





**İLAC SALIMI İÇİN MITOMİSİN C BASKILANMIŞ  
MANYETİK PARTİKÜL GÖMÜLÜ KRİYOJELLERİN  
HAZIRLANMASI**

**PREPARATION OF MITOMYCIN C IMPRINTED  
MAGNETIC PARTICLE EMBEDDED CRYOGELS FOR  
DRUG RELEASE**

**MUSTAFA BURAK YÜRÜKSOY**

**PROF. DR. ADİL DENİZLİ**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin  
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020



Çok değerli bilim insanı ve yeni nesillerin aydınlatıcısı,

Canım annem Prof. Dr. Belma IŞIK'a...



## ÖZET

### İLAÇ SALIMI İÇİN MITOMİSİN C BASKILANMIŞ MANYETİK PARTİKÜL GÖMÜLÜ KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI

**Mustafa Burak YÜRÜKSOY**

**Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**Haziran 2020, 79 sayfa**

Kontrollü ilaç salımı, ilacın vücutta istenilen bölgeye terapötik dozda salımını sağlamak için kullanılan bir tekniktir. İlaç salım sistemlerinde, hastaya verilen ilacın yan etkilerini azaltmak için uygun dozlarda verilmesi, ilaç salım sistemlerinin temel hedefidir. İlaç salım sistemleri arasında yeni bir yaklaşım olarak değerlendirilen manyetik alan varlığında (veya yönlendirmesi ile) hedefli ilaç taşınması, manyetik polimerler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu yaklaşımda, manyetik polimerler hastaya intravenöz olarak verildikten sonra, vücut dışından manyetik alan uygulanması ile manyetik partiküller hedef bölgeye yönlendirilmekte ve sadece o bölgede ilaç salımının gerçekleştirilmesi amaçlanmaktadır. Topikal uygulamalarda ise istenilen bölgeye vücut dışından manyetik alan uygulanarak, ilaç salım miktarı ve hızı rahatlıkla kontrol edilebilmektedir. Böylece ilacın tedavi etkinliği artırılırken, ilacın sağlıklı hücreler ve sağlam dokular üzerindeki yan etkileri de en aza indirilmektedir.

Mitomisin C, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Mitomisin C, seçici olmayan antitümör aktivitesi nedeniyle, kansere karşı kemoterapi tedavilerinde yaygın olarak

kullanılan bir DNA alkilleme ajanıdır. Mitomisin C, *Streptomyces caespitosus* adlı bakterinin kültüründen elde edilebilen, tek başına ya da diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte ve gastrointestinal, akciğer, rahim ağzı, baş-boyun, pankreas ve mesane kanserlerinde ve kronik lösemi hastalığında kullanılan anti-kanser bir ilaçtır. Mitomisin C, tümör hücrelerinde, DNA çift sarmal yapısının iki ayrı zinciri arasında çapraz bağlar oluşturarak, DNA kopyalanmasını inhibe etmesi nedeniyle antitümör özellik gösterir. Mitomisin C'nin klinik uygulamalardaki kullanımını kısıtlayan, çok sayıda akut ve kronik toksik özellikleri mevcuttur. Literatürde, Mitomisin C'nin toksik etkilerini azaltmaya yönelik olarak çeşitli salım yöntemleri geliştirilmiştir. İlaç salımı için son yıllarda en ilginç ve etkili yaklaşımlardan bir tanesi de moleküler baskılama yöntemidir.

Moleküler baskılama tekniği ile ilaç-taşıyıcı yapıda istenilen hedef moleküle uygun üç boyutlu nano-oyuklar oluşturulur. Moleküler baskılama tekniği için hem inorganik hem de polimer temelli ilaç taşıyıcı sistemler kullanılabilir. Polimer temelli taşıyıcılar arasında kriyojeller son yıllarda çok ilgi görmektedirler. Kriyojeller, kısmen donmuş monomer veya polimer çözeltileriyle düşük sıcaklıklarda hazırlanırlar. Düşük sıcaklıklarda hazırlanmaları, ilacın yapıda bozunma olasılığını tamamen ortadan kaldırmaktadır. Bu, kriyojellerin sağladığı çok önemli bir avantajdır. Gözenek boyutunun kolayca ayarlanabilmesi de ilaç salım hızının kontrolü için bir hayli önemlidir. Oldukça hidrofilik yapıları, biyolojik uyumluluklarının yüksek olmasını sağlamaktadır.

Sunulan bu tez çalışmasında, hem manyetik polimerik partiküllerin manyetik özellikleri hem de kriyojel yapının avantajları birleştirilerek, yeni bir kompozit ilaç taşıyıcı sistemi hazırlanmıştır. Tezin ilk bölümünde, manyetik mikropartikül gömülü kompozit kriyojel ilaç salım sistemi hazırlanmış ve yapısal karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde ise model ilaç Mitomisin C baskılama ve salım performansları in-vitro ortamda incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mitomisin C, Manyetik mikropartiküller, Kriyojel, Moleküler baskılama, Kontrollü ilaç salımı



## **ABSTRACT**

### **PREPARATION OF MITOMYCIN C IMPRINTED MAGNETIC PARTICLE EMBEDDED CRYOGELS FOR DRUG RELEASE**

**Mustafa Burak YÜRÜKSOY**

**Master of Science, Nanotechnology and Nanomedicine Division**

**Thesis Advisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ**

**June 2020, 79 pages**

Controlled drug release is a technique used for releasing the drug in the desired site of the body at the therapeutic dose. In drug release systems, administration of the drug given to the patient in appropriate doses to reduce the side effects of the drug is the main goal of drug release systems. Targeted drug transport can be accomplished using magnetic polymers within the presence (or by the orientation) of the magnetic field, which is considered as a new approach between drug release systems. In this approach, after the magnetic polymers are administered intravenously to the patient, the magnetic particles are directed to the target area by applying an external magnetic field to the body and it is aimed to perform drug release only in that area. In topical applications, the amount of drug released and the speed of release can be controlled easily by applying a magnetic field to the desired area from outside of the body. Thus, while the therapeutic effectiveness of the drug is increased, the side effects of the drug on healthy cells and unimpaired tissues are also minimized.

Mitomycin C is a broad-spectrum antibiotic. Mitomycin C is a DNA alkylating agent widely used in chemotherapy treatments against cancer due to its non-selective antitumor activity. Mitomycin C is an anti-cancer drug that can be obtained from the culture of the bacteria named *Streptomyces caespitosus*, used alone or in combination with other chemotherapeutic agents and in gastrointestinal, lung, cervical, head-neck, pancreatic and bladder cancers, and chronic leukemia disease. Mitomycin C displays an antitumor characteristic by inhibiting DNA replication in tumor cells via creating cross-links between the two separate chains of DNA double helix structure. There are many acute and chronic toxic properties which limit the use of Mitomycin C in clinical practice. Various release methods have been developed in the literature to reduce the toxic effects of Mitomycin C. One of the most interesting and effective approaches to drug release in recent years is the molecular imprinting method.

With the molecular imprinting technique, three-dimensional nano-cavities are created in the drug-carrier structure suitable for the target molecule. Both inorganic and polymer-based drug carrier systems can be used for the molecular imprinting technique. Among polymer-based carriers, cryogels have been a focus of interest popularly in recent years. Cryogels are prepared at low temperatures with partially frozen monomer or polymer solutions. Their preparation at low temperatures completely eliminates the possibility of drug degradation in the structure. This is a very important advantage maintained by cryogels. Being able to adjust the pore size easily is also very important to control the rate of drug release. Their highly hydrophilic structure provides a great biocompatibility.

In this thesis study, a new composite drug carrier system was prepared by combining both magnetic properties of magnetic polymeric particles and advantages of cryogel structure. In the first part of the thesis, magnetic microparticle embedded composite cryogel drug release system was prepared and structural characterization studies were carried out. In the second part of the study, model drug Mitomycin C imprinting and release performances were examined in-vitro.

**Keywords:** Mitomycin C, Magnetic microparticles, Cryogel, Molecular imprinting, Controlled drug release

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın ilk gününden başlayarak sonuçlandırılmasına kadar geçen sürenin her aşamasında, akademik ve bilimsel çalışmalarında ve hayatta; engin bilgi ve tecrübeleriyle, derin ilgisi, sevgisi ve samimiyetiyle her zaman yanımda yer alan, sonsuz desteği ve yol göstericiliğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, çok değerli bilim insanı Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Tez çalışmalarımın yürütülmesi ve sonuçlandırılması için olağanüstü katkılarından dolayı; ilgisini ve yardımlarını asla esirgemeyen, çok sevdiğim kıymetli bilim insanı Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ'e,

Çalışmalarında ve her daim yanımda olan, çok sevdiğim ve desteği paha biçilemez Doç. Dr. Nilay BERELİ'ye,

Büyük katkı ve emeklerinden dolayı sevgili çalışma arkadaşlarım, Dr. Semra AKGÖNÜLLÜ'ye, Dr. Monireh BAKHSHPOUR'a, Dr. Duygu ÇİMEN'e, Dr. Kemal ÇETİN'e, Dr. Recep ÜZEK'e ve tüm BİOREG Ailesi'ne,

Yüksek lisans ve tez süreçlerim ile ilgili planlamalarım, varlığı ve desteğiyle hep yanımda olan, çok sevdiğim Prof. Dr. Eylem ÖZTÜRK GÜVEN'e,

Lisans yıllarımdan bu yana, gerek yoğun ve zorlu dönemlerimde bana sağladığı moral ve motivasyon için gerekse bana kattıkları nedeniyle, çok sevdiğim Prof. Dr. Lokman UZUN'a,

Karşılaştığım tüm zorlukları atlatmamda, bütün mutlu ya da sıkıntılı anlarımda; manevi destekleri ve her türlü yardımlarıyla yanımda yer alan, sevgili arkadaşlarım Yasemin Nisa ZENGİN'e ve Kerem VARDARLI'ya,

Tüm fikirlerimde bana yürekten inanan ve giriştiğim her konuda beni sonuna kadar destekleyen babam, Mustafa YÜRÜKSOY'a,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi çalışmalarım boyunca da yanımda olan, iyi ve kötü bütün günlerimde yardıma herkesten önce ilk olarak koşan, üzerimdeki hakkını kelimelerle ifade edemeyeceğim, canım bir tanem annem Prof. Dr. Belma IŞIK'a,

Son olarak, bu çalışmayı görmekten en çok mutluluk ve gurur duyacak olan anneannem Vildan IŞIK'a ve bütün aileme, sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemi.....	4
2.1.1. Sınıflandırma.....	4
2.1.2. Kontrollü Salım.....	5
2.1.3. İlaç Salımının Matematiksel Modellemesi.....	7
2.1.4. İlaç Salım Mekanizması ve Teorileri.....	7
2.2. Mitomisin C.....	9
2.3. Moleküler Baskılama Yöntemi.....	10
2.4. Kriyojeller.....	13
2.5. Manyetizma ve Manyetik Partiküller.....	16
2.5.1. Manyetik Polimerlerin Uygulama Alanları.....	20
2.5.2. Manyetik Polimerlerin İlaç Salımında Kullanımı.....	20
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	23
3.1. Manyetik Poli(glisidil metakrilat) Mikropartiküllerin Hazırlanması.....	23
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	23

3.1.2. mPGMA Mikropartiküllerin Hazırlanması.....	23
3.1.3. mPGMA Mikropartiküllerin Karakterizasyonu.....	24
3.1.3.1. Yüzey Morfolojisi.....	24
3.1.3.2. Manyetik Özellikleri.....	25
3.1.3.3. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	25
3.1.3.4. Şişme Deneyleri.....	25
3.2. mPGMA Mikropartiküllere Mitomisin C Baskılanması .....	25
3.2.1. Kimyasal Maddeler.....	25
3.2.2. Moleküler Baskılama için Kullanılan Fonksiyonel Monomerin Hazırlanması .....	26
3.2.3. Mitomisin C-Fonksiyonel Monomer Ön-Kompleksinin Hazırlanması .....	26
3.2.4. Yüzey Baskılanmış mPGMA Mikropartiküllerin Hazırlanması .....	26
3.3. Mitomisin C Baskılanmış mPGMA Mikropartikül Gömülü PHEMA Kriyojellerin Hazırlanması .....	27
3.3.1. Kriyojellerin Karakterizasyonu.....	27
3.3.1.1. Yüzey Morfolojisi .....	27
3.3.1.2. Yüzey Alanı Ölçümleri.....	28
3.3.1.3. Şişme Deneyleri.....	28
3.4. Kriyojellerden Mitomisin C Salımının İncelenmesi.....	28
3.5. Sitotoksosite Çalışmaları .....	28
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	30
4.1. mPGMA Mikropartiküllerin Karakterizasyonu.....	30
4.2. MAH-Cu <sup>2+</sup> Kompleksinin Hazırlanması .....	33
4.3. MAH-Cu <sup>2+</sup> -MMC Kompleksinin Hazırlanması .....	33
4.4. Mitomisin C Baskılanmış PHEMA Temelli mPGMA Mikropartikül Gömülü Kriyojeller.....	34

4.5. Mitomisin C Baskılanmış mPGMA Mikropartikül Gömülü Kriyojellerden MMC Salım Davranışının İncelenmesi.....	37
4.5.1. İlaç Yükleme Miktarının İlaç Salım Oranı ve İlaç Salım Hızına Etkisi.....	37
4.5.2. Kriyojelleşme Sıcaklığının İlaç Salım Hızına Etkisi.....	39
4.5.3. Ortam pH'nın İlaç Salım Hızına Etkisi .....	40
4.5.4. Sıcaklığın İlaç Salım Hızına Etkisi .....	41
4.6. Kinetik Çalışmalar.....	42
4.7. Sitotoksisite Çalışmaları.....	43
5. YORUM.....	44
6. KAYNAKLAR.....	47
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	55
ÖZGEÇMİŞ .....	56

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde (yeşil çizgi) ve geleneksel ilaç formülasyonlarında (mavi çizgi) ilaç derişiminin zamanla değişiminin karşılaştırılması.....	6
Şekil 2.2. Kontrollü ilaç salım sistemlerinden ilaçların ideal dağılımı. Hedefte ilaç seviyesi (yeşil çizgi), vücutta ilaç seviyesi (mavi çizgi).....	6
Şekil 2.3. Mitomisin C molekülü.....	9
Şekil 2.4. Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi: (a) kalıp ve fonksiyonel monomer arasında kovalent veya non-kovalent konjugat oluşturulur; (b) monomer-kalıp kompleksi polimerleştirilir; (c) kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır.....	11
Şekil 2.5. Moleküler baskılama ile ilaç yükleme ve salımının düzenlenmesi: (A) ilaç yükleme aşaması, (B) uzatılmış salım, (C) enantiyoseçici salım, (D) etki duyarlı salım.....	13
Şekil 2.6. Kriyojellerin hazırlanmasının şematik gösterimi .....	14
Şekil 2.7. Hedefli ilaç taşınmasının şematik gösterimi. Manyetik ilaç taşıyıcı polimer doğrudan hedef bölgede ilaç salımı yapmaktadır .....	21
Şekil 2.8. Polimerik sistemlerdeki ilaç salım mekanizmalarında bulunan temel prensipler .....	22
Şekil 4.1. mPGMA mikropartiküllerin SEM görüntüleri .....	32
Şekil 4.2. MMC, MAH, MAH-Cu <sup>2+</sup> ve MAH-Cu <sup>2+</sup> -MMC'nin UV spektrumları .....	33
Şekil 4.3. mPGMA mikropartikül gömülü kriyojellerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri.....	36
Şekil 4.4. İlaç yükleme oranının ilaç salımına etkisi: Kriyojelleşme sıcaklığı, T <sub>c</sub> : -18°C; Salım ortamı pH'ı: 7.4; T: 25°C .....	38
Şekil 4.5. İlaç yükleme oranının ilaç salım hızına etkisi: Kriyojelleşme sıcaklığı, T <sub>c</sub> : -18 °C; Salım ortamı pH'ı: 7.4; T: 25°C.....	39
Şekil 4.6. Kriyojelleşme sıcaklığının ilaç salım hızına etkisi: İlaç yükleme miktarı: 100 µg MMC/ g mPGMA; pH: 7.4; T: 25°C.....	40

Şekil 4.7. Ortam pH'ının ilaç salım hızına etkisi: İlaç yükleme miktarı: 100 µg MMC/g  
mPGMA; Kriyojelleşme sıcaklığı, T<sub>c</sub>: -18°C; T: 25°C..... 41

Şekil 4.8. Sıcaklığın ilaç salım hızına etkisi: İlaç yükleme miktarı: 100 µg MMC/g  
mPGMA; Kriyojelleşme sıcaklığı, T<sub>c</sub>: -18°C; pH: 7.4 ..... 42



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mitomisin C molekülünün özellikleri.....	10
Çizelge 3.1. Mitomisin C salımı için farklı baskılama oranına sahip mPGMA mikropartiküllerin hazırlanması.....	27
Çizelge 4.1. mPGMA mikropartiküllerin bazı özellikleri .....	31
Çizelge 4.2. İlaç yükleme oranının şişme davranışı ve yüzey alanına etkisi.....	35
Çizelge 4.3. Kriyojelleşme sıcaklığının şişme davranışı ve yüzey alanına etkisi.....	37
Çizelge 4.4. Polimer I-V için MMC salım kinetik verileri.....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

AIBN	Azobisisobütironitril
APS	Amonyum persülfat
BET	Brunauer-Emmett-Teller
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ESR	Elektron spin rezonans
GMA	Glisidil metakrilat
MAH	Metakroilamido histidin
MBAAm	Metilenbisakrilamid
MMC	Mitomisin C
MTD	Minimum toksik derişim
MTT	Metiltiazol difenil tetrazolyum
mPGMA	Manyetik poli(glisidil metakrilat)
PDI	Polidispersite İndeksi
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
PLGA	Polilaktid-ko-glikolik asit
PVP	Poli(vinil pirolidon)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilen diamin
VSM	Titreşimli örnek magnetometresi

# 1. GİRİŞ

Kontrollü salım sistemi ilk kez 1950'de çeşitli pestisitlerin kontrollü dağıtımını için kullanılmıştır. Başarılı sonuçların ardından bu sistem 1960'lı yıllarda tıp alanında uygulanmaya başlanılmıştır. Büyük molekül ağırlığına sahip ilaçların (Molekül Ağırlığı > 600 Dalton) polimerik yapılardan salım çalışmaları ise 1970'lerde başlamıştır [1]. Hastalıkların tedavisi sürecinde ilaçların hastalara uygun dozlarda ve sürelerde verilmesi oldukça büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda, ilaçların yan etkilerinin azaltılması ve terapötik etki süresinin uzatılması amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin bu çalışmalarda önemli bir yer tuttuğu görülmektedir [1].

