemler için n, k ve R<sup>2</sup> değerleri.

	<b>n</b>	<b>k</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>n<sub>HEMA</sub>/n<sub>MBAAm</sub> (mol)</b>			
16	0.150	0.413	0.997
8	0.165	0.335	0.983
4	0.208	0.229	0.985
<b>pH</b>			
4.0	0.290	0.192	0.985
6.0	0.264	0,164	0.967
7.4	0.208	0.229	0.985
9.0	0.235	0.265	0.935
<b>Sıcaklık (°C)</b>			
25.0	0.186	0.215	0.994
37.0	0.208	0.229	0.985
<b>İlaç Yükleme Oranı FU (µg/mL)</b>			
<b>50</b>	0.201	0.179	0.985
<b>100</b>	0.208	0.229	0.985
<b>200</b>	0.290	0.206	0.968
<b>Polimer Türü</b>			
<b>PHEMA</b>	0.279	0.209	0.962
<b>P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>)</b>	0.208	0.229	0.985

## 5. YORUM

Sunulan çalışmada, vücut dışına yakın bölgelerde bulunan tümörlerin bölgesel kemoterapisinde kullanılmak üzere antikanser ilaç yüklü kriyojel diskler üretilmiştir. Bu amaç doğrultusunda; öncelikle farklı özelliklerde kriyojel diskler sentezlenmiş; sonrasında ise bir antineoplastik ilaç olan FU'nun bu sistemlerdeki salım profili incelenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- MAH monomeri (L)-histidin metil ester ile metakrilol klorürün tepkimesiyle sentezlenmiş ve ardından FU ile bakır(II) aracılığıyla kompleks oluşturulmuştur. Elde edilen monomer ve MAH-Cu<sup>2+</sup>/FU kompleksi FTIR çalışmaları ile karakterize edilmiştir. MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1716 ve 1662 cm<sup>-1</sup>'de, amid gerilme titreşim bandı ise 1513 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. Bununla birlikte, 3407 cm<sup>-1</sup>'de N-H gerilme bandı, 3000-3100 cm<sup>-1</sup>'de aromatik ve alifatik C-H gerilme bandından dolayı geniş bir pik görülmektedir. İmidazol grubuna ait aromatik C=C gerilme bandı ise 1593 cm<sup>-1</sup>'de gözlenmektedir. 1716 cm<sup>-1</sup>'de ise ester bandı görülmektedir. MAH-Cu<sup>2+</sup>/FU kompleksine ait FTIR spektrumu incelendiğinde MAH ve FU her ikisi de amid, karbonil, aromatik halka gibi fonksiyonel gruplara sahip olmasından ötürü bu gruplara ait pikler spektrumda yayvan pikler halinde görülmüştür. Bundan başka, karakteristik C-F gerilme bandı (1384 cm<sup>-1</sup>'de) kompleksin spektrumunda belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Bu spektumlar hedeflenen monomerin ve kompleksin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.
- PHEMA ve FU baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) sistemlerinin hazırlanmasında sıfırın altındaki sıcaklıklarda polimerizasyon (kriyopolimerizasyon) tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemle farklı çapraz bağlayıcı oranlarına ve farklı ilaç miktarlarına sahip kriyojel diskler üretilmiştir.
- Hazırlanan kriyojel disklerin kısa sürede suda şişerek son boyutlarına ulaştığı gözlenmiştir. Disklerin denge şişme oranları incelendiğinde çapraz bağlayıcı oranının artması ile şişme oranı azalmıştır. Polimerik yapıda çapraz bağlayıcı miktarının artmasına bağlı olarak diskler daha sert bir yapıya sahip

olmaktadır. Kopolimerlerin şişme oranları, PHEMA kriyojellerinkinden daha yüksek çıkmıştır.

- PHEMA ve FU baskılanmış farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı içeren P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin yüzey alanları incelenmiştir. PHEMA'nın yüzey alanı 10.5 m<sup>2</sup>/g iken n<sub>HEMA</sub>/n<sub>MBAAm</sub> molce oranı 4, 8 ve 16 olan kriyojel disklerin yüzey alanları sırasıyla 12.4 m<sup>2</sup>/g, 15.2 m<sup>2</sup>/g ve 16.1 m<sup>2</sup>/g olarak bulunmuştur. Sonuçlardan da görüldüğü üzere yapıda çapraz bağlayıcının artması yüzey alanının azalmasına neden olmuştur.
- PHEMA ve FU baskılanmış P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerin yüzey morfolojisi ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile tanımlanmıştır. SEM fotoğrafları incelendiğinde ilacın polimer matriksinde homojen bir şekilde dağıldığı ve yeterli büyüklükte gözeneklere sahip kriyojel disklerden ilaç salımı hiçbir engel teşkil etmeden gerçekleşebileceği görülmüştür.
- FU'nun, boş P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojelin ve FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojelin, diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve X-ışınları difraktometresi (XRD) spektrumları incelenmiştir. Bu veriler ışığında ilacın aktivitesini kaybetmeden kriyojel matrikste homojen bir şekilde dağıldığı söylenebilir.
- Farklı özelliklere sahip kriyojel disklerden ilaç salım hızının çapraz bağlayıcı oranı, ortam pH'ı ve sıcaklığı, ilaç yükleme miktarı ve ilaç polimer etkileşimleri ile değiştiği gözlenmiştir. Molce üç farklı oranda çapraz bağlayıcı içeren (n<sub>HEMA</sub>/n<sub>MBAAm</sub> = 4, 8, 16) kriyojel diskler üretilmiştir. Çapraz bağlayıcı oranı arttıkça daha sert bir polimerik yapı ortaya çıkmış ve böylece salım hızı düşmüştür. Ortam pH'ının, salım hızı ve salınan ilaç miktarı üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerden 4 değişik pH'da (4.0, 6.0, 7.4 ve 9.0'da) ilaç salımı incelenmiştir. En yavaş salım pH 6.0'da, en hızlı salım pH 9.0'da gerçekleşmiştir. Bir levis asit-baz etkileşimi olan koordine kovalent bağın ortamdaki proton miktarına bağlı olarak metal-ligand etkileşimleri değişmektedir. Bundan başka, pH