Bu sistemlerde, hedef dokuya istenilen dozda ilacı doğrudan vermek hala etkili tedavi yöntemi sunmaktadır. İlacın polimer yapısından salınması belirli bir süre içinde gerçekleşir [2]. Akıllı ilaç dağıtım sistemleri son yıllarda bilim insanlarının, biyomedikal ve farmasötik alanların dikkatini çekmiştir. Tüm kontrollü ilaç uygulama sistemlerinin amacı ilaç tedavisinin etkinliğini ve güvenliğini arttırmaktır.

Bu tekniğin amacı, ilacın vücutta uygun terapötik dozajını serbest bırakmaktır. Ek olarak, ilaçların yan etkilerini azaltmak, ilacın birlikte uygulanmasının farmakolojik etkisini korumak ve hastaya uzun süre minimum doz sağlamaktır. İlaç salımının avantajı, ilaçların yan etkilerini ve hastaya verilen minimum dozu azaltıp ilacın farmakolojik etkilerini uzun süre korumasıdır.

Moleküler tanıma, çeşitli etkileşim türleri yoluyla iki veya daha fazla molekül arasındaki etkileşimler ile ifade edilebilir. Moleküler baskılama, moleküler tanıma yoluyla polimerik malzemelerin kullanımıyla oldukça seçici bağlanma kapasitesine sahip oyukları oluşturmak için umut verici bir alternatiftir [3]. Çeşitli molekül türlerini hedefleyen bu yöntemin benzersiz özelliklerini gösteren birçok moleküler baskılı polimer (MIP) vardır [4].

İlgilenilen molekül, yani bir kalıp molekülü, kovalent, kovalent olmayan veya metal iyonu koordinasyon etkileşimleri yoluyla fonksiyonel monomerler ve çapraz

bağlayıcılarla çevrilir. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra, kalıp molekül belirli bir bağlama boşluğu bırakarak bu polimerik yapıdan çıkarılır. Hedef molekül, kovalent veya metal iyon koordinasyon etkileşimleri yoluyla fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcılarla çevrilidir. İyon koordinasyonu yoluyla moleküler baskılama, yüksek seçicilik ve kararlılık sağlar. Bu bağlamda, metal iyonları, hedef molekül ile monomer arasında bir arabulucu olarak rol yapar.

Kriyojeller biyolojik nanoparçacıkların [5-7] ve hatta bütün hücrelerin [8-12] kromatografisi için kullanılır. Kriyojelin şişme kinetiği aynı zamanda ilaç dağıtım sistemlerinin kullanılmasına yol açmaktadır. Son zamanlarda kriyojeller moleküler baskılama tekniklerinde kullanılmaktadır [13,14]. Silindir, granül, partikül veya disk şeklinde istenilen geometride kriyojeller üretilebilir.

Manyetik nanopartiküller (MNPLer), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) uygulamalarında kontrast ajanları olarak kullanılabilirler için özellikle önemli bir nanomalzeme sınıfıdır. Hatta diagnostik ya da terapötik araçlar (nanoteranostik) olarak kullanılabilirler amacıyla terapötik ajanlar ile daha fazla fonksiyonelleştirilebilirler. Manyetik nanopartiküller, kataliz, enzim immobilizasyonu, MRI, hedefli ilaç taşınımı, manyetik olarak tetiklenen hipertermi ile kanser tedavisi, gen tedavisi gibi çeşitli potansiyel uygulamalarda uzun süredir çalışılmaktadır. Süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri (IONPs), iyi biyoyumlulukları, kolay sentezlenebilmeleri, çok yönlü görüntüleme yöntemleri (floresan/MRI, PET/MRI, SPECT/CT) için yüzey modifikasyonuna elverişli olmaları nedeniyle özellikle gelecek vaadeden ilaç taşınım araçlarıdır. Öte yandan, IONPs üzerine ilaç yükleme mekanizmaları, nanopartiküllerin yüzeyine bağlanmaya dayanır ve bu da ilaç yükleme kapasitesini sınırlar. Özellikle hidrofobik ilaçlar ile birleşim, söz konusu ilaç ile etkin biçimde etkileşebilecek ligandlar ile IONPs yüzeyinin uygun şekilde fonksiyonelleştirilmesi sonrasında ancak sağlanabilir. Ayrıca, IONPs için küçük boyut ve geniş yüzey alanı, nanopartiküllerin agregasyonuna yani kümeler halinde bir araya gelmesine de neden olabilir. Bu durum, IONPs yüzey mühendisliğinde kullanılan tekniklerin önemine dikkat çekmektedir. Özellikle farklı organik veya inorganik kabuk malzemeleri ile hazırlanan demir oksit çekirdek-kabuk tipi nanoyapılar, ilaç yüklenmesinde IONPs etkinliğini arttırmaya yönelik olarak geliştirilmiştir ve kendi aralarında kümelenmelerini (agregasyonları) engellemek ve

nanopartiküllere biyolojik tanıma fonksiyonları, termal etkilere duyarlılık ve katalitik özellik gibi yeni özellikler kazandırmak hedeflenmektedir.

Mitomisin C (MMC), 1950'de aziridin içeren *Streptomyces caespitosus* veya *Streptomyces Lavandulae*'den üretilmiştir. MMC, geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Antiproliferatif özelliğinden dolayı göğüs ve prostat kanserlerinde kullanılır. MMC, çok etkili bir DNA çapraz bağlayıcıdır [15]; MMC, tümör hücrelerindeki DNA'ya bağlanır ve DNA çift sarmalı arasında çapraz bağ oluşturur. Dolayısıyla MMC'nin DNA kopyalanmasını inhibe ederek antitümör etkisi sağladığı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kontrollü İlaç Salım Sistemi

Tüm ilaç salım sistemleri, terapötik etkiyi elde etmek için ilacı istenilen zamanlarda veya özel bölgelerde vermek üzere tasarlanmıştır. Bu bölümde ilaç salım sistemlerinin temel özellikleri ve kontrollü salım süreci tartışılmaktadır. Ayrıca, kriyojeller ile ilaç salım sisteminin alanı ayrı olarak belirtilecektir.

#### 2.1.1. Sınıflandırma

İlaç salım sistemlerinin amacı, terapötik etkileri iyileştirmek, toksisiteyi azaltmak, ilaç alma sıklığını azaltarak hastanın maruz kaldığı ağrıyı azaltmaktır. Klinik tedavi düzeyini iyileştirmek çok önemlidir. Kontrollü ilaç salım sistemleri ilaç uygulamasının güvenliğini, etkinliğini ve güvenilirliğini artırır. Çok çeşitli polimerik biyomalzemeler kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılabilirler. Dozaj formülasyonlarına dayanarak, ilaç verme sistemi genellikle polimerik kapsüller, miseller, lipozom ve hidrojeller olarak sınıflandırılabilir.

Polimerik bir kapsül genellikle terapötik maddeyi içeren iyi tasarlanmış bir çekirdek ve çekirdek dışında tanımlanmış bir polimer membran içerir [16]. İlaç verme uygulamalarına gelince, bu tür sistemler ilgi çekicidir, çünkü çekirdekten ilaç salımı hız sınırlayıcı membrandan difüzyon yoluyla gerçekleşir.

Hidrofobik çekirdekli ve hidrofilik kabuklu, kendiliğinden birleşen nano boyutlu amfifilik kolloidal parçacıklar olan miseller, suda çözünmeyen ilaçlar için farmasötik taşıyıcılar olarak başarılı bir şekilde son zamanlarda kullanılmaktadır [17]. Bu kendiliğinden oluşan misellerin oluşma prensibi, iki segment arasındaki çözünürlükteki büyük farktan kaynaklanmaktadır. İlaç verme sistemlerine gelince, suda çözünür olmayan ilaçları çözünür hale getirmek önemli aşamalardandır. Lipozomlar ise, sulu veya lipofilik bölmeleri değiştiren bir veya daha fazla fosfolipid çift katmanından oluşan membran benzeri veziküllerdir. Lipozomlar suda çözünen ilaçları su içinde çekirdeğine sıkıştırabilir. Lipofilik ilaçlar, bu ilaçların hazırlanmaları sırasında kullanılan fosfolipidlerle lipit çift katmanlarına hapsedilebilir [18].

Kriyojel, yüksek biyouyumluluk ve kontrol edilebilir olması nedeniyle, daha sonra ayrıntılı olarak sunulacağı gibi önde gelen ilaç salım sistemlerinde kullanılan malzemeler haline gelmiştir. Tez çalışması kapsamında, MMC baskılanmış, manyetik

özelliğe sahip mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojellerin hazırlanması gerçekleştirilmiş ve ardından karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra kompozit polimerlerden in-vitro koşullarda Mitomisin C salımı incelenmiştir.

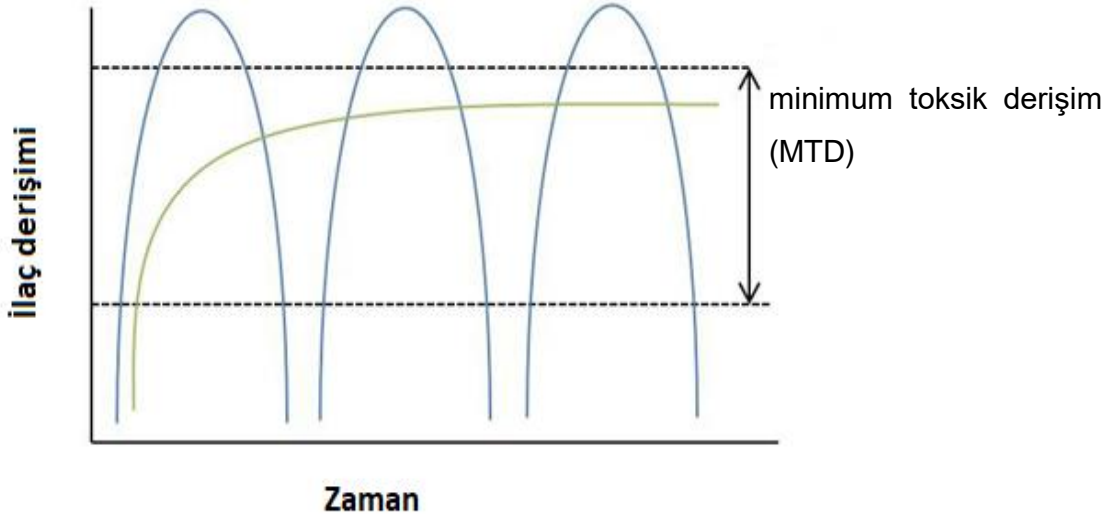
### **2.1.2. Kontrollü Salım**

Kontrollü ilaç salım sistemleri, öngörülebilir kinetiklerle ilaç salımı kontrollü bir şekilde ilacın serbest bırakılmasına yönelik geliştirilmiştir. Kontrollü salım zaman ve salımın kontrollü olmasına yönelik sınıflandırılabilir [19]. Zaman kontrollü salım sistemlerinin amacı, ilacın uzun bir süre boyunca sürekli salınmasına dayanmaktadır.

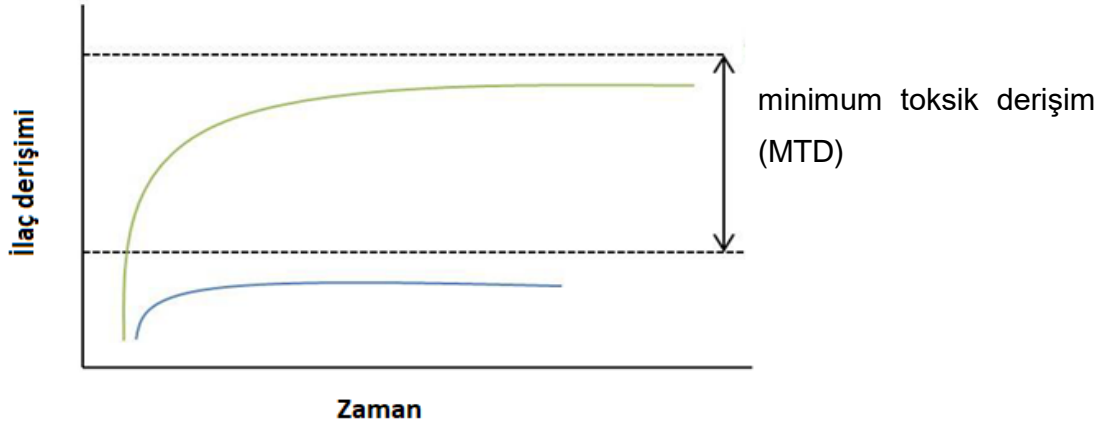
Şekil 2.1, geleneksel ilaç formülasyonlarından ve bir polimerik kontrollü ilaç salım sisteminden elde edilen ideal ilaç seviyelerinin karşılaştırılmasıyla zaman kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantajlarını göstermektedir. Şekil 2.1’de ilacın plazma derişim değışiklikleri gösterilmektedir. Tek bir geleneksel ilaç formülasyonu aldıktan sonra, ilaç seviyesi hızla maksimuma yükselir ve ardından ilacın vücuttan atılmasıyla kısa bir süre sonra minimum seviyeye düşer. Daha sonra ikinci bir uygulama gerekli hale gelir. Başka bir benzer doz alındıktan sonra maksimuma çıkar ve tekrar minimuma düşer.

Ayrıca, Şekil 2.1 toksik etkilerin ortaya çıktığı ve altında etkili olmadığı ilaç seviyesini gösterir. Bu ilaç toksisite ve verimsizlik döngüleri her ilaç alımında meydana gelecektir. Genellikle doz miktarını arttırmak, ilaç alım sıklığını minimum seviyelerinde tutar, ancak bu aynı zamanda toksisiteyi artırır.

Ancak, kontrollü bir ilaç salım sistemi ile ilaç seviyesi etkili bir seviyeye yükselebilir ve terapötik pencere içinde uzun bir süre muhafaza edilebilir. Bu şekilde, tekrarlanan doz ve yan etkiler hafifletilebilir.



**Şekil 2.1.** Kontrollü ilaç salım sistemlerinde (yeşil çizgi) ve geleneksel ilaç formülasyonlarında (mavi çizgi) ilaç derişiminin zamanla değişiminin karşılaştırılması.



**Şekil 2.2.** Kontrollü ilaç salım sistemlerinden ilaçların ideal dağılımı. Hedefte ilaç seviyesi (yeşil çizgi), vücutta ilaç seviyesi (mavi çizgi).

Şekil 2.2 hedef bölgedeki ve vücut plazmasındaki ideal ilaç dağılımını göstermektedir. Kontrollü salımın amacı, vücutta herhangi bir toksik yan etkiye neden olmadan uygun ilaç seviyesini uzun bir süre boyunca etkin kılmaktır. Geleneksel ilaç uygulaması, hedefte etkili bir seviyeye ulaşmasına rağmen, genellikle diğer dokularda veya organlarda ciddi toksisiteye yol açar. İlaç salım sisteminde istenilen alana istenilen



dozda ilacın uygulanması ile kontrollü salım gerçekleştirilebilir. Bu sistemde ilaç, yüklenmiş olan malzemeden salınacak ve doğrudan hedef bölgeye ulaşacaktır.

### **2.1.3. İlaç Salımının Matematiksel Modellemesi**

Matematiksel modelleme, kilit parametreleri ve molekül salım mekanizmasını tanımlayarak kriyojellerin tasarımını kolaylaştırmakta önemli bir rol oynar [20]. İlaç salım sistemlerinin başarısı sadece uygun ağ yapısı tasarımına değil, aynı zamanda ilaç salım profillerinin doğru matematiksel olarak modellenmesine de bağlıdır.

İlaç salımının kontrolünde yer alan fiziksel, kimyasal olayların yanı sıra potansiyel olarak biyolojik olayların kantitatif analizi de temel olarak yer almaktadır. Bu bilgi sadece akademik çıkarlar için değil aynı zamanda güvenli tedavilerin etkin bir şekilde iyileştirilmesi için bir ön koşuldur. Bu özellik aynı zamanda dar terapötik pencereye sahip olan oldukça güçlü ilaçlar için geçerlidir.

### **2.1.4. İlaç Salım Mekanizması ve Teorileri**

İlaç taşınım sistemleri, terapötik uygulamalarda ilaç salımı amacıyla kullanılan yenilikçi bir teknolojidir. Akıllı ilaç taşınım sistemleri, son yıllarda, bilim insanlarının, biyomedikal ve farmasötik alanlarının dikkatini çekmeyi başarmıştır. İlaç taşınım sistemlerinin temel amacı, ilaç tedavisinin, hastanın vücuduna salınan ilacın konvansiyonel terapötik dozunun salımının etkinliğini ve güvenliğini arttırmaya yöneliktir. Aynı zamanda, yan etkileri azaltmak ve ilacın vücuttaki varlığının farmakolojik etkisini koruyarak hastaya uzun bir süre boyunca ve mümkün olabilecek en minimum dozu sağlamak da amaçlar arasındadır [21].

İlaç salımına dâhil olan tüm olası parametreleri hesaba katmak açıkça imkânsızdır. Dahası, yukarıda belirtilen faktörler çoğunlukla canlı vücutta sonraki sonuçları değil, sadece in-vitro salım deneyi ile ilgilidir. Canlı vücuttaki mekanizma söz konusu olduğunda, enzimatik bozunma, protein bağlanması, hücrelere aktif ve pasif ilaç alımı, metabolizma ve hücre veya hücre dışı alanda bileşenler ile etkileşmesi gibi daha karmaşık faktörlerin göz önünde bulundurulması gerekir [20]. Bu nedenle, matematiksel bir model için sadece fiziksel ve kimyasal faktörlerin dikkate alınması değil, biyolojik olayların da dikkate alınması çok önemlidir. Geliştirilen birçok teori bu önemli basitleştirmelere dayanmaktadır.

Siepmann ve Peppas [21], matris sistemlerinden ilaç salımını tasarlamak için modelleme yöntemlerine ayrıntılı bir genel bakış sundular. Salım davranışının hız kontrol adımına dayanarak, bu modeller esas olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılır:

1. Difüzyon kontrollü
2. Şişme kontrollü
3. Kimyasal kontrollü

Difüzyon kontrollü, özellikle kriyojellerden ilaç salımını anlatmak için en yaygın olarak uygulanan mekanizmadır. Fick'in sabit veya değişken difüzyon katsayıları ile difüzyon yasası modellemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Difüzyon mekanizması, difüzyonun iç ve dış işlemi olarak sınıflandırılabilir. Dış difüzyon, ilaç molekülü kriyojel matrisinin yüzeyinden sıvı fazın kütlesine difüze olduğunda ortaya çıkar. Sadece çok istisnai durumlarda, dış difüzyon ilaç salım hızının kontrolünü ele geçirebilir. Genel olarak, ilaç salım hızı iç olaylara, özellikle de iç difüzyona bağlıdır.

Fick'in difüzyon yasasına dayanan teoriler iki tip sistemde sınıflandırılabilir:

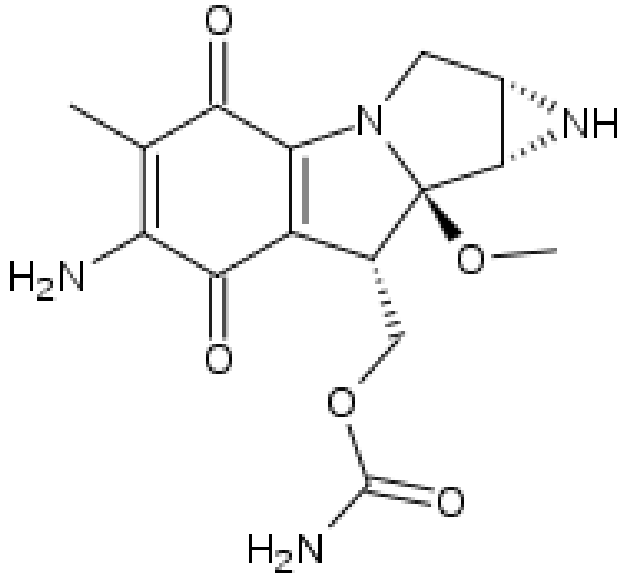
1. Rezervuar sistemleri, burada bir ilaç deposu salım hızı kontrol bariyeri olan bir membran ile çevrilidir.
2. İlacın lokal bir fark olmaksızın eşit olarak dağıtıldığı monolitik sistemler.

Rezervuar sisteminde, kapsüllenmiş bir ilacın zardan difüzyonu hız sınırlayıcı adımdır. İlaç membran tarafından iç hacimden emilir. Daha sonra zardan yayılır ve membrandan rezervuar sistemini çevreleyen sıvıya desorbe edilir.

Diğer mekanizma ise şişme kontrollü sistemdir. Şişme kontrollü salım, ilacın difüzyonu hidrojel şişmesinden daha hızlı olduğunda ortaya çıkar. Şişme kontrollü sistemlerde hidrojeller, camsı bir durumdan kauçuksu bir duruma kadar şişmeye bağlı faz geçişine uğrayabilir. Bu mekanizmanın modellenmesi genellikle, şişmiş hidrojellerin kauçuk ve camsı fazlarının arayüzünde moleküllerin salındığı hareketli sınır koşullarını içerir. Camsı halde, tutulan moleküller hareketsiz kalır. Kauçuk halde çözülmüş ilaç molekülleri, şişmiş polimer tabakası yoluyla sıvıya hızla yayılır.

## 2.2. Mitomisin C

Mitomisin C (MMC), seçici olmayan antitümör aktivitesi nedeniyle, kansere karşı kemoterapi tedavilerinde kullanılan bir DNA alkilleme ajanıdır. MMC, *Streptomyces caespitosus* adlı bakterinin kültüründen elde edilebilen, tek başına ya da diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte ve gastrointestinal, akciğer, rahim ağzı, baş-boyun, pankreas ve idrar torbası kanserlerinde ve kronik lösemi hastalığında kullanılabilen, doğal bir üründür. MMC, tümör hücrelerinde, DNA çift sarmal yapısının iki ayrı zinciri arasında çapraz bağlar oluşturarak, DNA replikasyonunu inhibite etmesi nedeniyle antitümör özellik gösterir. Mitomisin C'nin klinik uygulamalardaki kullanımını kısıtlayan, çok sayıda akut ve kronik toksik özellikleri mevcuttur. Literatürde, MMC'nin toksik etkilerini azaltmaya yönelik olarak çeşitli taşıma yöntemleri gösterilmiştir. İlaç taşıma için en etkili yaklaşımlardan bir tanesi de moleküler baskılama yöntemidir. Yoğun kullanımında kemik iliği toksisitesi göstermektedir. Ayrıca akciğer fibrozu ve böbrek hasarına yol açmaktadır. Mitomisin C intravenöz değil daha çok topikal olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.3. Mitomisin C molekülü.

**Çizelge 2.1.** Mitomisin C molekülünün özellikleri.

<b>Moleküler formülü</b>	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>
<b>Mol kütlesi</b>	334.33 g mol <sup>-1</sup>
<b>Görünümü</b>	Beyaz veya renksiz katı
<b>Erime noktası</b>	360 °C, 633 K, 680 °F
<b>Suda çözünürlüğü</b>	8.43 g L <sup>-1</sup>
<b>log P</b>	-1.6
<b>İzoelektrik noktası</b>	10.9

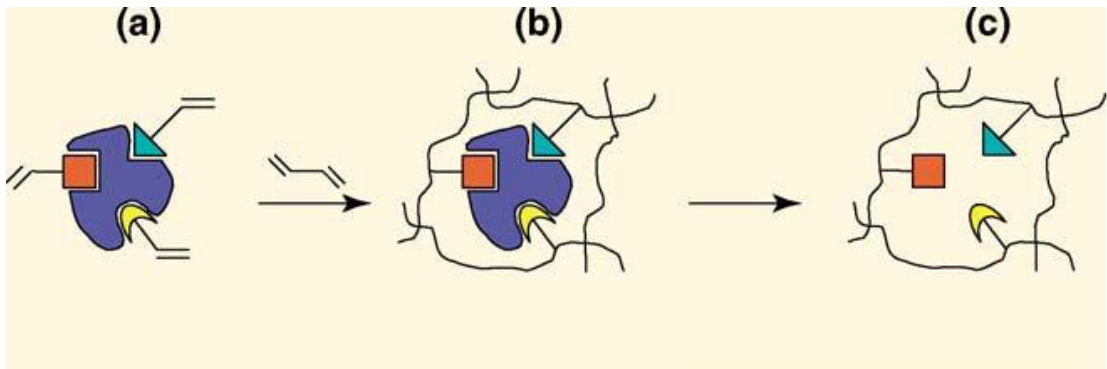
### 2.3. Moleküler Baskılama Yöntemi

Moleküler baskılama (MI) yöntemi, proteinler, hücreler ve virüsler gibi biyolojik yapıları ve molekülleri tanımaya elverişli yenilikçi malzemelerin tasarımını ve sentezini kapsar ve potansiyel olarak yararlı ve pratik uygulamaları mevcuttur. Bu malzemelerin özel uygulamaları, biyofarmasötiklerin saflaştırılmasında kullanılan aşağı yönlü biyoişlemler, ilaç salımı, diyagnostikler, sensörler ve benzeri alanlardır. MI yöntemi, hedeflenen moleküllere karşı reseptör görevi üstlenecek olan polimerlerin yüzeyine komplementer fonksiyonel grupların eşleşen özgün dağıtım stratejisiyle gerçekleştirilir ve küçük organik moleküllerin substrat olarak kullanımını kapsar. İlgilenilen molekülün, kovalent, kovalent olmayan veya metal iyonu koordinasyonu etkileşimleri aracılığıyla, fonksiyonel monomerlerle etkileşmesi sağlanır. Genellikle, MI yöntemi ile yapılan ilaç taşınım çalışmaları sayesinde, kovalent olmayan etkileşimlerin ilaç taşıma sistemlerine yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Metal iyonu koordinasyonu baskılaması, zayıf kovalent olmayan etkileşimler için alternatif bir yaklaşımdır. Metal iyonu koordinasyonu, hidrojen bağlarına kıyasla daha güçlüdür ve bu sayede sulu ortamda daha düzenli davranır. Buna ek olarak, metal iyon koordinasyonu hızlı bir bağlanma işlemidir ve bağlanma kuvvetinin, tanımlanan şablon bir moleküle uygun bir metal iyonu seçilmesiyle ayarlanabildiği bir yöntemdir. Ayrıca metal iyonu koordinasyonu yöntemi, kullanılan metal iyonunu farklı bir metal iyonu ile değiştirerek seçiciliği arttırmada veya moleküler baskılanmış polimeri farklı amaçlara yönelik kullanmada

önemli bir potansiyel taşıyıcıdır. Böylece, metal iyonu koordinasyonu yaklaşımı, sulu ortamlarda, yüksek seçiciliğe sahip moleküler baskılama polimerlerinin hazırlanmasında önemli bir potansiyele sahiptir. Son zamanlarda, moleküler baskılama yöntemi, ilaçlar, aminoasitler, peptitler, hormonlar ve proteinler için, terapötik ilaçların yavaş ve daha uzun salımını sağlaması ve yükleme kapasitesindeki artış nedeniyle dikkatleri giderek üzerine çekmiştir.

Moleküler tanıma, çeşitli etkileşim türleri yoluyla iki veya daha fazla molekül arasındaki etkileşimler ile ifade edilebilir. Moleküler baskılama, moleküler tanıma yoluyla polimerik malzemelerin kullanımıyla oldukça seçici bağlanma kapasitesine sahip oyukları oluşturmak için umut verici bir alternatiftir. Çeşitli molekül türlerini hedefleyen bu yöntemin benzersiz özelliklerini gösteren birçok MIP vardır.

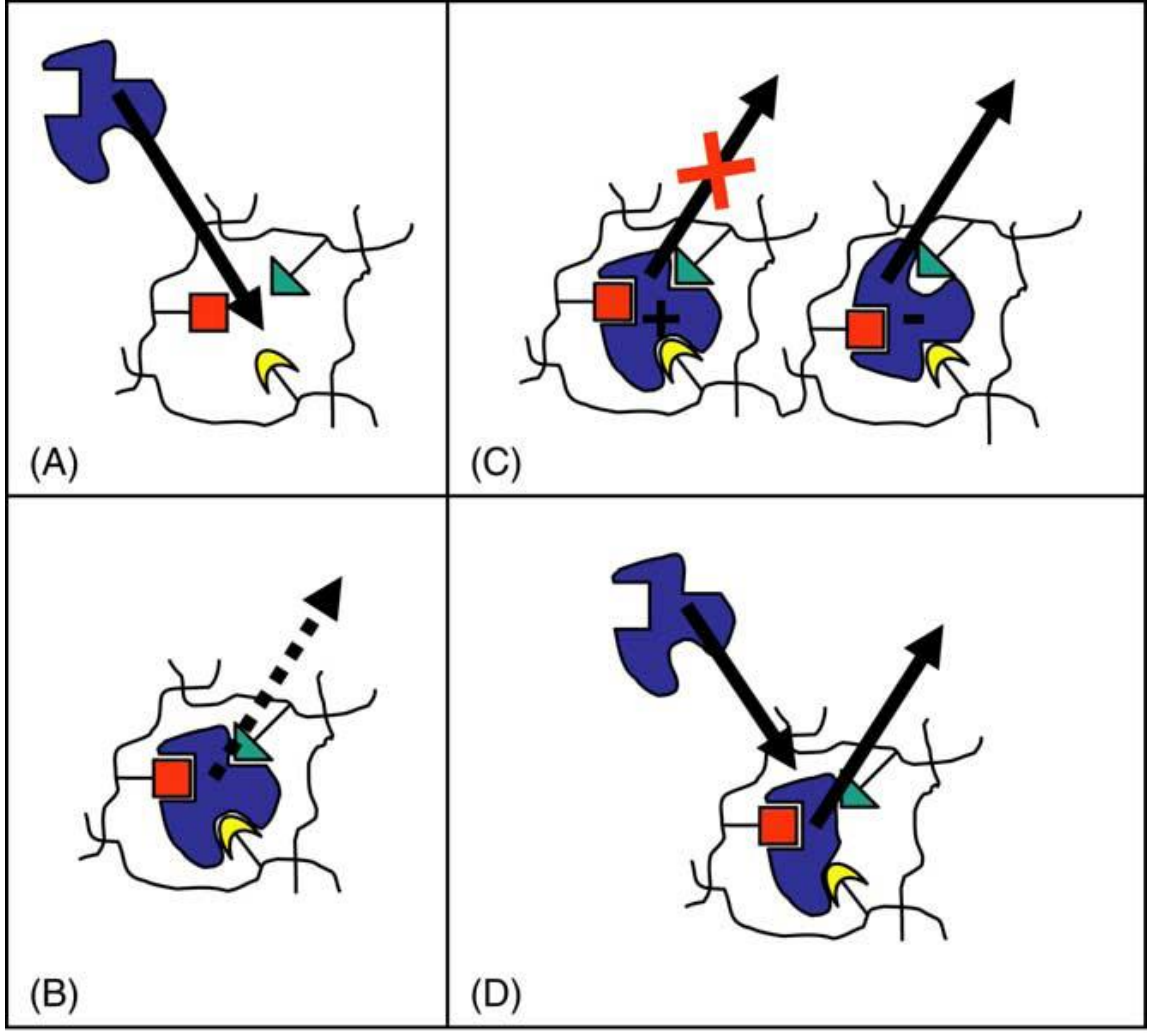
İlgilenilen molekül, yani bir şablon molekülü, kovalent, kovalent olmayan veya metal iyonu koordinasyon etkileşimleri yoluyla fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcılarla çevrilir. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra, şablon molekül belirli bir bağlama boşluğu bırakarak bu polimerik yapıdan çıkarılır. Hedef molekül, kovalent veya metal iyon koordinasyon etkileşimleri yoluyla fonksiyonel monomerler ve çapraz bağlayıcılarla çevrilidir. İyon koordinasyonu yoluyla moleküler baskılama, yüksek seçicilik ve kararlılık sağlar. Bu bağlamda, metal iyonları, hedef molekül ile monomer arasında bir arabulucu olarak rol yapar [22,23] (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Moleküler baskılama yönteminin şematik gösterimi: (a) kalıp ve fonksiyonel monomer arasında kovalent veya non-kovalent konjugat oluşturulur; (b) monomer-kalıp kompleksi polimerleştirilir; (c) kalıp molekül polimerden uzaklaştırılır.

İlk basamakta, uygun kimyasal fonksiyona sahip monomerler kalıp ile kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlerle kompleks oluşturur. İkinci basamak süresince polimer zincirleri oluşmaya başlar, başlangıçta esnek olan zincirler polimerizasyon ilerledikçe çapraz bağlanır ve etkileşen monomerlerin fonksiyonel grupları kalıba topografik olarak tamamlayıcı bir konumda sabitlenir. Üçüncü basamakta, kalıplar polimerden uzaklaştırılarak kalıba uygun şekilde ve uygun pozisyonlarda fonksiyonel gruplar taşıyan boşluklar kalır. Bu boşlukların varlığı, sonrasında hedefin seçimli olarak tekrar bağlanmasıyla ortaya konmuştur. Dolayısıyla moleküler baskılanmış polimerler (MIP) biyolojik reseptörlerin iki önemli özelliğine sahiptir; spesifik moleküllerin tanınması ve bağlanması. Elde edilmeleri kolaydır, ucuzdurlar ve farklı kimya alanlarına kolaylıkla uygulanabilmektedirler (kromatografik durağan fazlar, sensörler, katalizörler, immünotayinler ve adsorpsiyon). Böylelikle MIPlerin seçici adsorbent olarak kullanımları oldukça umut vericidir.

Son yıllarda daha karmaşık ilaçların ve biyofarmasötiklerin geliştirilmesi ve bu alandaki araştırmaların giderek önem kazanması ile birlikte polimerik maddelerden ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. İdeal bir ilaç salım sisteminin ilacı doğru yerde, yeterli miktarda ve istenen zamanda salması beklenmektedir. Bu alanda kullanılan farklı malzemeler arasında MIP'ler dikkate değer bir performans göstermiştir. Moleküler baskılanmış polimerlerde genellikle fonksiyonel grupların yönlendirmesinin sabitlenmesi ve moleküler tanıma özelliklerinin korunabilmesi yüksek derecede çapraz bağlama ile sağlanmaktadır. Özellikle suda çözünen monomerlerle hazırlanan polimerler dışarıdan bir uyarı ile farklı şişme davranışı gösterebilmektedirler. Bu dış uyarı sıcaklık, pH, iyonik şiddet, çözücü, kimyasal ajanlar, elektrik alan ve UV veya görünür bölge ışınları olabilmektedir. Şişme derecesindeki bu değişiklik baskılanmış molekülün tutulması ve salımını düzenlemek üzere kullanılmaktadır. Baskılanmış polimerler düşük molekül ağırlıklı bileşikler için rezervuar olarak davranırlar. İlacın salınma hızını azaltarak ilacın vücutta alıkonma süresini arttırlar. İlacın dar bir tedavi edici çerçeveye sahip olduğu durumlarda MIP salım araçları ilacın vücuttaki derişiminin istenmeyen yan etkilerinin baskın olduğu değerler altında kalmasını sağlayabilir. MIP hidrojenlerin ilaç salımı için kullanılması ilacın salındığı yerin belirlenebilmesi avantajını da sağlamaktadır.