8.5'un üstünde Cu(II) metalinin,  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  olarak çökmesi pH 9.0'da salım hızının yüksek olmasına neden olmuştur. Ortamın salıma etkisini incelemek için değerlendirilen bir diğer parametre de sıcaklıktır. Bu amaçla 37.0°C ve oda sıcaklığındaki ilaç salım davranışları incelenmiştir. Burst (ani) salım olan kısımda sıcaklığın etkisi görülürken, ilerleyen dakikalarda bu etki minimuma inmiştir. Polimerdeki ilaç yükleme oranı arttıkça salım hızı da artmıştır. Polimer sistemdeki ilaç miktarının artması ile ilacın kriyojel diskten difüzyonu için gereken sürücü güç (derişim farkı) artmıştır. Derişim farkının artması salım hızında artışa neden olmuştur. PHEMA ve P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojellerdeki salım hızı karşılaştırıldığında PHEMA disklerden salımın çok daha hızlı olduğu görülmüştür. Bu durum moleküler baskılama esnasında ilaç ile destek malzemesi arasındaki tercih edilen etkileşimlerden dolayı olmaktadır. P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklere ilaç yüklemesi metal şelat kompleksi şeklinde olurken, PHEMA kriyojel disklere ilaç yüklemesi FU'nun doğrudan polimer oluşumundan hemen önce monomer karışımına eklenmesi şeklinde olmuştur.

- Güç yasasına göre salım mekanizmasının türünü gösteren "n" üsteli 0,5'den küçük bulunmuş, buradan hazırlanan kriyojel disklerde difüzyon mekanizmasının non-Fickian olduğu sonucuna varılmıştır. Rezervuara konulan kriyojel disklerden, burst etkisine bağlı olarak ilk dakikalarda yüksek salım hızlarında, ardından daha düşük hızlarda gerçekleşen salım davranışları ile yüksek oranlarda ilaç salımı gerçekleşmiştir. Takip eden saatlerde ise; disklerden salınan ilaç miktarları değişmemiş, yani salım tamamlanmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Lallemand, F., Felt-Baeyens, O., Besseghir, K., Behar-Cohen, F., ve Gurny, R., Cyclosporine A delivery to the eye: A pharmaceutical challenge. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(3), 307-318, **2003**.
- [2] Pavlukhina, S., Sukhishvili S., Polymer assemblies for controlled delivery of bioactive molecules from surfaces. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(9), 822-836, **2011**.
- [3] Qiu, Y., Park K., Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(3), 321-339, **2001**.
- [4] Serksen, S., West, J., Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(9), 1225-1235, **2002**.
- [5] Yapar, E.A., *In situ oluşum yolu ile meydana gelen enjekte edilebilen implant formunda srekli etkili ila salım sistemlerinin geliştirilmesi*. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2009**.
- [6] Dubey, L., Chianella, I., Dubey, I., Piletska, E., Whitcombe, M. J. ve Piletsky, S., Selective Recognition of Bifunctional Molecules by Synthetic Polymers Prepared by Covalent Molecular Imprinting. *The Open Analytical Chemistry Journal*, 6, 15-21, **2012**.
- [7] Derazshamshir, A., Baydemir, G., Andac, M., Say, R., Galaev, I. Y. ve Denizli, A., Molecularly Imprinted PHEMA-Based Cryogel for Depletion of Hemoglobin from Human Blood. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211, 657-668, **2010**.
- [8] Tang YW, F.G., Wang S, Li J.L., Covalent imprinted polymer for selective and rapid enrichment of ractopamine by a noncovalent approach. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(7), 2275–2282, **2011**.
- [9] Odabaşı, M., Say, R., Denizli, A., Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering: C*, 27(1), 90-99, **2007**.
- [10] Baydemir, G., Bereli, N., Anda, M., Say, R., Galaev, I.Y., ve Denizli, A., Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 33-38, **2009**.
- [11] Formica, V., Palmirota, R., Monte, G., Savonarola, A., Ludovici, G., De Marchis, M.L., Grenga, I., Schirru, M., Guadagni, F., ve Roselli, M., Predictive value of VEGF gene polymorphisms for metastatic colorectal cancer patients receiving first-line treatment including fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab. *International Journal of Colorectal Disease*, 26(2), 143-151, **2011**.
- [12] Shih Y.T., Elting L.S., Pavluck A.L., Stewart A., ve Halpern M.T., Immunotherapy in the Initial Treatment of Newly Diagnosed Cancer Patients: Utilization Trend and Cost Projections for Non-Hodgkin's Lymphoma, Metastatic Breast Cancer, and Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Investigation*, 28(1), 46-53, **2010**.