**Şekil 2.5.** Moleküler baskılama ile ilaç yükleme ve salımının düzenlenmesi: (A) ilaç yükleme aşaması, (B) uzatılmış salım, (C) enantiyoseçici salım, (D) etki duyarlı salım.

#### 2.4. Kriyojeller

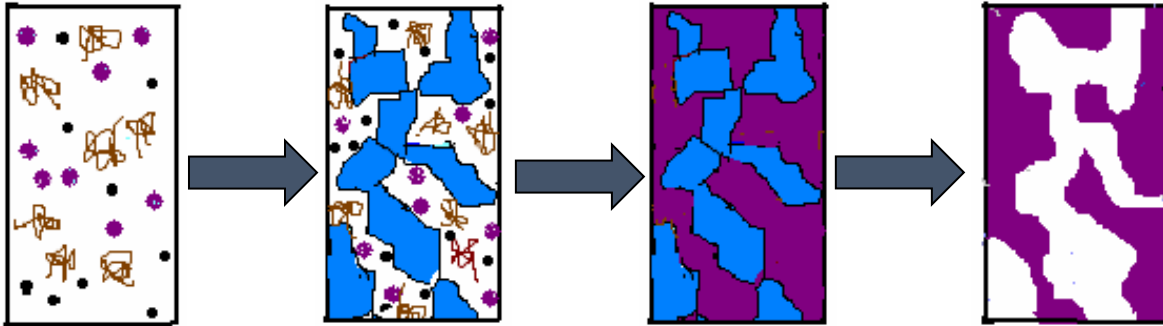
Kriyojeller, kriyotropik jelleştirme yöntemi ile sentezlenen makro gözenekli polimerik jellerdir. Gözenek büyüklükleri, mikrometrenin onda birinden yüzlerce mikrometreye kadar değişkenlik gösterebilmektedir. Kimyasal ve mekanik kararlılıkları, enzim immobilizasyonu için taşıyıcılar, mikrobiyal hücre ve antikor immobilizasyonu, biyoafinite malzemeleri ve ilaç taşınım sistemleri için jel tabanlar gibi biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda kullanışlı olmalarını sağlamaktadır. Kriyojeller biyolojik nanoparçacıkların ve hatta bütün hücrelerin kromatografisi için kullanılır. Kriyojelin şişme kinetiği aynı zamanda ilaç dağıtım sistemlerinin kullanılmasına yol açmaktadır.

Son zamanlarda kriyojeller moleküler baskılama tekniklerinde kullanılmaktadır [13,14]. Silindir, granül veya disk olarak istenen kriyojeller üretilebilir [24].

Kriyojellerin, yüksek hidrofilitik özellik, suda çözünmeden önemli ölçüde şişebilme, biyouyumluluk, hızlı cevap verme, esneklik ve yüksek mekanik kararlılığa sahip olma gibi avantajları mevcuttur.

Kriyojeller ve benzer büyüklükteki gözeneklere sahip diğer makro gözenekli malzemeler arasındaki temel farklılıklardan biri, kriyojellerin doku benzeri bir esnekliğe sahip olmasıdır. Kriyojeller, kimyasal başlatıcılar veya radyasyon tarafından uyarılan dondurulmuş çözeltilerdeki uygun monomerlerin polimerizasyonu üzerine oluşturulabilir [25].

Biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda kriyojellerin enzim immobilizasyonu için taşıyıcılar, mikrobiyal hücre ve antikor immobilizasyonu, biyoafinite sorbentleri için jel bazları ve tıbbi amaçlar için kolajen malzemeler gibi birçok potansiyel kullanımı vardır [26, 27]. Kriyojellerin hazırlanmasında Şekil 2.6'da görüldüğü gibi üç aşama bulunmaktadır; dondurma işlemi, ara durum ve ısıtma işlemleri.



Şekil 2.6. Kriyojellerin hazırlanmasının şematik gösterimi.

Kriyojeller 50 yıl önce keşfedilmesine rağmen, biyo ayrıştırma potansiyeli yaklaşık 15 yıl önce tanındı. Makrogözenekli kriyojeller, özellikle biyoteknoloji, biyotıp ve eczacılık alanlarında büyük ilgi görmektedir. Birbirine bağlı büyük gözenekleri, kan, plazma ve bitki veya hayvan doku özütü gibi viskoz ortamlarla çalışırken avantajlar sunar. Kriyojeller hem adsorpsiyon hem de elüsyon için kısa difüzyon yolu sağlar. Kriyojellerin bu özellikleri biyolojik olarak ilgili proteinlerin saflaştırılması için çok



avantajlıdır. Kriyojeller, herhangi bir difüzyon sınırlaması olmadan biyopolimerlerin ayrılmasına izin verir.

Kriyojeller, geleneksel polimerik malzemelerle karşılaştırıldığında proteinlerin, nükleik asitlerin ve polisakkaritlerin doğal kaynaklarından ayrılması için daha iyi sonuçlar verir. Farklı ligandlar, birkaç maddenin ayrılması veya uzaklaştırılması için kriyojeller üzerinde immobilize edilmiştir. Son on yılda, kriyojellere ligand olarak konkanavalin A, protein A, triptofan, histidin, triazin boyaları ve geçiş metal iyonları immobilize edilerek saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır. Ligand immobilize edilmiş kriyojeller immunoglobulin G, lizozim, albümin, DNA, sitokrom c, kolesterol ve lektinler gibi birçok makromolekülün saflaştırılması için kullanılmıştır [28-39]. Kriyojeller, fizikokimyasal özellikleri ve yüksek gözenekliliklerinden dolayı hücre immobilizasyonu için dikkat çekici destek malzemelerdir. Poli(akrilamid) ve poli(vinil alkol) kriyojelleri, hücre sıkışması veya adsorpsiyon için kullanılır. Kriyojeller hücre büyümesi ve çoğalması için uygun üç boyutlu yapıya sahiptir. Özellikle doku mühendisliğinde kullanılan destek malzemelerinin yüzey özellikleri hücre afinitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Kriyojeller hidrofilik ve gözenekli olduklarından hücre afinitesi için çok çekici malzemelerdir [40,41]. Kriyojeller ayrıca hücre afinite kromatografisinde de kullanılır. T ve B lenfositleri gibi özellikli hücre tiplerinin ayrılması için etkili araçlardır. Özelliklerinden dolayı, antikör bazlı afinite etkileşimleri genellikle hücreleri ham ekstraktan saflaştırmak için kullanılır. Hücre yüzeyi antijeninin antikora afinitesi, özellikli bir hücre tipinin izolasyonunu sağlar [42-47]. Son yıllarda kriyojeller kontrollü ilaç dağıtım sistemlerinde de kullanılmaktadır.

Kontrollü taşınım malzemelerinin önemini vurgulayan makalelere literatürde sıklıkla rastlanmaktadır. Allender ve arkadaşları fonksiyonel monomer olarak, MAA (metakrilik asit) kullanmış ve akış zayıflatıcı yardımcı bir madde üretmek amacıyla, transdermal kontrollü bir salınım cihazı için propranol baskılama yapmışlardır [48]. Başka bir çalışmada, Cai ve arkadaşları yavaş salım gereken bir ilaç taşınımında kullanmak amacıyla, MAA ile tetrasiklin baskılanan polimer bir malzeme hazırlamışlardır [49]. Puoci ve arkadaşları baskılama tekniği için fonksiyonel polimer olarak MAA kullanarak, sulfasalazinin kontrollü taşınımını göstermişlerdir [50]. Baljit Singh ve Nirmala Chauhan, 2-hidroksietil metakrilat ve akrilik asit temelli 5-fluorourasil baskılanan hidrojeller hazırlamışlar ve bu süreçte de çapraz bağlayıcı olarak N-N'-metilenbisakrilamid kullanmışlardır [51]. Çetin ve ark. antineoplastik ilaç olan

florourasilin in-vitro ortamda salımını incelemek amacıyla, farklı çapraz bağlayıcı oranlarına ve farklı ilaç miktarlarına sahip florourasil baskılanmış kriyojel diskler hazırlanmışlardır. Kontrol grubu olarak PHEMA kriyojel diskleri de sentezlenmiştir. İlacın aktivitesini kaybetmeden, kriyojel matrikste homojen bir şekilde dağıtıldığı 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 [2]. Bakhshpour ve ark. Mitomisin C'nin kontrollü salımı için Mitomisin C baskılanmış PHEMA temelli kriyojel membranlar hazırlamış ve in-vitro ortamda ilaç salım performansını belirleyerek, ilaç salımının matematiksel analizini gerçekleştirmişlerdir [3].

## **2.5. Manyetizma ve Manyetik Partiküller**

Manyetik duyarlı polimerik yapılar, hem manyetik parçacıkların hem de polimerlerin yapısal özelliklerini taşırlar. Manyetik partiküllerin polimer yapısına yerleştirilmesi ile polimere manyetik özellikler kazandırılır. Bu özellik sayesinde, manyetik polimerlerin dışarıdan uygulanan manyetik alan ile karışık sıvı ortamlardan hızlı ve kolay bir şekilde ayrılması sağlanmaktadır. Bununla birlikte bu polimerler, manyetik enerjilerinin ısı enerjisine dönüşümüyle de ısı jeneratörleri olarak kullanılabilirler. Bu özellik, hipertermi ile kanser tedavisinde birincil önem taşımaktadır [52]. Polimerik manyetik partiküller, polimerik olmayan manyetik partiküllere göre; yapıyı daha kararlı kılmakla birlikte, yapıya şişme yeteneği ve esneklik gibi özellikler kazandırmaktadır. Ayrıca farklı uygulamalarda, polimerin yüzeyinde sahip olduğu fonksiyonel gruplara spesifik ligandlar da eklenebilmektedir. Böylece, immünotayin yöntemlerinde, nükleik asit dizi izolasyonunda, hedefli ilaç taşınmasında, sınıflandırılmış hücrelerin ayrılmasında, hücre ve mikroorganizma çalışmalarında, manyetik kuvvet tabanlı doku mühendisliğinde ve kontrast aracı olarak manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kullanımları mümkün olmaktadır [52-56].

İlaç salımı için yeni bir yaklaşım olarak sayılan manyetik alan yönlendirmesiyle hedefli ilaç taşınması, manyetik polimerler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu yaklaşımda, manyetik polimerler intravenöz olarak verildikten sonra, manyetik alan uygulanan hedef bölgeye yönlendirilmekte ve yalnızca o bölgede ilaç salımı

gerçekleştirmesi amaçlanmaktadır. Böylece ilacın tedavi etkinliği geliştirilirken, sağlıklı hücre ve dokular üzerindeki yan etkileri en aza indirilmektedir [57].

Bütün ilaç taşıyıcı türleri arasından manyetik nanopartikül ilaç taşıyıcıları, eşsiz manyetik kabiliyetleri nedeniyle yaygın olarak araştırılmıştır. Manyetik ilaç taşıyıcılarını yüksek bir manyetik alan ile bir araya getirdiğimizde, fazladan üç temel işlev karşımıza çıkar.

**i.** Manyetik ilaç taşıyıcıları, dışarıdan uygulanan bir manyetik alan yardımı ile tümörlü doku ya da hücrede daha fazla birikmeleri amacıyla ve diğer çok yönlü hedefleme protokollerinin ötesinde, hedeflenen bölgeye yönlendirilebilirler.

**ii.** Manyetik ilaç taşıyıcı sistemler, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) uygulamalarında negatif kontrast maddesi görevini de üstelenebilirler. Manyetik ilaç taşıyıcıları, tedavi ve takibinde tedavi amacıyla kullanılan terapötikler ile teşhis aşamasında kullanılan diyagnostikleri eşzamanlı olarak bir araya getirerek “teranostik” kavramını oluşturur.

**iii.** Son olarak manyetik ilaç taşıyıcıları, değişken (alternatif) manyetik alanların altında, yüksek sıcaklıklarda ısınarak tümör hücrelerinin apoptoz ve nekroza uğramasına neden olur. Bu uygulamalara da “hipertermi” adı verilir [58].

Polimerler farklı ya da aynı monomer birimlerin çok sayıda tekrar ettiği makromoleküler yapılardır. Bu makromoleküler yapılar doğal ya da sentetik olabilirler. Kauçuk, proteinler, selüloz, nişasta, jelatin, kollajen, dekstran, kitosan gibi polimerik yapılar doğal polimerler olarak anılırken, poli(etilen), poli(stiren), poli(vinil alkol), poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(kaprolakton) gibi polimerler sentetik polimerler olarak bilinirler. Polimerler hidrofobik ve hidrofilik olmalarına göre sınıflandırılabilirler gibi ısıya karşı gösterdikleri davranışa göre de termoplastikler ve termosetler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Termoplastikler ısı altında yumuşatılarak şekillendirilebilirken, termosetler bir kere şekil aldıktan sonra ısı uygulanarak eritemeyen polimerlerdir. Polimerler için önemli bir diğer sınıflandırma da biyolojik özelliklerine; biyoparçalanabilirliklerine ve biyouyumluluklarına göre yapılmaktadır [59, 60].

Polimerler, kolay şekillenme, düşük yoğunluk (hafiflik), kimyasal maddelere karşı kararlılık, karmaşık geometrilere biçimlenme, düşük ısı iletimi, ucuzluk, korozyona

uğramama, estetik görünüm, düşük elektrik iletimi, esneklik gibi üstün özelliklerinden dolayı hayatın hemen hemen her alanında kullanılan malzemelerdir. Üretiminde polimerlerin kullanıldığı bazı malzemeler plastik parçalar, kauçuk, lif, yapıştırıcı, boya, köpük, kaplama, tıbbi malzeme ve implant malzemeleri olarak sıralanabilir [59].

Polimerler fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde birçok farklı uygulama için tasarlanabilme olanağı tanıyan malzemelerdir. Bu tasarım polimerin uygulama alanına göre pH, sıcaklık, çözücü bileşenleri gibi ortam koşullarına karşı kararlılık, sertlik, esneklik gibi özellikleri göz önünde bulundurularak polimerizasyon yöntemi ve polimerizasyon reçetesinde yapılan değişikliklerle gerçekleştirilebilir. Böylece kullanım alanına göre polimer özellikleri geliştirilebilir; örneğin biyolojik bir sistem için tasarlanan bir polimere çeşitli ligandlarla türevlendirmek yoluyla biyouyumluluk özelliği kazandırılabilir.

Sıcaklık, pH, iyon şiddeti, çözücü yapısı, manyetik alan gibi çevresel faktörlerden etkilenen polimerler akıllı polimerler olarak anılmaktadır. Akıllı polimerler hassasiyet gösterdikleri dış uyarının değişen koşullarına cevap olarak uygun davranış gösterirler ve bu özellikleri göz önünde bulundurularak tasarlanırlar. Bu uyarılardan biri olan manyetik alan, polimerlere anlık hareket ve temassız kontrol gibi ek avantajlar sağlamaktadır. Polimerler için manyetik alana duyarlılık polimer yapısına katılan manyetik parçacıklarla elde edilir [61]. Manyetik duyarlı polimerik yapılar hem manyetik parçacıkların hem de polimerlerin yapısal özelliklerini taşırlar. Manyetik partikülün polimer yapısına sokulmasıyla manyetik özellik polimere kazandırılır. Bu özellik sayesinde, manyetik polimerlerin dışardan uygulanan manyetik alan ile karışık sıvı ortamlardan hızlı ve kolay bir şekilde ayırımı sağlanmaktadır. Bununla birlikte bu polimerler manyetik enerjilerinin ısı enerjisine dönüşümüyle de ısı jeneratörleri olarak kullanılabilirler. Bu özellik hipertermi ile kanser tedavisinde birincil önem taşımaktadır [61,62]. Polimerik olmayan manyetik partiküllere göre, polimerik manyetik partiküller yapıyı daha kararlı kılmakla birlikte yapıya şişme yeteneği, esneklik gibi özellikler kazandırmaktadır. Ayrıca farklı uygulamalarda polimerin yüzeyinde sahip olduğu fonksiyonel gruplara spesifik ligandlar eklenebilmektedir. Böylece immünotayin yöntemlerinde, nükleik asit dizi izolasyonunda, hedefli ilaç taşınmasında, sınıflandırılmış hücrelerin ayrılmasında, hücre ve mikroorganizma çalışmalarında,

manyetik kuvvet tabanlı doku mühendisliğinde ve kontrast aracı olarak manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kullanımları mümkün olmaktadır [61, 62, 63, 64, 65]. Bilindiği gibi elektronların atom çekirdeği etrafındaki orbital hareketleri ve kendi çevrelerindeki spin hareketi olmak üzere iki adet elektronik hareketleri vardır. Manyetik alan elektriksel yükün göreceli hareketinden kaynaklanır ve herhangi bir manyetik yükten söz edilemez. Dolayısıyla manyetizma yüklerden çok yüklerin hareketinin bir sonucudur [61, 65].

Manyetik alan “H” ile, manyetik malzemenin birim hacmi başına düşen manyetik moment (manyetizasyon) “M” ile ifade edilir. Manyetizasyon, M, atomdaki elektronların yukarıda bahsedilen orbital ve spin hareketlerinin bir sonucudur. Bunlar makroskopik olarak eşlenik ya da etkin akım şeklinde gözlenirler. Serbest ve eşlenik akıma bağlı olarak oluşan alan da manyetik indüksiyon “B” olarak tanımlanır. Bu nicelik aşağıdaki eşitlikle tanımlanır [65].

$$B = H + 4\pi M \quad (2.1)$$

Manyetik alana yerleştirilen maddenin manyetik duyarlılığı,  $\chi$ , manyetizasyonun manyetik alanın büyüklüğüne oranı olarak ifade edilmektedir.

$$\chi = M/H \quad (2.2)$$

Manyetik alana yerleştirilen maddenin manyetik geçirgenliği,  $\mu$ , ise manyetik indüksiyonun manyetik alanın büyüklüğüne oranı olarak ifade edilmektedir.

$$\mu = B/H \quad (2.3)$$

Tüm malzemeler manyetik alandan etkilenirler ancak bu etkileşimin derecesi kimilerinde çok zayıfken, kimilerinde çok kuvvetlidir. Doğada manyetik alan etkileşimleri, manyetizmanın kabaca üç ana sınıfta incelenebileceğini göstermektedir [61].

1. Diyamanyetizma: Manyetik kutuptan itici zayıf etkileşimlerdir. Su, tahta, plastik, NaCl, SiO<sub>2</sub> ve birçok organik ve biyolojik malzemeler olmak üzere maddelerin çoğunluğu diyamanyetiktir. Bir diamanyetik molekül için manyetik indüksiyonun (B) manyetik alana (H) oranı yani manyetik geçirgenliği ( $\mu$ ) birden küçüktür ve manyetizasyon ( $\chi$ ) değeri negatiftir.

2. Paramanyetizma: Manyetik kutba doğru zayıf etkileşim söz konusudur. Bir paramanyetik molekül için manyetik indüksiyonun (B) manyetik alana (H) oranı yani manyetik geçirgenliği ( $\mu$ ) birden biraz büyüktür ve manyetizasyon ( $\chi$ ) değeri pozitifdir.

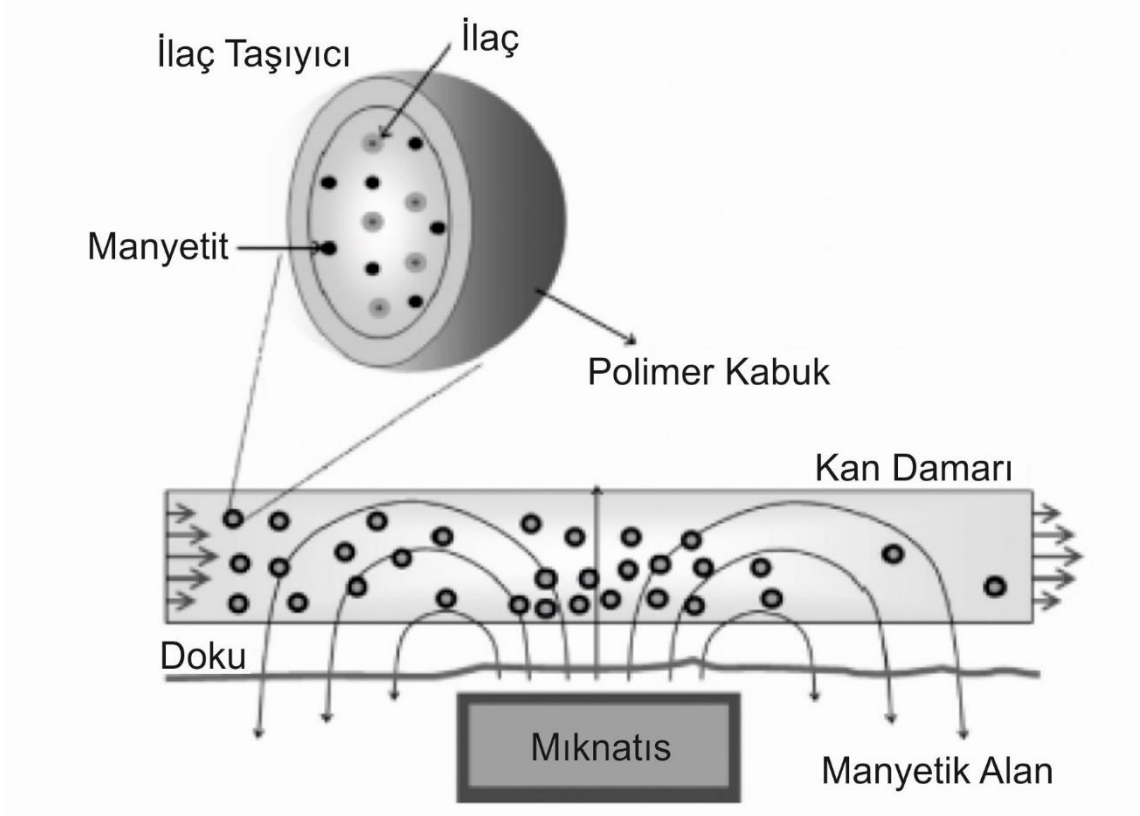
3. Ferromanyetizma: Manyetik kutba doğru güçlü etkileşim söz konusudur. Fe, Co, Ni ferromanyetik maddelere verilen klasik örneklerdir. Bir ferromanyetik molekülde manyetik indüksiyonun (B) manyetik alana (H) oranı yani manyetik geçirgenliği ( $\mu$ ) birden çok büyüktür ve manyetizasyon ( $\chi$ ) değeri pozitifdir.

### **2.5.1. Manyetik Polimerlerin Uygulama Alanları**

Manyetik polimerler; manyetik depolama ortamı olarak, biyosensör uygulamalarında, antitümoral tedavide (hipertermi) ve hedefli ilaç taşınması ve salımı gibi tıp uygulamalarında, kontrast ajanı olarak manyetik rezonans görüntüleme (MRI), biyoayırılarda sınıflandırılmış hücrelerin ve biyomoleküllerin ayrılmasında, enzim immobilizasyonunda ve saflaştırılmasında, manyetik kuvvet tabanlı doku mühendisliğinde kullanımları gibi sınırsız uygulama alanına sahiptir. Manyetik partiküllerin tıp uygulamaları için toksik olmayan, biyouyumlu özellikte olup enjekte edilebilmeleri, hedeflendirilebilecek şekilde tasarımları veya türevlendirilebilmeleri mümkündür [67].

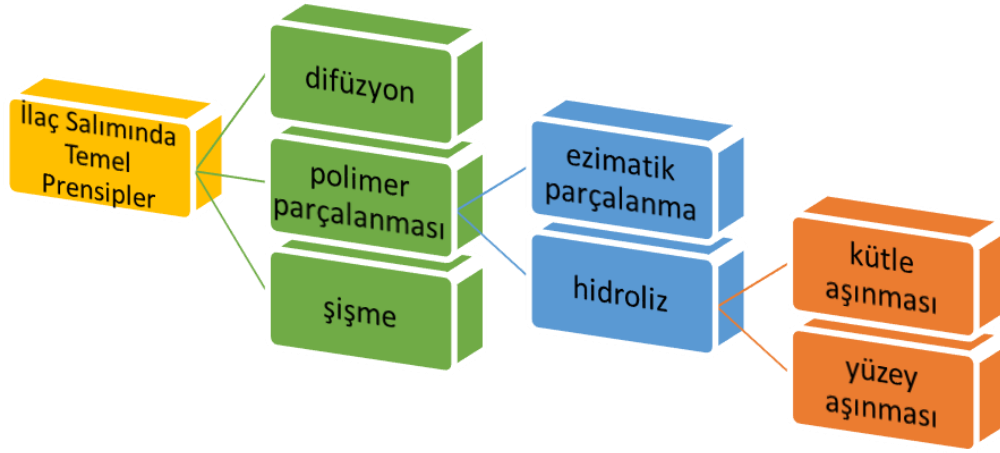
### **2.5.2. Manyetik Polimerlerin İlaç Salımında Kullanımı**

İlaç salımı için yeni bir yaklaşım olarak sayılan manyetik alan yönlendirmesiyle hedefli ilaç taşınması manyetik polimerler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu yaklaşımda manyetik polimerler intravenöz olarak verildikten sonra manyetik alan uygulanan hedef bölgeye yönlendirilmekte ve yalnızca o bölgede ilaç salımı gerçekleştirmesi amaçlanmaktadır. Böylece ilacın tedavi etkinliği geliştirilirken sağlıklı hücre ve dokular üzerindeki yan etkileri en aza indirilmektedir [67]. İkili ilaç salım sistemi geliştirilen güncel bir çalışmada iki hidrofilik ilacın, doxorubicin (antikanser ilacı) ve verapamilin (antianjiokardiopati ilacı), kitosan kaplı manyetik nanopartiküllerle birleşiminin ardından polilaktid-ko-glikolikasit (PLGA) nanopartiküllerinin içine hapsedilmesi söz konusudur. Sonraki türevlendirmede nanopartikül üzerine tümör hedefleyici ligand proteini bağlanmıştır. Partikülün son hali 140 nm civarında olup in-vivo ilaç salımı için kullanılmıştır. Elde edilen manyetik polimerin tümör büyümesini inhibe etmesi ve güvenli kanser tedavisine olanak sağlaması amaçlanmıştır [68]. Manyetik polimerlerle manyetik alan yardımıyla hedefli ilaç taşınması Şekil 2.7’de gösterilmektedir.



**Şekil 2.7.** Hedefli ilaç taşınmasının şematik gösterimi. Manyetik ilaç taşıyıcı polimer doğrudan hedef bölgede ilaç salımı yapmaktadır [63].

Manyetik alan ile hedef bölgeye yönlendirilen ilaç taşıyıcı manyetik polimerlerden ilacın salınması için, difüzyon, parçalanma ve şişme olmak üzere üç ana mekanizma vardır. Difüzyonda ilaç vücut sıvılarında çözünebilir ve polimerden ayrılır, parçalanmada polimer zincirleri hidrolize olabilir ya da enzimatik olarak parçalanabilir. Şişme için ise başlangıçta kuru olarak alınan polimer vücut sıvılarına girdiğinde şişerek ilacın dışarıya dağılmasını sağlar. Şekil 2.8’de polimerik ilaç taşıyıcılarının salım mekanizmaları genel olarak şematize edilmiştir [63]. İlaç salımında dış uyaranlara cevap veren akıllı polimerler de kullanılmaktadır. Bunun için pH, sıcaklık ve manyetik alan duyarlı polimerler bir uyarana duyarlı olacak şekilde hazırlanabileceği gibi birden fazla uyarana duyarlı olarak da hazırlanabilmektedir [69,70].



**Şekil 2.8.** Polimerik sistemlerdeki ilaç salım mekanizmalarında bulunan temel prensipler.

İlaç salım sistemleri radyoaktif tedavilerde kullanılmak üzere de geliştirilmektedir. Radyoaktif iyotla (I-131) yapılan iki örnek in-vivo çalışmada manyetik poli(HEMA-APH) ile poli(HEMA-MAPA) nanopartikülleri sentezlenmiş ve radyoaktif iyodun biyodağılımıyla kanser tedavisi amaçlanmıştır [71].

İlaç taşıyıcı olarak kullanılan manyetik polimerin vücutta kullanımı, boyutu ile büyük oranda ilişkilidir. Söz konusu ilaç taşıyıcı manyetik polimerin vücuda alımından sonra 200 nm'den büyük partiküller önce hücrelerin fagositoz sistemlerine ulaşır ve ardından ilacın salımı gerçekleşir. 10 nm çapından küçük polimerler damarlardan kaçış ve renal klerens şeklinde hızla uzaklaşır. İntravenöz uygulamalar ve uzun kan dolaşım süreleri için 10 ile 100 nm arasındaki polimerler optimum boyutlardadır. Bu boyutlardaki polimerler vücudun retikülo-endotelyal sisteminden kaçabilecek, aynı zamanda da dokuların küçük kapillerlerine penetre olabilecek kadar küçük olup ilacın hedeflenen dokuya en etkin dağılımını sağlarlar [61].



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneysel çalışmalar üç ana bölümde gerçekleştirilmiştir. Birinci bölümde 1.6 µm çapında eşboyutlu manyetik poli(glisidil metakrilat) (mPGMA) mikropartiküller hazırlanmıştır. Bu bölümde daha sonra mPGMA mikropartiküllerin karakterizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İkinci bölümde manyetik mPGMA mikropartiküllerin yüzeylerine Mitomisin C moleküler olarak baskılanmış ve poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kriyojellere gömülerek kompozit ilaç taşıyıcı sistem (PHEMA/mPGMA-MMC) hazırlanmıştır. Sonraki aşamada bu kompozit kriyojellerin karakterizasyonu incelenmiştir. Tezin son bölümünde ise ilaç baskılanmış PHEMA/mPGMA-MMC kompozit taşıyıcıdan Mitomisin C salımı in-vitro sistemde incelenmiştir. Ayrıca Mitomisin C salım kinetiği ve davranışı da bu kısımda tartışılmıştır.

#### 3.1. Manyetik Poli(glisidil metakrilat) Mikropartiküllerin Hazırlanması

##### 3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Poli(vinil pirolidon) (PVP K-30) ve magnetit nanotoz ( $Fe_3O_4$  – nanopartikül çapı: 20-80 nm) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), glisidil metakrilat (GMA) ve azobisisobütironitril (AIBN) Fluka A.A. (Buchs, İsviçre) firmalarından temin edilmiştir. Bu bölümde kullanılan diğer bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Polimerizasyon deneylerinde kullanılan ultra saf su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz 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 ultra saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

##### 3.1.2. mPGMA Mikropartiküllerin Hazırlanması

mPGMA mikropartiküller dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır [72]. Polimerizasyon deneyleri 500 mL hacimli cam balonda sıcaklık kontrol sistemi entegre edilmiş su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon için uygulanan yöntem kısaca şu şekildedir: Monomer fazı 40 mL GMA, 250 mg AIBN ve 1.0 g magnetit ( $Fe_3O_4$ ) nanotoz içermektedir. Hazırlanan monomer karışımı AIBN'nin tamamen çözünmesi için ultrasonik banyoda (Bransonic 2200, İngiltere) 5 dakika sonike

edilmiştir (200 W). PVP (4.0 g) etil alkolde (% 50 (v/v)) çözülmüş ve daha sonra polimerizasyon reaktörüne ilave edilmiştir. Monomer fazı ilave edildikten sonra karıştırma hızı 500 rpm'e ayarlanmıştır. Polimerizasyon reaktöründe bulunan oksijen polimerizasyonu inhibe edebilir. Bu nedenle polimerizasyon reaktöründeki oksijeni uzaklaştırmak için ortamdan 5 dakika süre ile sürekli azot gazı geçirilmiştir. Daha sonra polimerizasyon reaktörü 65°C'daki çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. Polimerizasyon 65°C'da 4 saat devam ettirilmiştir (500 rpm). Polimerizasyonun tamamlanmasının ardından reaktör oda sıcaklığına soğutulmuş ve dağıtma ortamının uzaklaştırılması için polimerizasyon ortamı 5000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım atılmış ve polimerik mikropartiküller 10 mL etanol içerisinde tekrar dağıtılmış ve aynı koşullar altında yeniden santrifüjlenmiştir. Mikropartikülleri yıkama işlemi, reaksiyona girmemiş monomer ve diğer safsızlıklar yapıdan uzaklaştırılana kadar tekrarlanmıştır. Son basamakta mPGMA mikropartiküller 10 mL saf su içerisinde dağıtılmış (ağırlıkça % 0.10'luk) ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

mPGMA mikropartiküllerden sızabilecek magnetit ( $Fe_3O_4$ ) miktarını belirlemek üzere 250 mg mikropartikül tartılmış ve sızma ortamını içeren 10 mL'lik deney tüpüne konulmuştur. Bu deney tüpü döner çalkalayıcıda 24 saat karıştırılmıştır. Ortamdaki magnetit miktarı grafit fırınlı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS 5 EA, Carl Zeiss Technology, Zeiss Analytical System, Almanya) ile tayin edilmiştir. Bu amaçla üç farklı ortamda magnetit sızması incelenmiştir. Bu ortamlar % 50 asetik asit çözeltisi (pH 2.0), 50 mM fosfat tamponu çözeltisi (pH 7.0) ve 50 mM sodyum sitrat/NaOH tamponu çözeltisidir (pH 12.0).

### **3.1.3. mPGMA Mikropartiküllerin Karakterizasyonu**

#### **3.1.3.1. Yüzey Morfolojisi**

mPGMA mikropartiküllerin boyutu ve yüzey yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM), (JEOL JSM 5600, Tokyo, Japonya) ile incelenmiştir. Bu amaçla ilk basamakta polimerik mikropartiküller -50°C'da (0.050 mbar) liyofilize edilmiştir (Christ Alpha 1-2 LD Plus, Almanya). Daha sonra mPGMA mikropartiküller vakum altında altın-paladyum (40:60) ile kaplanmış ve yüzeyler iletken hale getirilmiştir ve SEM görüntüleri alınmıştır. Hazırlanan numune SEM yuvasına yerleştirilerek farklı büyütme oranlarında yapıları incelenmiştir.

### 3.1.3.2. Manyetik Özellikleri

mPGMA mikropartiküllerin manyetik özelliklerini belirlemek için titreşimli örnek magnetometresi (VSM, Princeton Applied Research, Model 150A, ABD) kullanılmıştır. Polimerik yapıda magnetit varlığı elektron spin rezonans (ESR) spektrofotometresi (EL 9, Varian) ile belirlenmiştir.

### 3.1.3.3. Yüzey Alanı Ölçümleri

mPGMA mikropartiküllerin yüzey alanı çok noktalı analiz ile Brunauer-Emmett-Teller (BET) yöntemine göre ölçülmüştür (Flowsorb II 2300, Micromeritics Instrument Corp., Norcross, ABD).