- [13] Chan, L.P., Chou, T.-H., Ding, H.-Y., Chen, P.R., Chiang, F.Y., Kuo, P.-L., ve Liang, C.H., Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(7), 1081-1091, **2012**.
- [14] Takahashi, S., Kato, K., Nakamura, K., Nakano, R., Kubota, K., Hamada, H., Neural cell adhesion molecule 2 as a target molecule for prostate and breast cancer gene therapy. *Cancer Science*, 102(4), 808-814, **2011**.
- [15] Singh, B.N., Kim, K.H., Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. *Journal of Controlled Release*, 63(3), 235-259, **2000**.
- [16] Forbes A.B., Pitt S.R., Baggott D.G., Rehbein S., Barth D., Bridi A.A., Carvalho L.A., ve O'Brien D.J., A review of the use of a controlled-release formulation of ivermectin in the treatment and prophylaxis of *Psoroptes ovis* infestations in sheep. *Veterinary Parasitology*, 83(3-4), 319-326, **1999**.
- [17] Siepmann, J., Lecomte, F., Bodmeier, R., Diffusion-controlled drug delivery systems: calculation of the required composition to achieve desired release profiles, *Journal of Controlled Release*, 379-389, **1999**.
- [18] Tunón, Å., Gråsjö, J., Alderborn, G., Effect of intragranular porosity on compression behaviour of and drug release from reservoir pellets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19(5), 333-344, **2003**.
- [19] Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., Kankane, S., Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 33(11), 1088-1118, **2008**.
- [20] Siepmann, J., Siepmann, F., Modeling of diffusion controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 351-362, **2012**.
- [21] Lin, C.C., Metters, A.T., Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13), 1379-1408, **2006**.
- [22] Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., De Ascentiis, A., Peppas, N.A., Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. *Journal of Controlled Release*, 39(2-3), 231-237, **1996**.
- [23] Siepmann, J., Peppas, N.A., Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1), 6-12, **2011**.
- [24] Siepmann, J., Peppas, N.A., Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(2-3), 139-157, **2001**.
- [25] Peppas, N.A., Analysis of Fickian and non-Fickian drug release from polymers. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 60(4), 110-1, **1985**.
- [26] Kwatra S., Taneja G., Nasa N., Alternative Routes of Drug Administration- Transdermal, Pulmonary & Parenteral. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 409-426, **2012**.

- [27] Sastry, S.V., Nyshadham J.R., Fix J.A., Recent technological advances in oral drug delivery – a review. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 3(4), 138-145, **2000**.
- [28] Katakam, M., William, R.R., Banga, A.K., Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels. *Journal of Controlled Release*, 49(1), 21-26, **1997**.
- [29] Siegel, R.A., Rathbone, M.J., Overview of Controlled Release Mechanisms, in Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery, J. Siepmann, R.A. Siegel, and M.J. Rathbone, Editors, *Springer US*, 19-43, **2012**
- [30] Kumar, A., Malviya, R., Sharma K., Recent Trends in Ocular Drug Delivery: A Short Review. *European Journal of Applied Sciences*, 3(3), 86-92, **2011**.
- [31] Yapar, E.A., İmplant Edilebilen Polimerik İlaç Salım Sistemlerine Genel Bakış. *Türkiye Klinikleri Journal of Pharmacy Sciences*, 1(2), 73-82, **2012**.
- [32] Vardanyan, R.S., Hruby, V.J., *Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier, **2006**
- [33] Peters, G.J., van der Wilt, C.L., van Moorsel, C.J.A., Kroep, J.R., Bergman, A.M., Ackland, S.P., Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacology & Therapeutics*, 87(2–3), 227-253, **2000**.
- [34] Dziegielewska, B., Beerman, T.A., Bianco, P.R., Inhibition of RecBCD Enzyme by Antineoplastic DNA Alkylating Agents. *Journal of Molecular Biology*, 361(5), 898-919, **2006**.
- [35] Pauwels, O., Atassi, G., Kiss, R., Combination of computerized morphonuclear and multivariate analyses to characterize in vitro the antineoplastic effect of alkylating agents. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 33(1), 35-45, **1995**.
- [36] Longley, D.B., Johnston, P.G., 5-Fluorouracil / Molecular Mechanisms of Cell Death, in Apoptosis, *Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms*, R. Srivastava, Editor, 263-278, **2007**.
- [37] Diasio, R.B., Harris, B.E. , Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clinical Pharmacokinetics*, 16(4), 215-237, **1989**.
- [38] Kryscio, D.R., Peppas, N.A., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*, 8(2), 461-473, **2012**.
- [39] Li, J., Wei, G., Zhang, Y., Molecularly Imprinted Polymers as Recognition Elements in Sensors, in *Handbook of Biosensors and Biochips*, K. Haupt, Belmont, A. S., Editor ,35-55, **2012**.
- [40] Yu C., M.K., Influence of mobile phase composition and cross-linking density on the enantiomeric recognition properties of molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 888(1-2), 63-72, **2000**.
- [41] Yan, H., Row, K., Characteristic and Synthetic Approach of Molecularly Imprinted Polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, 7(5), 155-178, **2006**.