### 3.1.3.4. Şişme Deneyleri

mPGMA mikropartiküllerin şişme oranı şu şekilde belirlenmiştir: kuru mikropartiküller tartılarak 5 mL deiyonize su içeren şişme ortamına alınmıştır. Mikropartiküller oda sıcaklığında 2 saat süre ile şişmeye bırakılmış ve sonrasında şişmiş partiküller yeniden tartılmıştır. Şişme oranı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Oranı \%} = [(m_s - m_i) / m_i] \times 100 \quad (3.1)$$

Eşitlikte  $m_i$  ve  $m_s$  mikropartiküllerin ilk ve son ağırlıklarını ifade etmektedir.

## 3.2. mPGMA Mikropartiküllere Mitomisin C Baskılanması

### 3.2.1. Kimyasal Maddeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), amonyum persülfat (APS), metilen bisakrilamid (MBAAm) ve N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Mitomisin C (MMC) Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. (Tokyo, Japonya) firmasından satın alınmıştır. Bu tez kapsamında kullanılan diğer bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır ve Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Tez kapsamındaki deneylerde kullanılan ultra saf su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz 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 ultra saf suyun (deiyonize su) direnci 18 MΩ/cm'dir.

### 3.2.2. Moleküler Baskılama için Kullanılan Fonksiyonel Monomerin Hazırlanması

Moleküler baskılama yönteminin ilk basamağı ön-kompleksin hazırlanmasıdır. Kalıp molekül olan MMC ile ön-kompleks oluşturmak için metakroilamidohistidin (MAH) monomeri seçilmiştir. Baskılama performansını arttırmak için metal iyon koordinasyonu yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla önce MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksi hazırlanmıştır. MAH monomerinin sentezi histidin metil ester ve metakroil klorürün tepkimesi ile gerçekleştirilmiştir [73]. Hazırlanan fonksiyonel monomer NMR ve FTIR ölçümleri ile karakterize edilmiştir. MAH-Cu<sup>2+</sup> kompleksinin hazırlanması için 1:1 mol oranında MAH ve Cu<sup>2+</sup> çözeltisi (kaynak: Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O) 25°C'da 1 saat süre ile etkileştirilmiştir.

### 3.2.3. Mitomisin C-Fonksiyonel Monomer Ön-Kompleksinin Hazırlanması

MAH-Cu<sup>2+</sup>-MMC kompleksinin hazırlanması için histidin gruplarının büyük oranda protonlanmamış ve metal iyonu ile iyonik koordinasyona uygun olduğu pH 7.4 fosfat tamponu seçilmiştir. Belirli oranlarda MMC içeren çözelti MAH-Cu<sup>2+</sup> ile 25°C'da 1 saat süre ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

### 3.2.4. Yüzey Baskılanmış mPGMA Mikropartiküllerin Hazırlanması

Bölüm 3.1'de belirtilen şekilde hazırlanan mPGMA mikropartiküllerin yüzeyine Mitomisin C baskılanması için şu yöntem takip edilmiştir; HEMA (25 µL) ve MBAAm (115,0 mg) 25.0 mL deiyonize suda çözülmüştür. Belirli miktarda Mitomisin C içeren ön-kompleks fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisinde yukarıdaki karışıma ilave edilmiş ve 5 mL su içerisinde dağıtılmıştır. 30 dakika karıştırıldıktan sonra çözeltilen 10 dakika süre ile azot gazı geçirilmiştir. Karışım daha sonra polimerizasyon reaktörüne alınarak ortama başlatıcı olarak NaHSO<sub>3</sub> (57.0 mg) ve (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (63.0 mg) ilave edilmiştir. Polimerizasyon 40°C'da 500 rpm karıştırma hızında 24 saat süre ile devam ettirilmiştir. Farklı miktarlarda Mitomisin C içeren karışımlar (Çizelge 3.1) çözeltiliye ilave edilerek beş farklı baskılama oranına (50-250 µg MMC/g mPGMA) sahip moleküler baskılanmış mikropartiküller (Polimer I-V) elde edilmiştir. Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartiküllerden muhtemel Cu<sup>2+</sup> iyonları sızması da tez kapsamında incelenmiştir. Bu amaçla üç farklı tampon çözeltiye (pH: 4.5, 7.4, 8.5) 1.0 g Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartikül konulmuş ve oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda ortamdan alınan numunelerde Cu<sup>2+</sup> iyonları derişimi atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülmüştür.

**Çizelge 3.1.** Mitomisin C salımı için farklı baskılama oranına sahip mPGMA mikropartiküllerin hazırlanması.

<b>Polimer</b>	<b>Baskılanan Mitomisin C Miktarı</b>
Polimer I	50 µg MMC/g mPGMA
Polimer II	100 µg MMC/g mPGMA
Polimer III	150 µg MMC/g mPGMA
Polimer IV	200 µg MMC/g mPGMA
Polimer V	250 µg MMC/g mPGMA

### **3.3. Mitomisin C Baskılanmış mPGMA Mikropartikül Gömülü PHEMA Kriyojellerin Hazırlanması**

Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojellerin hazırlanması için izlenen yöntem aşağıda verilmiştir: PHEMA kriyojel diskler 4:1 HEMA:MBAAm mol oranında hazırlanmıştır. İlk etapta 0.384 g MBAAm, 12.0 mL saf su içerisinde çözülmüştür. 100.0 mg MMC yüzey baskılanmış mPGMA mikropartikül ve HEMA 1.8 mL saf su içerisine konulmuştur. Bu ortam azot gazı geçirildikten sonra 10 dakika süre ile buz banyosunda bekletilmiştir. Karışıma APS (16.0 mg) ve TEMED (20.0 µL) ilave edilerek buz banyosunda 1 dakika süre ile karıştırılmıştır. Aynı miktarlarda hazırlanan üç karışım -14°C, -18°C ve -24°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta 24 saat süre ile gerçekleştirilmiş ve üç farklı kriyojel elde edilmiştir. Polimerizasyon işleminin ardından kriyojeller oda sıcaklığına getirilerek yapıdaki donmuş suyun erimesi sağlanmıştır. Son etapta kriyojeller dairesel diskler şeklinde (0.7 cm çapında) kesilmiş ve saf su ile yıkanmıştır.

#### **3.3.1. Kriyojellerin Karakterizasyonu**

##### **3.3.1.1. Yüzey Morfolojisi**

Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM), (JEOL JSM 5600, Tokyo, Japonya) ile incelenmiştir. Kriyojeller önce -50°C'da (0.050 mbar) liyofilize edilmiştir

(Christ Alpha 1-2 LD Plus, Almanya). Kriyojel diskler vakum altında altın-paladyum (40:60) ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

### **3.3.1.2. Yüzey Alanı Ölçümleri**

mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojelin yüzey alanı çok noktalı analiz ile Brunauer-Emmett-Teller (BET) yöntemine göre ölçülmüştür (Flowsorb II 2300, Micromeritics Instrument Corp., Norcross, ABD).

### **3.3.1.3. Şişme Deneyleri**

mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojellerin şişme oranı şu şekilde belirlenmiştir: kuru kriyojel diskler tartılarak 5 mL deiyonize su içeren şişme ortamına alınmıştır. Diskler oda sıcaklığında 2 saat süre ile şişmeye bırakılmış ve sonrasında yüzeydeki su filtre kağıdı ile uzaklaştırılarak diskler yeniden tartılmıştır. Şişme oranı Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

## **3.4. Kriyojellerden Mitomisin C Salımının İncelenmesi**

İlaç salım miktarlarının belirlenmesi için farklı oranlarda MMC yüklü kompozit kriyojel diskler 10 mL hacimde fosfat tamponu (pH: 7.4) içerisine konularak MMC salımı 120 dakika süre ile izlenmiştir. Salınan ilaç miktarı çift ışık yollu UV/GB spektrofotometre (Shimadzu, Model 1601, Tokyo, Japonya) ile 360 nm dalgaboyunda ölçülmüştür. Salınan MMC miktarı yüzde değer olarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. MMC salımına ilaç yükleme oranının (50-250 µg MMC/g mPGMA), kriyojelleşme sıcaklığının (-14°C, -18°C ve -24°C), ortam pH'ı (4.5, 7.4, 8.5) ve ortam sıcaklığının (15°C, 25°C ve -37°C) etkileri incelenmiştir.

## **3.5. Sitotoksosite Çalışmaları**

Hazırlanan kompozit kriyojellerin sitotoksik etkileri ISO-10993-5 “Medikal Araçların Biyolojik Değerlendirilmesi” standardına göre 3-(4,5-dimetil/thiazol-2,il)-2,5-difenil-tetrazolyum bromür tiyazoil mavisi (MTT) testi ile yapılmıştır. Sitotoksosite deneylerinde fibroblast hücre hattı (L929) kullanılmıştır. Hücreler Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hücre kültür ortamı içeren % 10 fetal sığır serum albümini ve % 10 L-glutaminle desteklenmiş % 95 hava ve % 5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş atmosferde 37°C'da 3 gün kültür edilmiştir. Kriyojeller ultraviyole ışık altında 1 saat süre ile

sterilize edilmiş ve 72 saat süresince hücre kültür ortamında 37°C'da inkübe edilmiştir. Her kuyucukta  $1 \times 10^3$  yoğunlukta L929 hücreleri 200 µL hücre kültür ortamı ile 96 kuyucuklu tabakada bir gün süre ile % 5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre kültür ortamı ekstraksiyon ortamı ile değiştirilmiş ve 100 µL/kuyucuk MTT çözeltisi ile 4 saat süre ile etkileştirilmiştir. Daha sonra tabakalar oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak 540 nm'de ELISA okuyucu ile ölçüm yapılmıştır.

## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması kapsamında elde edilen deneysel sonuçlar üç ana başlık altında toplanabilir.

- (i) Eşboyutlu mPGMA mikropartiküllerin (1.6  $\mu\text{m}$  çapında) hazırlanması, karakterizasyonu ve mikropartikül yüzeyine MMC baskılanması;
- (ii) Yüzeyine MMC baskılanmış mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA kompozit kriyojel disklerin hazırlanması ve karakterizasyonu;
- (iii) Hazırlanan kompozit kriyojellerden MMC salım miktarlarının farklı koşullar altında incelenmesi ve kinetik analizleri.

### 4.1. mPGMA Mikropartiküllerin Karakterizasyonu

Eşboyutlu mPGMA mikropartiküller (RSD < % 1, mikropartikül çapı: 1.62  $\mu\text{m}$ ) dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmişlerdir. Elde edilen mPGMA mikropartiküllerin fizikokimyasal ve manyetik özellikleri Çizelge 4.1'de topluca verilmiştir. Elde edilen mikropartiküllerin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri ise Şekil 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi mPGMA mikropartiküllerin boyutları oldukça dar bir dağılıma sahiptir. mPGMA mikropartiküllerin polidispersite indeksi (PDI) yaklaşık 1.008 olarak hesaplanmıştır. mPGMA mikropartiküllerin hidrofilik karakteri üç boyutlu yapılarında bol miktarda su tutabilme özelliğine sahiptir. Çapraz bağlı polimerik yapı su difüzyonu sonucu önemli oranda şişer (şişme oranı: % 52) fakat suda çözünmeden üç boyutlu yapısını korur. Polimerlerin manyetik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  içeriği, manyetik alan rezonansı ve g değerleri de Çizelge 4.1'de verilmiştir. mPGMA mikropartiküllerin spesifik yüzey alanı 3.2  $\text{m}^2/\text{g}$  olarak ölçülmüştür. Yoğunluğu ise 1.09  $\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Eşboyutlu mPGMA mikropartiküllerin  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  içeriği, manyetik alan rezonansı ve g değerleri sırasıyla % 4.5, 2055 Gauss ve 2.28 olarak bulunmuştur. mPGMA mikropartiküllerin sahip oldukları manyetik özellikler kullanım amacı için istenilen sınırlar arasındadır.

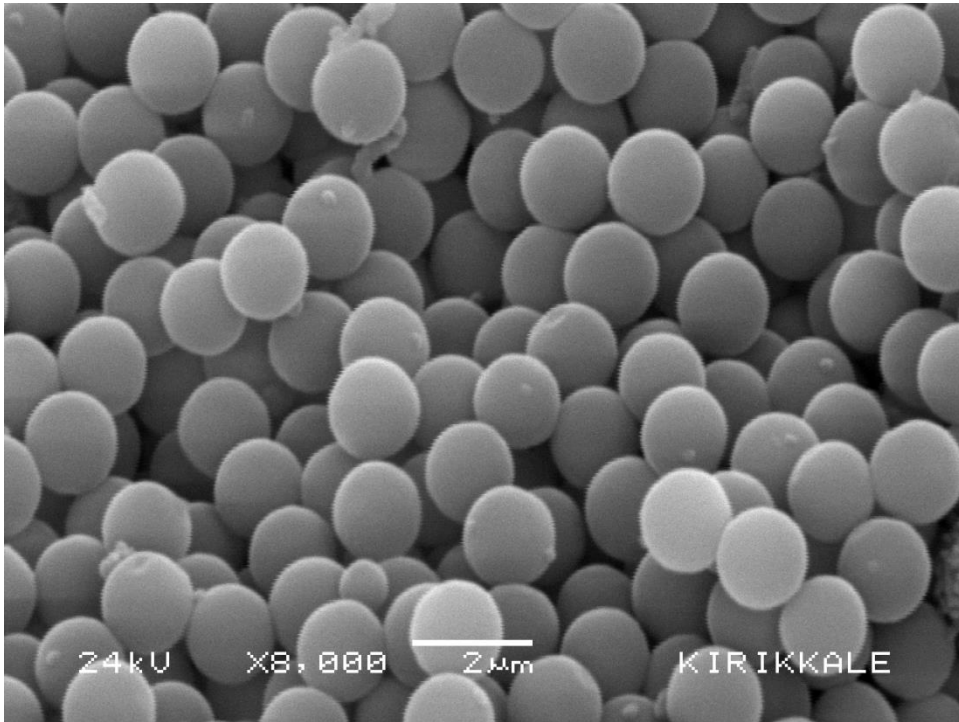
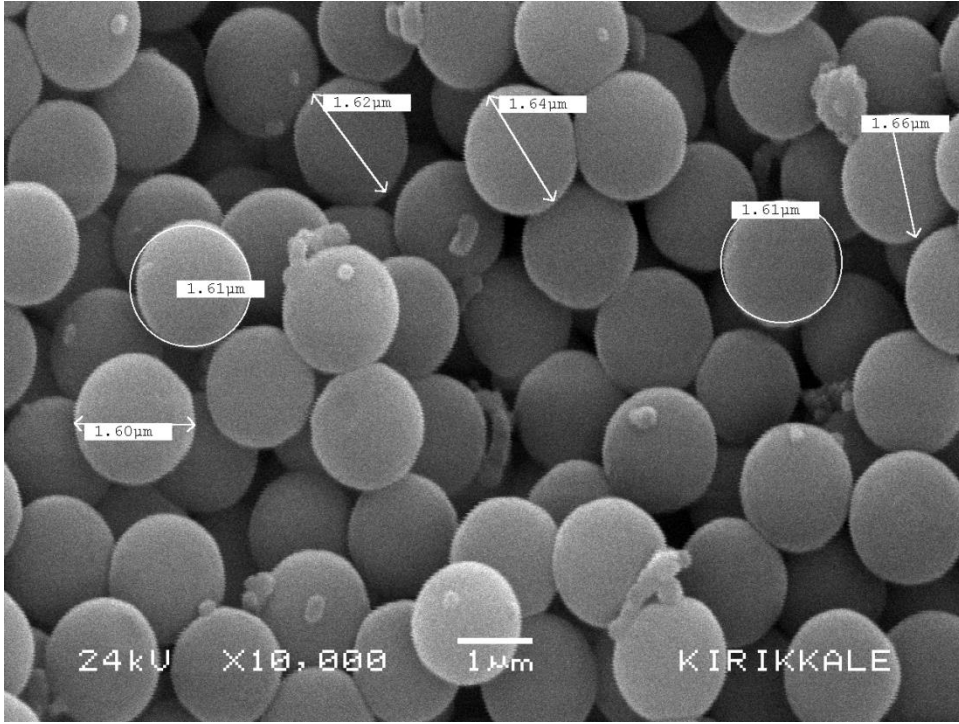


**Çizelge 4.1.** mPGMA mikropartiküllerin bazı özellikleri.

---

Parçacık çapı	1.62 $\mu\text{m} \pm 0.01 \mu\text{m}$
Polidispersite indeksi	1.008
Spesifik yüzey alanı	3.2 $\text{m}^2/\text{g}$
Şişme oranı	% 52
Islak yoğunluk	1.09 $\text{g}/\text{mL}$
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> içeriği	% 4.5
Manyetik alan rezonansı	2055 Gauss
g değeri	2.28

---



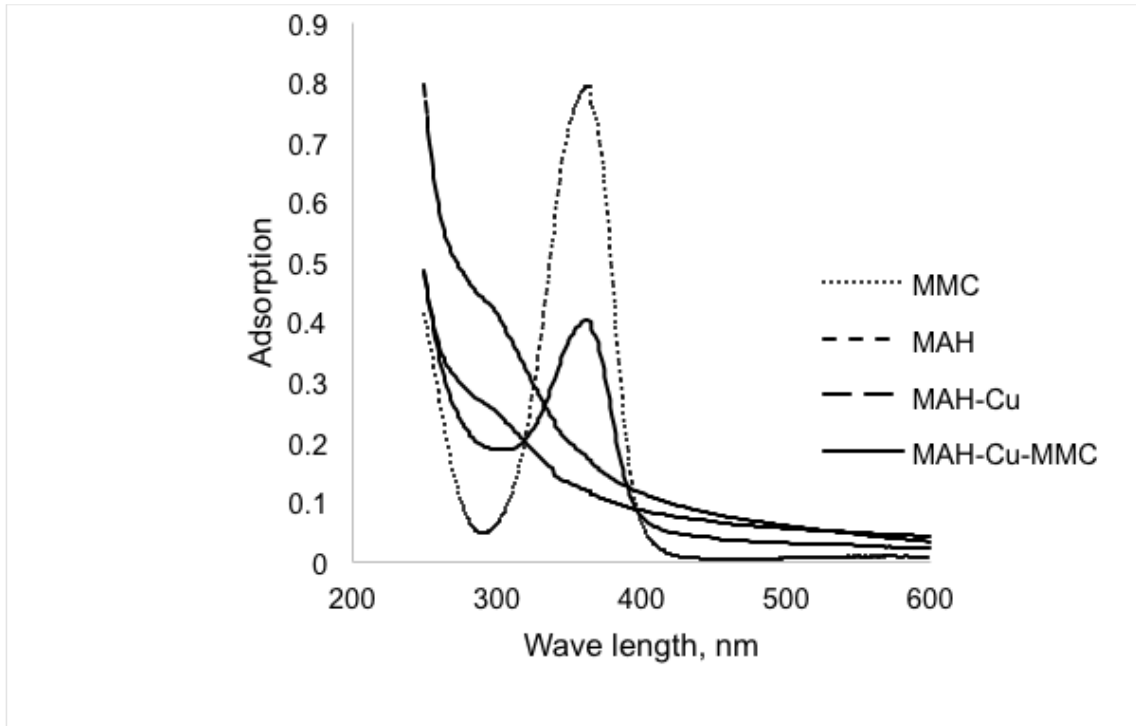
**Şekil 4.1.** mPGMA mikropartiküllerin SEM görüntüleri.