- [42] Kim, H., Spivak, D.A., New Insight into Modeling Non-Covalently Imprinted Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 125(37), 11269-11275, **2003**.
- [43] Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z., Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 173-182, **2004**.
- [44] Wulff, G., Sarhan, A., Use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 11, 341-344, **1972**.
- [45] Wulff, G., Akelah, A., Enzyme-analogue built polymers synthesis of 5-vinylsalicylaldehyde and a simplified synthesis of some divinyl derivatives. *Die Makromolekulare Chemie*, 179, 2647-2651, **2003**.
- [46] Wulff, G., Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates - a way towards artificial antibodies. *ChemInform*, 26, **1995**.
- [47] Arshady, R., Mosbach, K., Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization. *Die Makromolekulare Chemie*, 182, 687-692, **1981**.
- [48] Kempe, M., Mosbach, K., Direct resolution of naproxen on a non-covalently molecularly imprinted chiral phase. *Journal of Chromatography A*, 664, 276-279, **1994**.
- [49] Whitcombe, M.J., Rodriguez, M.E., Villar, P., Vulfson, E.N., A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol. *Journal of the American Chemical Society*, 117(27), 7105-7111, **1995**.
- [50] Klein, J.U., Whitcombe, M.J., Mulholland, F., Vulfson, E.N., Template-Mediated Synthesis of a Polymeric Receptor Specific to Amino Acid Sequences. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(13-14), 2057-2060, **1999**.
- [51] Whitcombe, M.J., Vulfson E.N., Imprinted Polymers. *Advanced Materials*, 13(7), **2001**.
- [52] Kirsch, N., Alexander, C., Lübke, M., Whitcombe, M.J., Vulfson, E.N., Enhancement of selectivity of imprinted polymers via post-imprinting modification of recognition sites. *Polymer*, 41(15), 5583-5590, **2000**.
- [53] Tock, M.R., Frary, E., Sayers, J.R., Grasby, J.A., Dynamic evidence for metal ion catalysis in the reaction mediated by a flap endonuclease. *The EMBO Journal*, 22(5), 995-1004, **2003**.
- [54] Kawamura-Konishi Y., A., T., Satoh, N., Katagiri, M., Suzuki, H., Chemical modification of a catalytic antibody that accelerates insertion of a metal ion into porphyrin: essential amino acid residues for the catalytic activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 31(1-3), 9-17, **2004**.



- [55] Wang, J., Wang, Y., Hu, T., Li, X., Huang, Y., Liu, Y., Ma, G., Su, Z., An oriented adsorption strategy for efficient solid phase PEGylation of recombinant staphylokinase by immobilized metal-ion affinity chromatography. *Process Biochemistry*, 47(1), 106-112, **2012**.
- [56] Tüzmen, N., Kalburcu, T., Denizli, A., Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochemistry*, 47(1), 26-33, **2012**.
- [57] Mielecki, M., Wojtasik, J., Zborowska, M., Kurzątkowska, K., Grzelak, K., Dehaen, W., Radecki, J., Radecka, H., Oriented immobilization of His-tagged kinase RIO1 protein on redox active N-(IDA-like)-Cu(II) monolayer deposited on gold electrode—The base of electrochemical biosensor. *Electrochimica Acta*, 96(0), 147-154, **2013**.
- [58] Wu, L., Li, Y., Metal ion-mediated molecular-imprinting polymer for indirect recognition of formate, acetate and propionate. *Analytica Chimica Acta*, 517(1–2), 145-151, **2004**.
- [59] Hancock, R.D., Martell, A. E., *Chemical Reviews*, 1989. 89, 1875-1914.
- [60] Matsui, J., Nicholls, I.A., Takeuchi, T., Mosbach, K., Karube, I., Metal ion mediated recognition in molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 335(1–2), 71-77, **1996**.
- [61] Cunliffe, D., Kirby, A., Alexander, C., Molecularly imprinted drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1836-1853, **2005**.
- [62] Suedee, R., Srichana, T., Martin, G.P., Evaluation of matrices containing molecularly imprinted polymers in the enantioselective-controlled delivery of  $\beta$ -blockers. *Journal of Controlled Release*, 66(2–3), 135-147, **2000**.
- [63] Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E., Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 12(5), 1387-1408, **2011**.
- [64] Koç, İ., Bereli, N., Baydemir, G., Galaev I.Y., Denizli A., Synthesis and Characterization of Macroporous Poly(Acrylamide-Methacrylamido Histidine) Cryogels and Their Use in Antibody Purification. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36(1), 61-76, **2008**.
- [65] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Noppe, W., Mattiasson, B., Cryogel applications in microbiology. *Trends in Microbiology*, 16(11), 543-551, **2008**.
- [66] Bereli, N., Andaç, M., Baydemir, G., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., Protein recognition via ion-coordinated molecularly imprinted supermacroporous cryogels. *Journal of Chromatography A*, 1190(1–2), 18-26, **2008**.
- [67] Lozinsky, V.I., Cryogels on the basis of natural and synthetic polymers: preparation, properties and application. *Russian Chemical Reviews*, 71(6), 489-511, **2002**.
- [68] Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., Vasheghani-Farahani, E., Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. *Iranian Polymer Journal*, 19(5), 375-398, **2010**.

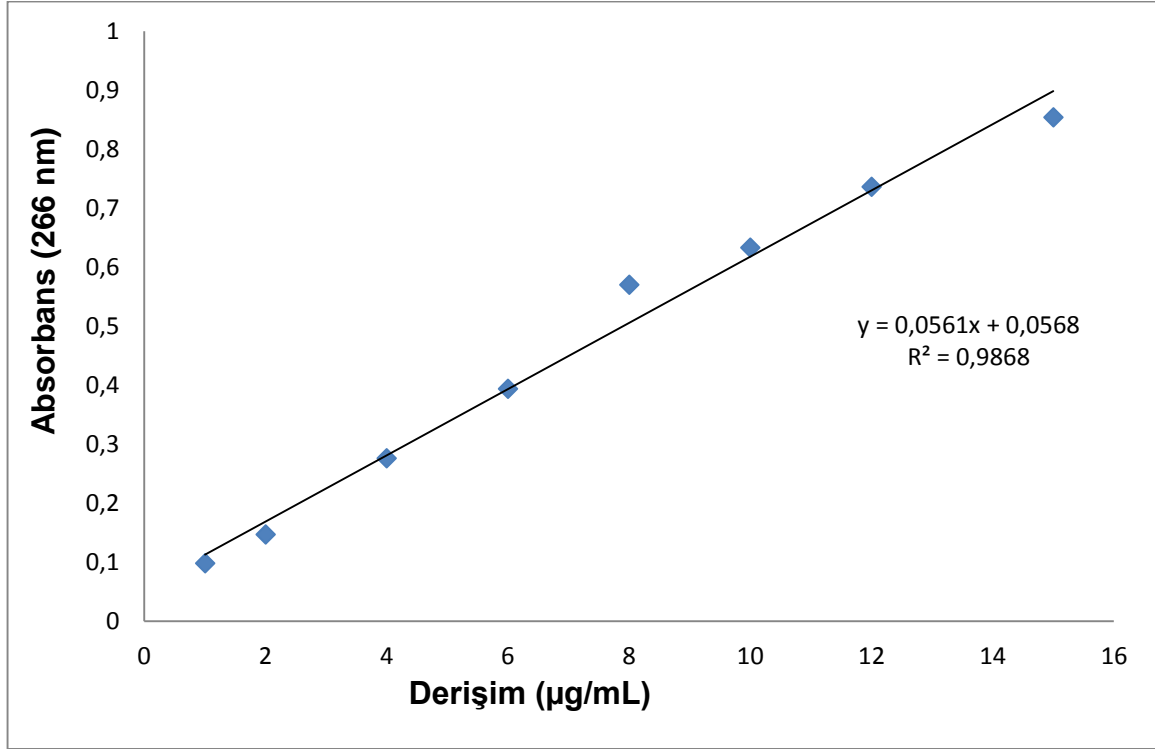
- [69] Uygun, M., Uygun, D.A., Özçalışkan, E., Akgöl, S., Denizli, A., Concanavalin A immobilized poly(ethylene glycol dimethacrylate) based affinity cryogel matrix and usability of invertase immobilization. *Journal of Chromatography B*, 887–888(0), 73-78, **2012**.
- [70] Srivastava, A., Jain, E., Kumar, A., The physical characterization of supermacroporous poly(N-isopropylacrylamide) cryogel: Mechanical strength and swelling/de-swelling kinetics. *Materials Science and Engineering: A*, 464(1–2), 93-100, **2007**.
- [71] Andac, M., Galaev, I.Y., Denizli, A., Molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) based cryogel for albumin depletion from human serum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109(0), 259-265, **2013**.
- [72] Doretta, L., Ferrara, D., Lora, S., Schiavon, F., Veronese, F.M., Acetylcholine biosensor involving entrapment of acetylcholinesterase and poly(ethylene glycol)-modified choline oxidase in a poly(vinyl alcohol) cryogel membrane. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(3–5), 279-285, **2000**.
- [73] Bencherif, S.A., Sands, R.W., Bhatta, D., Arany, P., Verbeke, C.S., Edwards, D. A., Mooney, D. J., Injectable preformed scaffolds with shape-memory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**.
- [74] Garipcan, B. and Denizli, A., A Novel Affinity Support Material for the Separation of Immunoglobulin G from Human Plasma. *Macromolecular Bioscience*, 2,135–144, **2002**.
- [75] Shobana, S., Dharmaraja, J., Selvaraj, S., Mixed ligand complexation of some transition metal ions in solution and solid state: Spectral characterization, antimicrobial, antioxidant, DNA cleavage activities and molecular modeling. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 107(0), 117-132, **2013**.
- [76] Rao, K.M., Mallikarjuna, B., Krishna Rao, K.S.V., Sudhakar, K., Rao, K.C., Subha, M.C.S., Synthesis and Characterization of pH Sensitive Poly (Hydroxy Ethyl Methacrylate-co-acrylamidoglycolic Acid) Based Hydrogels for Controlled Release Studies of 5-Fluorouracil. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 62(11), 565-571, **2013**.
- [77] Babu, V.R., Sairam, M., Hosamani, K.M., Aminabhavi, T.M., Development of 5-fluorouracil loaded poly(acrylamide-co-methylmethacrylate) novel core-shell microspheres: In vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 325(1–2), 55-62, **2006**.
- [78] Yerriswamy B., Reddy, C.L.N., Prasad C.V., Subha M., Rao K.C., Venkatarreddy G., Controlled release studies of 5-Fluorouracil through poly (vinyl caprolactum-co-vinyl acetate) microspheres. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 200-204, **2010**.
- [79] Denizli, A., *PHEMA-BGA Bazlı Matrisklerden 5-Fluorouracil'in Kontrollü Salınımı*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, **1986**.