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

MAH, Cu<sup>2+</sup> iyonları üzerinden iyonik koordinasyonla MMC ile etkileşmek üzere metal şelatlayıcı ligand ve/veya komonomer olarak seçilmiştir. MAH'ın imidazol grubu geçiş metal iyonları ile şelat yapma özelliğine sahiptir. Ön-kompleks molekülünü hazırlamak için MAH ve Cu<sup>2+</sup> iyonları oranı literatür verilerine dayanarak 1:1 (mol/mol) olarak belirlenmiştir. Ön-kompleks oluşumu UV-spektrofotometre ile karakterize edilmiştir. MAH molekülündeki histidin Cu<sup>2+</sup> iyonlarını imidazol azotu, amino azotu ve karboksil oksijen atomu üzerinden üç dişli olarak bağlar. Bakırın koordinasyon bağ sayısı dördür. Dördüncü bağ ise ortamdaki su moleküllerinde bulunan oksijen atomları ile tamamlanır. Bu aşamada toplam 0.2 g bakır tuzu kullanılmıştır [Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.5H<sub>2</sub>O].

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

MAH-Cu<sup>2+</sup> ön-kompleksi, farklı ilaç yükleme oranlarına sahip ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için farklı miktarlarda MMC ile etkileştirilmiştir. Kompleks oluşumu UV-spektrofotometre ile absorpsiyon bantlarındaki kayma/azalma gözönüne alınarak gösterilmiştir (Şekil 4.2). MMC ve ön-kompleks spektrumları arasındaki fark MMC, ve MAH-Cu<sup>2+</sup> arasındaki etkileşimleri göstermektedir.



Şekil 4.2. MMC, MAH, MAH-Cu<sup>2+</sup> ve MAH-Cu<sup>2+</sup>-MMC'nin UV spektrumları.

#### 4.4. Mitomisin C Baskılanmış PHEMA Temelli mPGMA Mikropartikül Gömülü Kriyojeller

Mitomisin C baskılanmış PHEMA temelli mPGMA mikropartikül gömülü kriyojeller gözenek yapısının ve yüzey alanının ilaç salım davranışına etkilerini incelemek üzere üç farklı sıcaklıkta (-14°C, -18°C ve -24°C) ve beş farklı ilaç yükleme oranında (50-250 µg MMC/g mPGMA) sentezlenmiştir. Kriyojellerin oluşumu esnasında jelleşme hızı ve donma davranışlarının soğutma sıcaklığı ile değiştiği bilinmektedir.

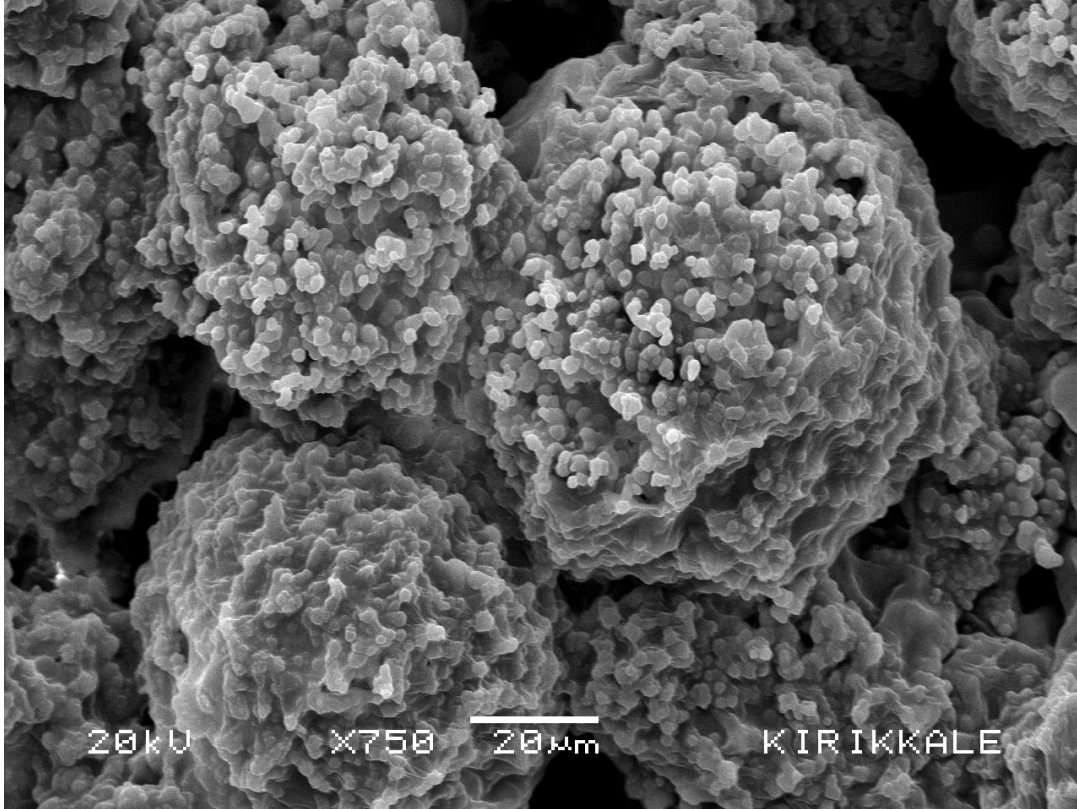
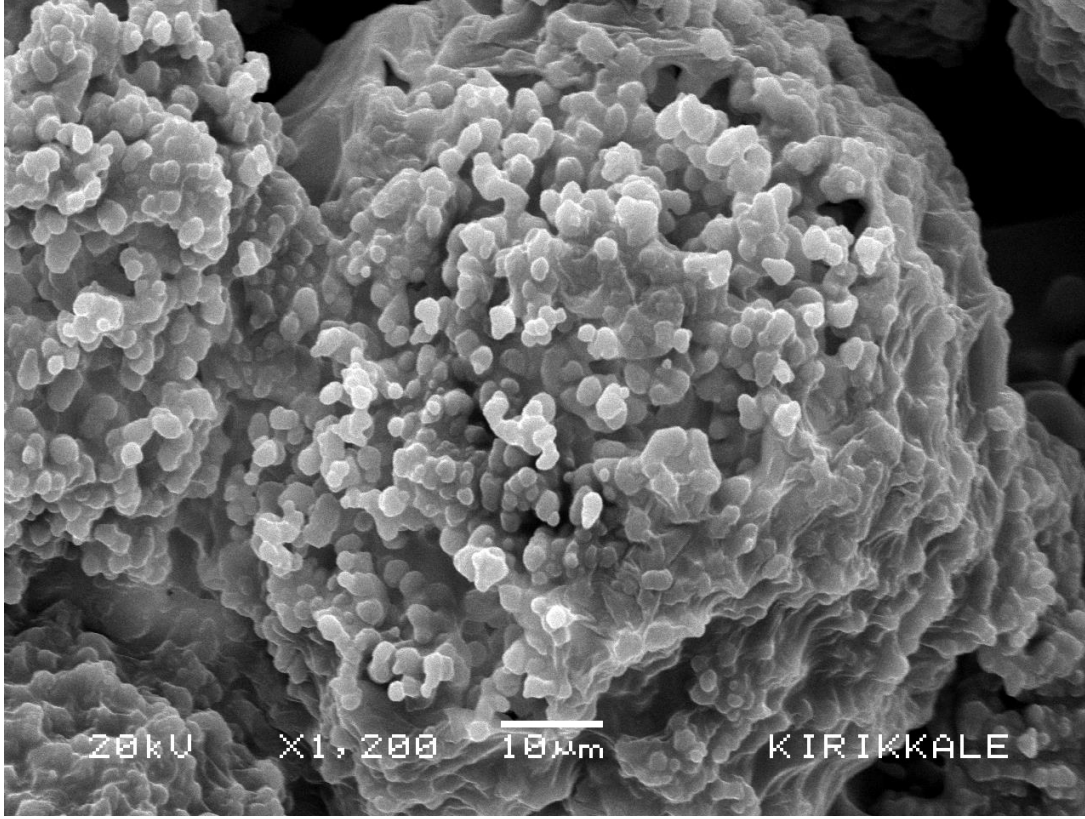
Bu tez kapsamında hazırlanan mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Şekil 4.3'te mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojellerin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri verilmiştir. SEM fotoğraflarından da görüldüğü gibi mikropartiküller kriyojel polimer yapı içerisinde düzgün ve homojen bir dağılıma sahiptir. Polimerik yapıdaki makrogözenek boyutlarının 20 µm'den büyük olduğu görülmektedir. Bu makrogözeneklerin dolayısı ile kanalların kriyojel yapıda birbirleriyle bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Makrogözenekler şişme ve büzülme süreçleri sırasında kriyojel yapıdan polimerik malzeme içerisine ve dış ortama su difüzyonunu kolaylaştırmaktadır. Makrogözenekli kriyojellerin bu tersinir özellikteki şişme-büzülme davranışı biyomalzeme ve biyoteknoloji uygulamalarında oldukça önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir [74]. İlaç yükleme oranının şişme davranışı ve yüzey alanına olan etkisi -18°C sıcaklıkta sentezlenen PHEMA temelli kriyojeller için incelenmiştir. Çizelge 4.2, farklı ilaç yükleme oranlarına sahip mPGMA mikropartikül içeren PHEMA temelli kriyojellerin yüzey alanı ve şişme davranışlarını göstermektedir. Mitomisin C yükleme miktarının artması ile hem şişme oranının hem de yüzey alanının önemli miktarlarda arttığı görülmektedir. Mitomisin C yükleme miktarının 50 µg'dan 250 µg'a arttırılması ile şişme oranı % 475'ten % 690 değerine yükselmiştir. Şişme oranı neredeyse 1.5 katlık bir artış göstermiştir. Yüzey alanı değerleri incelendiğinde de benzer bir davranış gözlenmiştir. 50 µg Mitomisin C yükleme oranında kriyojelin yüzey alanı 22.3 m<sup>2</sup>/g iken 250 µg Mitomisin C yükleme oranında bu değer 29.8 m<sup>2</sup>/g değerine yükselmiştir. Yüzey alanında % 30 civarında bir artış gözlenmiştir. Yüzey alanındaki bu artış ilaç salım miktarının ve hızının kontrol edilmesinde önemli bir unsurdur [75]. Bu durumda kompozit yapıdaki mikropartiküllerin gözenekliliğin artmasına neden olduğu söylenebilir. Gözeneklilik arttıkça da kompozit kriyojel yapı içerisine alınan su miktarı ve yüzey alanı artmaktadır.

**Çizelge 4.2.** İlaç yükleme oranının şişme davranışı ve yüzey alanına etkisi\*.

	İlaç Yükleme Miktarı (µg MMC/g mPGMA)	Şişme Oranı (%)	Yüzey Alanı (m <sup>2</sup> /g)
Polimer I	50	475	22.3
Polimer II	100	526	24.9
Polimer III	150	582	26.1
Polimer IV	200	644	27.5
Polimer V	250	690	29.8

\* Kriyojelleşme Sıcaklığı: -18°C.

Kriyojelleşme sıcaklığının şişme davranışı ve yüzey alanına olan etkileri 100 µg MMC/mPGMA ilaç yükleme oranında sentezlenen Mitomisin C baskılanmış PHEMA temelli mPGMA gömülü kompozit kriyojeller için incelenmiştir. Çizelge 4.3, farklı kriyojelleşme sıcaklıklarında hazırlanan mPGMA mikropartikül içeren PHEMA temelli kompozit kriyojellerin yüzey alanı ve şişme davranışlarındaki değişimleri içermektedir. Kriyojelleşme sıcaklığının -14°C'dan -18°C'a azalması ile hem şişme oranında hem de yüzey alanında ilk etapta önemli sayılabilecek bir artış görülmüştür. Kriyojelleşme sıcaklığının -18°C'dan -24°C'a düşürülmesi ile hem şişme oranında hem de yüzey alanında çok önemli bir artış gözlenmemiştir. -18°C'da hazırlanan kompozit kriyojel için şişme oranı % 526 iken -24°C'da hazırlanan kompozit kriyojel için bu değer % 538'e ulaşmıştır. Benzer eğilim yüzey alanı değerleri için de gözlenmiştir. Yüzey alanı değerleri -18°C'da hazırlanan kompozit kriyojel için 24.9 m<sup>2</sup>/g, -24°C'da hazırlanan kompozit kriyojel için 25.1 m<sup>2</sup>/g'dır. Görüldüğü gibi her iki özelliğe de en düşük sıcaklıkta (-24°C) hazırlanan kompozit kriyojel için -18°C'a göre önemli bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.3. mPGMA mikropartikül gömülü kriyojellerin taramalı elektron mikroskop görüntüleri.

**Çizelge 4.3.** Kriyojelleşme sıcaklığının şişme davranışı ve yüzey alanına etkisi\*.

	Kriyojelleşme Sıcaklığı (°C)	Şişme Oranı (%)	Yüzey Alanı (m <sup>2</sup> /g)
Polimer IIA	- 14	482	21.5
Polimer IIB	- 18	526	24.9
Polimer IIC	- 24	538	25.1

\* İlaç Yükleme Oranı: 100 µg MMC/g mPGMA.

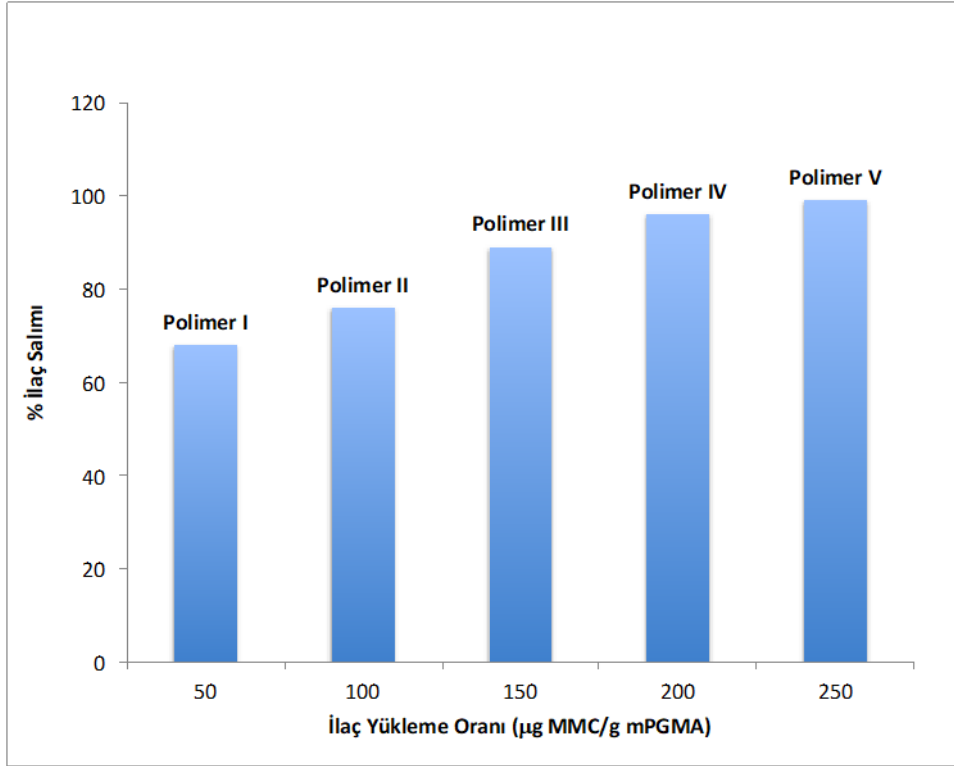
Bu bölümde Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartiküllerden muhtemel Cu<sup>2+</sup> iyonları sızması da incelenmiştir. Bu amaçla üç farklı tampon çözeltiye (pH: 4.5, 7.4, 8.5) 1.0 g Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartikül konulmuş ve oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda ortamdan alınan numunelerde Cu<sup>2+</sup> iyonları derişimi atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Yapılan analizler sonucunda her üç salım ortamında da herhangi bir Cu<sup>2+</sup> iyonu sızması gözlenmemiştir. Bu sonuç hazırlanan ön-kompleksin etkin ve kararlı bir şekilde polimerik yapıda kaldığını göstermektedir. Bu davranış ilaç salım uygulamalarında Cu<sup>2+</sup> iyonlarının polimerik yapıdan salınarak bir potansiyel toksik etkiye neden olmayacağı sonucunu göstermektedir.