- [80] Dhal P.K., Arnold, F.H., Metal-coordination interactions in the template-mediated synthesis of substrate-selective polymers: Recognition of bistimidazole) substrates by copper(II) iminodiacetate containing polymers. *Macromolecules*, 25, 7051-7059, **1992**.
- [81] Singh, B., Chauhan, N., Preliminary evaluation of molecular imprinting of 5-fluorouracil within hydrogels for use as drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, 4(5), 1244-1254, **2008**.
- [82] Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 27-46, **2000**.

## 7. EKLER

### EK 1: UV-Vis Spektrofotometrede Yapılan Analizler için Kalibrasyon Grafiği

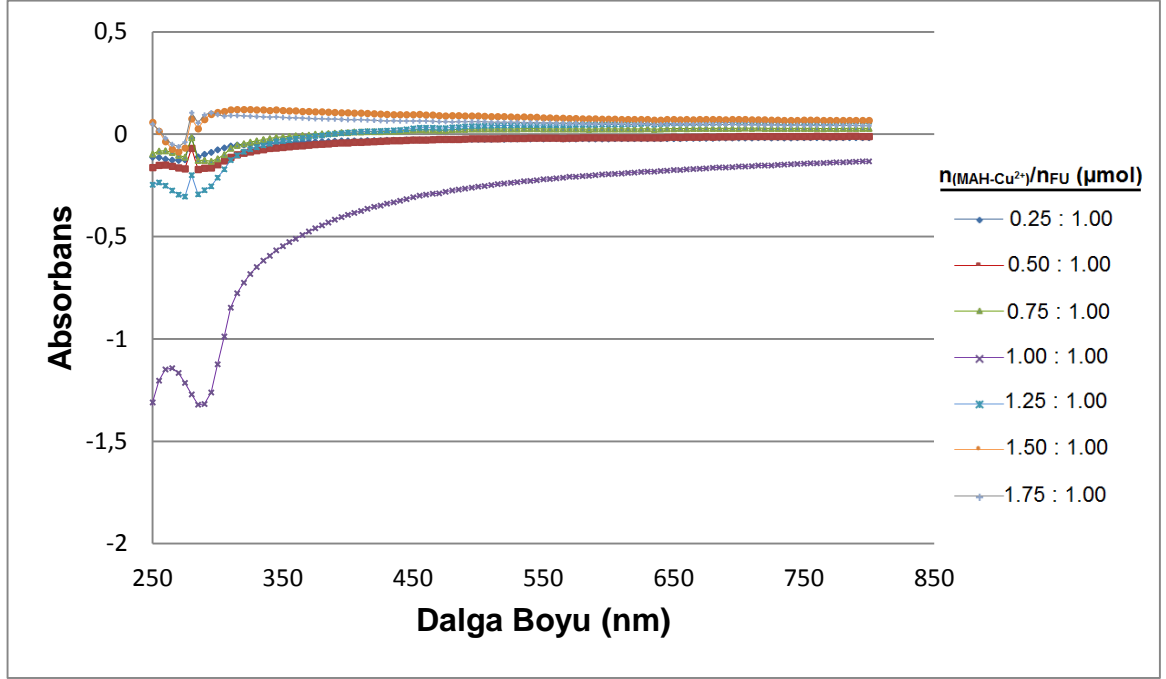
FU y¼kl¼ kriyojellerin PBS ortamında (pH=7.4) saldıkları FU miktarının belirlenmesi amacıyla UV-Vis spektrofotometrede hazırlanan FU kalibrasyon grafiği ve doğru denklemi aşağıda sunulmuştur ( $\lambda=266$  nm).



şekil 7.1. Florourasilin UV kalibrasyon grafiği.

## EK 2: MAH-Cu<sup>2+</sup> Kompleksinin Florourasil ile Önorganizasyon Oranlarının UV-Vis Spektrofotometre ile Saptanması

Bölüm 3.4'te üzerinde durulan MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksinin florourasil ile önorganizasyonu için farklı oranlarda MAH-Cu<sup>2+</sup>/FU oranlarına ait elde edilen grafik Şekil 7,2'de verilmiştir. Bu grafik kompleksin absorbans değerlerinden, kompleksi oluşturan MAH-Cu<sup>2+</sup> ve FU bileşiklerinin komplekste buldukları derişimle aynı derişime sahip tek başlarına ölçülen değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 7.2. Kompleks/Kalıp molekülün farklı miktarlardaki oranlarında absorbans değerindeki değişimler.

### EK 3: Kriyojel Disklerde Polimer Veriminin Hesaplanması

Farklı çapraz bağlayıcı miktarlarına sahip polimerlerin verimini saptamak için, kriyojellerin polimerleşmesi başladıktan 24 saat sonra iki cam arasında oluşan kriyojel oda sıcaklığına getirildi ve cam ile beraber tartıldı. Ardından liyofilizatör yardımıyla kurutulan polimer, camla birlikte tekrar tartıldı. Önceden bilinen cam ağırlıkları toplam ağırlıktan çıkarılıp net polimer ağırlığı hesaplanmış oldu. Kütle korunumu kanunu doğrultusunda başlangıçtaki monomer ağırlığı baz alınarak polimer verimi saptandı.

Çizelge 7.1: Kriyojel disklerin polimer verimini hesaplamada kullanılan değerler.

nHEMA/nMBAAm (mol)	Cam Ağırlığı (g)	Toplam Islak Polimer Ağırlığı (g)	Toplam Kuru Polimer Ağırlığı (g)	Net Islak Polimer Ağırlığı (g)	Net Kuru Polimer Ağırlığı (g)	Toplam Monomer Ağırlığı (mg)	Polimer Verimi (%)
4	94.88	104.37	96.22	9.49	1.34	1.46	92.31
8	96.34	105.24	97.70	8.9	1.37	1.46	93.56
16	96.67	105.65	98.03	8.98	1.35	1.46	92,57

#### EK 4: Kriyojel Disklere İlaç Yükleme Veriminin Hesaplanması

Bölüm 3.5.1’de anlatılan farklı miktarlarda çapraz bağlayıcı ve FU kullanılarak hazırlanan kriyojel disklere ilaç yükleme verimi hesabında kullanılan değerler Çizelge 7.2’de verilmiştir.

Çizelge 7.2: Yıkama sonrası P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerdeki toplam ilaç miktarı ve verimi

	Absorbans	C (µg/ml)	Yıkama ile Uzaklaşan FU (µg)	Yıkama ile Uzaklaşan (Ort.) FU (µg)	Yıkama Sonrası Total İlaç Miktarı (µg)	% İlaç Yükleme
4-100 - Kısım I	0.254	3.52	35.15	33.37	966.63	96.66
4-100 - Kısım II	0.234	3.16	31.59			
8-100 - Kısım I	0.286	4.091	40.86	40.05	959.95	95.99
8-100 - Kısım II	0.277	3.93	39.25			
16-100 - Kısım I	0.342	5.08	50.84	52.80	947.20	94.72
16-100 - Kısım II	0.364	5.48	54.76			
4-50 - Kısım I	0.152	1.70	16.97	16.43	483.57	98.36
4-50 - Kısım II	0.146	1.59	15.90			
4-200 - Kısım I	0.395	6.03	60.29	61.36	1938.65	93.88
4-200 - Kısım II	0.407	6.25	62.43			

## EK 5: FU Yüklü Polimerik Sistemlerden Toplam Salım Değerlerinin Hesaplanması

FU baskılanmış kriyojel disklerden toplam salım değerlerinin hesaplanması amacıyla yapılan *in-vitro* salım deneylerinde, salım ortamı belirli aralıklarla taze tampon ile yenilenecek şekilde FU içeren örnek ile salım ortamı arasındaki derişim farkı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Örnek olarak, molce  $n_{\text{HEMA}}/n_{\text{MBAAm}} = 4$  olan kriyojel disklerden, pH 7.4'de, 37°C sıcaklıkta ilacın moleküler baskılama yöntemi ile yüklenmesiyle oluşan toplam salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur.

Salım ortamı: 4 mL PBS,

Yenilenen hacim: 400 µL

Örnek t = 30. dakika

C = 3.96 µg/mL

Salınan FU miktarı= 3.96 x 4 = 15.84 µg

Metanol seyreltmesi: 15.84 µg x 5/4 = 19.80 µg

Atılan FU miktarı= 19.80 µg x 0.1 = 1.98 µg

Toplam FU miktarı =

15.84 µg + 2.09 µg + 2.28 µg + 2.43 µg + µg 2.66 + 2.39 µg = 27.70 µg

Toplam salım (%) = (27.70 µg / 60.96 µg disk) x 100 = 45.43 µg

Salınan miktar (µg FU/mg disk)= 27.70 µg / 84.70 mg = 0.33 µg FU/mg disk

Moleküler baskılama tekniği ile FU yüklü P(HEMA-MAH-Cu<sup>2+</sup>) kriyojel disklerden FU salımına ait veriler Çizelge 7.3.'de verilmiştir.



Çizelge 7.3: Moleküler baskılanmış kriyojel disklerden FU salımına ait veriler.

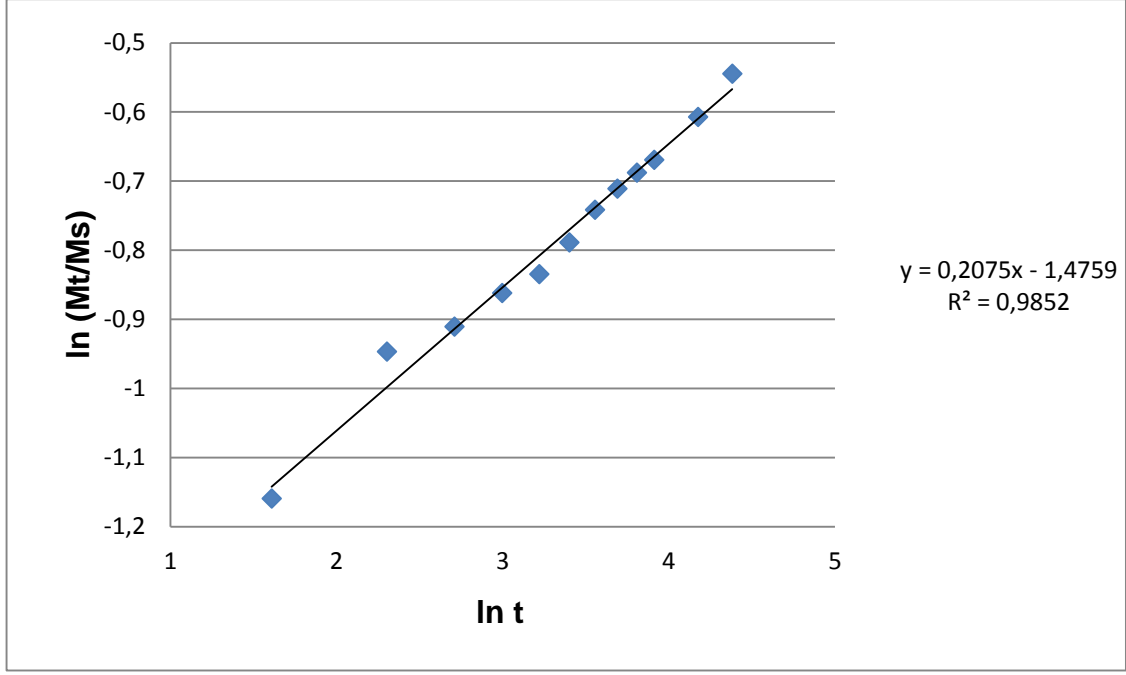
t (dakika)	Absorbans	C (µg/ml)	Salınan FU (µg)	Metanol Seyreltmesi	Atilan FU (µg)	Toplam FU (µg)	% Salım	Salınan FU Miktar (µg/mg disk)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0.33	4.78	19.12	23.90	2.39	19.12	31.37	0.23
10	0.36	5.32	21.26	26.58	2.66	23.65	38.80	0.28
15	0.33	4.87	19.48	24.35	2.43	24.53	40.23	0.29
20	0.31	4.57	18.27	22.83	2.28	25.75	42.24	0.30
25	0.29	4.17	16.70	20.87	2.09	26.47	43.41	0.31
30	0.28	3.96	15.84	19.80	1.98	27.70	45.43	0.33
35	0.27	3.80	15.20	19.00	1.90	29.04	47.63	0.34
40	0.26	3.55	14.20	17.75	1.78	29.94	49.11	0.35
45	0.24	3.28	13.13	16.42	1.64	30.64	50.27	0.36
50	0.23	3.02	12.06	15.08	1.51	31.22	51.20	0.37
65	0.23	3.14	12.56	15.70	1.57	33.22	54.50	0.39
80	0.24	3.28	13.13	16.42	1.64	35.36	58.01	0.42
140	0.25	3.43	13.70	17.13	1.71	37.58	61.64	0.44
200	0.26	3.66	14.63	18.29	1.83	40.22	65.97	0.47
320	0.27	3.78	15.13	18.91	1.89	42.54	69.79	0.50
440	0.27	3.75	14.99	18.73	1.87	44.29	72.65	0.52
560	0.26	3.64	14.56	18.20	1.82	45.74	75.03	0.54

## EK 6: FU Yüklü Polimerik Sistemlerin Salım Kinetiği Değerlerinin Hesaplanması

Bölüm 4.2.6'da belirtilen salım kinetiği hakkında bilgi verilen değerler şu şekilde hesaplanmıştır: Öncelikle Çizelge 7.4'de belirtilen değerler salım değerleri yardımıyla bulunmuştur. Ardından bu değerlerin Şekil 7.3'te gösterilen grafiği çizilip grafik denklemi elde edilmiştir ( $ax+b$  denklemi). Bu denkleme göre "x" in katsayısı (a değeri) salım üsteli "n" değerine karşılık gelmekte iken, denklemdaki b değerinin  $e^b$  şekli "k" değerini vermektedir.

Çizelge 7.4: FU salım kinetiğine ait veriler

t (dakika)	ln t	ln(Mt/Ms)	Mt/Ms
0	-	-	0.00
5	1.61	-1.16	0.31
10	2.30	-0.95	0.39
15	2.71	-0.91	0.40
20	3.00	-0.86	0.42
25	3.22	-0.83	0.43
30	3.40	-0.79	0.45
35	3.56	-0.74	0.48
40	3.69	-0.71	0.49
45	3.81	-0.69	0.50
50	3.91	-0.67	0.51
65	4.17	-0.61	0.54
80	4.38	-0.54	0.58
140	4.94	-0.48	0.62
200	5.30	-0.42	0.66
320	5.77	-0.36	0.70
440	6.09	-0.32	0.73
560	6.33	-0.29	0.75



Şekil 7.3. Salım üsteli n ve karakteristik jel sabiti değerlendirmesi için çizilen grafik.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Kemal ÇETİN  
Doğum Yeri : Konya  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : kemalcetin@hacettepe.edu.tr  
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD,  
06800, Beytepe, Ankara/TÜRKİYE

### Eğitim

Lise : 2002-2006 Karatay Süleyman Demirel Milli Piyango Anadolul  
Lisesi, Konya  
Lisans : 2006-2011 Fatih Üniversitesi, Kimya Bölümü, İstanbul  
Yüksek Lisans : 2011-2013 Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, Ankara

### Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : İleri düzeyde  
Almanca : Başlangıç düzeyinde

### İş Deneyimi

Araştırma görevlisi : 2011-2012, Konya Üniversitesi, Kimya Bölümü Biyokimya  
ABD  
Araştırma görevlisi : 2012-, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü Biyokimya ABD

### Deneyim Alanları

Kontrollü ilaç salım sistemleri, moleküler baskılama sistemleri, afinite  
kromatografisi, kapiler elektrokromatografi, kriyojeller

**Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi**

**Tezden Üretilmiş Yayınlar**

**Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**