#### **4.5. Mitomisin C Baskılanmış mPGMA Mikropartikül Gömülü Kriyojellerden MMC Salım Davranışının İncelenmesi**

##### **4.5.1. İlaç Yükleme Miktarının İlaç Salım Oranı ve İlaç Salım Hızına Etkisi**

PHEMA temelli kriyojellere 5 farklı ilaç yükleme miktarında (50, 100, 150, 200, 250 µg MMC/g mPGMA) ilaç baskılanmış mPGMA mikropartiküller gömülerek kompozit ilaç taşıyıcı sistem hazırlanmıştır. İlaç yükleme miktarının ilaç salımına etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi Mitomisin C baskılanmış kompozit polimer matriksteki ilaç miktarı arttıkça toplam ilaç salım oranı artmıştır. İlaç yükleme miktarı 50 µg MMC/g mPGMA iken % 70 olan ilaç salım oranı 250 µg MMC/g mPGMA

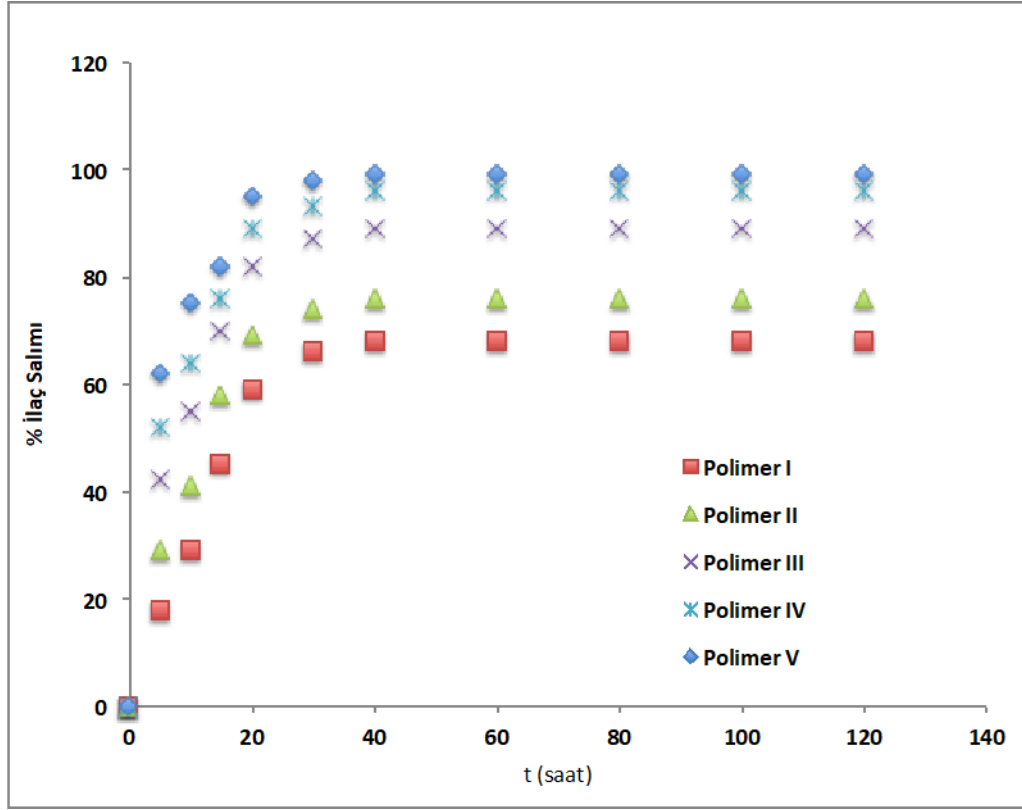
değerinde neredeyse % 99 değerine yaklaşmıştır. Bir başka ifadeyle kompozit kriyojel yapısındaki Mitomisin C moleküllerinin tamamına yakını yapıdan salınmıştır. İlacın polimerik yapıdan dışarıya salımında kütle aktarımını sağlayan sürücü kuvvet ilacın derişim farkıdır ( $\Delta C$ ). Derişim farkının artması ile sürücü kuvvet artmakta ve buna paralel olarak da salınan ilaç miktarı önemli ölçüde artmaktadır [76]. Polimerik yapıdaki ilaç yükleme miktarının artması sonucunda salım hızının da doğrusal olarak artacağı not edilmelidir [77].



**Şekil 4.4.** İlaç yükleme oranının ilaç salımına etkisi: Kriyojelleşme sıcaklığı,  $T_c$ :  $-18^\circ\text{C}$ ; Salım ortamı pH'ı: 7.4;  $T$ :  $25^\circ\text{C}$ .

5 Farklı ilaç yükleme miktarında (50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{g}$  MMC/g mPGMA) ilaç baskılanmış mPGMA mikropartiküller gömülü PHEMA temelli kompozit kriyojellerden ilaç salım oranları zamanın fonksiyonu olarak Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Şekil 4.5'ten de görüldüğü gibi ilaç salım hızı ve miktarı ilaç yükleme oranı ile artmıştır. Başlangıçta hızlı olan ilaç salımı hemen hemen 60 saattten sonra çalışılan bütün ilaç salım yükleme miktarları için plato değerine ulaşmış ve sabit kalmıştır. PHEMA temelli kompozit kriyojellerden ilaç salım süresinin 120 saate kadar uzatılabildiği söylenebilir.



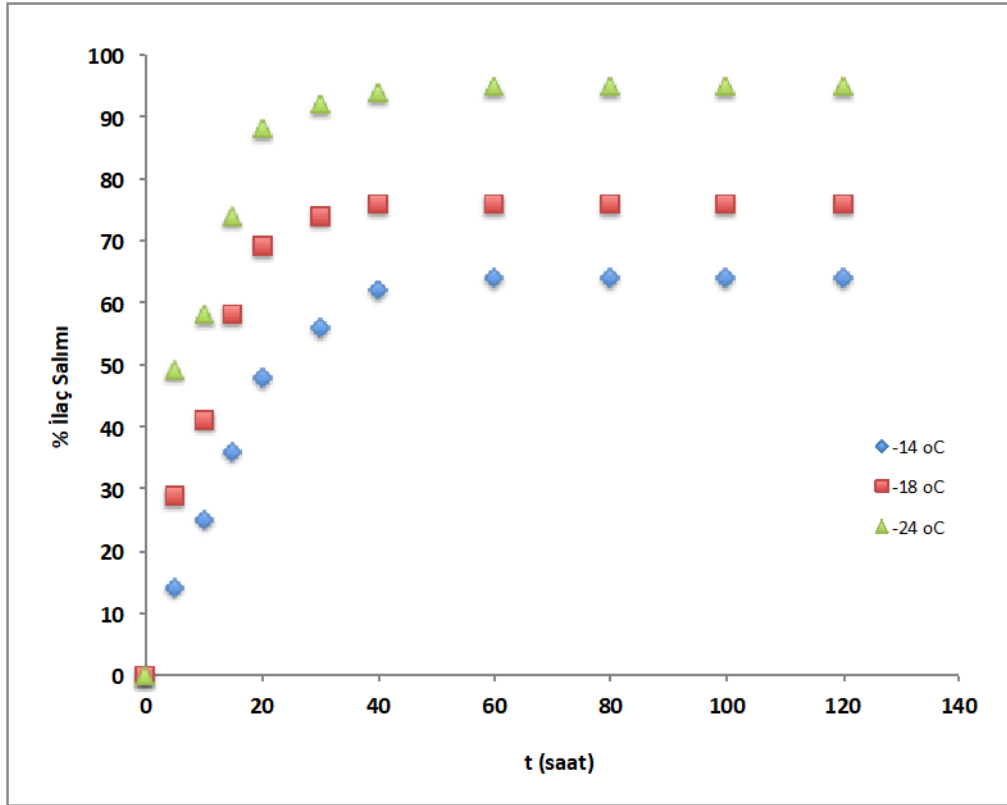


**Şekil 4.5.** İlaç yükleme oranının ilaç salım hızına etkisi: Kriyojelleşme sıcaklığı,  $T_c$ :  $-18^\circ\text{C}$ ; Salım ortamı pH'ı: 7.4;  $T$ :  $25^\circ\text{C}$ .

#### 4.5.2. Kriyojelleşme Sıcaklığının İlaç Salım Hızına Etkisi

Kriyojeller, jelleşme sıcaklığının gözenek boyutuna ve dolayısı ile ilaç salımına etkilerini incelemek üzere farklı polimerizasyon sıcaklıklarında hazırlanmıştır. İlaç yükleme oranı aynı olan mPGMA mikropartiküller kullanılarak ve diğer tüm parametreler aynı tutularak kriyojel polimerizasyonu  $-14^\circ\text{C}$ ,  $-18^\circ\text{C}$  ve  $-24^\circ\text{C}$  sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Makrogözenekli polimerlerin hazırlanmasında polimerizasyon sıcaklığı önemli bir parametredir. Büyük buz kristalleri elde etmek için donma sıcaklığı mümkün olan en düşük sıcaklıkta tutulmalı ve kristalleşme süresi uzatılmalıdır. Küçük kristaller elde etmek için ise donma çok daha yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmeli ve buz kristallerinin büyümesinin önüne geçebilmek için donma hızı düşük olmalıdır. Kriyojelleşme sistemlerinde gözeneklerin oluşumundan buz kristalleri sorumlu olduğu için jelleşme sıcaklığı ve kriyojelin gözenek boyutu arasında doğrudan bir ilişki vardır [78].

Şekil 4.6 farklı sıcaklıklarda hazırlanan kriyojellerden MMC salımını göstermektedir. Buna göre -14°C’da hazırlanan kriyojeller ilk 30 dakikada MMC’nin % 56’lık bir kısmını salmışken -24°C’da hazırlanan kriyojeller % 92’lik bir kısmını salmıştır. Bu durum -24°C’da hazırlanan kriyojellerin gözenekliliğinin daha fazla olması ile açıklanabilir. Diğer taraftan ilacın salım süresinin uzun olmasının yanı sıra birim zamanda etkin miktarda salım tercih edilir bir durum olduğundan çalışmanın diğer aşamalarında -18°C’da hazırlanan kriyojeller tercih edilmiştir.

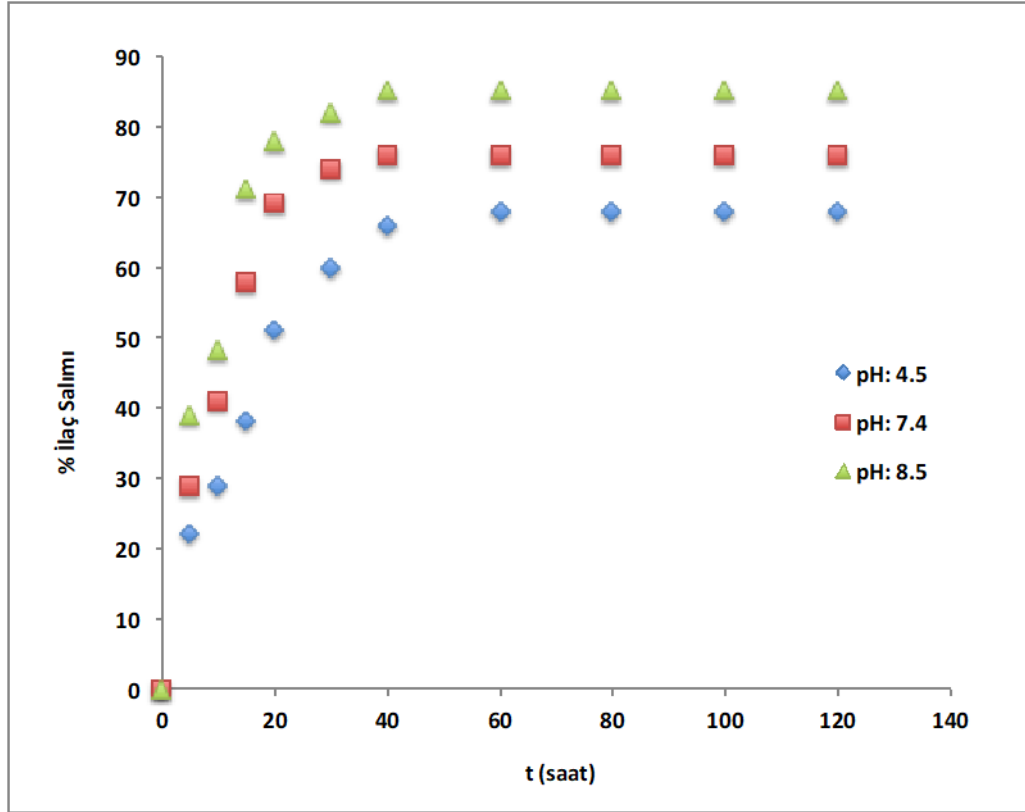


**Şekil 4.6.** Kriyojelleştirme sıcaklığının ilaç salım hızına etkisi: İlaç yükleme miktarı: 100 µg MMC/g mPGMA; pH: 7.4; T: 25°C.

#### 4.5.3. Ortam pH’ının İlaç Salım Hızına Etkisi

Ortam pH’ının ilaç salım hızına etkisini belirlemek üzere 4.5, 7.4 ve 8.5 olmak üzere üç farklı pH değerinde, kompozit kriyojellerden MMC salımı zamanın fonksiyonu olarak incelenmiştir. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi en hızlı ve en fazla miktarda MMC salımı pH 8.5’te gerçekleşmektedir. Metal şelat sistemlerinde  $Cu^{2+}$  kullanıldığı durumlarda ortam pH’ının asidik olması metal şelatın kararlılığını arttırdığından asidik pH’da MMC

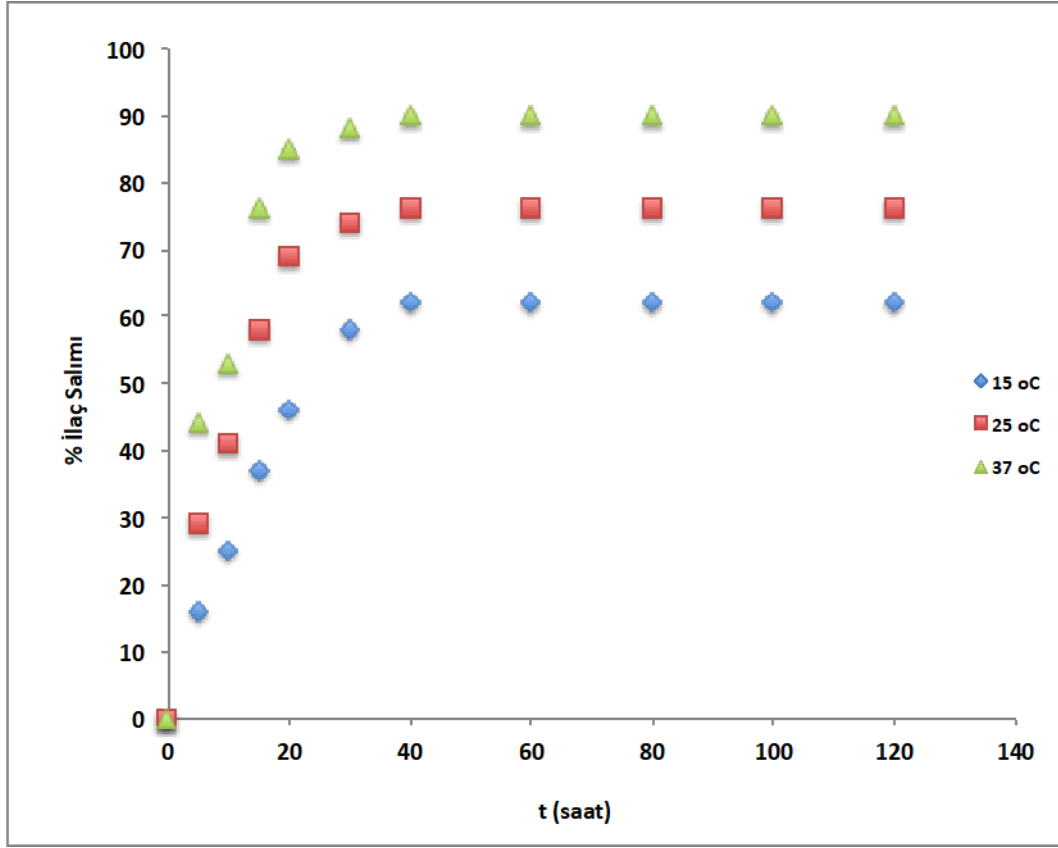
salımının daha düşük olması beklenen bir durumdur [79]. Bazik ortam pH'ında  $Cu^{2+}$  ve MMC arasındaki etkileşimler daha zayıf olacağından salım daha hızlı gerçekleşmiş ve 120 saatin sonunda başlangıçtaki MMC'nin % 85'i salınmıştır. pH 4.5 ve 7.4 için bu değer sırasıyla % 68 ve % 76 olarak gözlenmiştir. Ayrıca MMC'nin asidik ortamda bozunma olasılığı nedeniyle genellikle asidik pH değerleri tercih edilmemektedir. Bu nedenle çalışma için aynı zamanda fizyolojik pH olan 7.4 salım çalışmaları için en uygun pH olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Ortam pH'nın ilaç salım hızına etkisi: İlaç yükleme miktarı: 100  $\mu$ g MMC/g mPGMA; Kriyojelleşme sıcaklığı,  $T_c$ :  $-18^\circ C$ ;  $T$ :  $25^\circ C$ .

#### 4.5.4. Sıcaklığın İlaç Salım Hızına Etkisi

Ortam sıcaklığının MMC salımına etkisi  $15^\circ C$ ,  $25^\circ C$  ve  $37^\circ C$ 'da incelenmiştir. MMC salım oranı ve hızının sıcaklık arttıkça arttığı görülmektedir. Bu durum öncelikle sıcaklığın metal koordinasyon etkileşimlerini azaltması ile açıklanabilir [80-82]. Vurgulanması gereken bir başka nokta sıcaklık arttıkça polimerik zincirlerin hareketliliğinin artması ve nanooyukların genişleyerek ilacın salımına imkân vermesidir. Salım çalışmaları için  $25^\circ C$  en uygun sıcaklık olarak tercih edilmiştir.



Şekil 4.8. Sıcaklığın ilaç salım hızına etkisi: İlaç yükleme miktarı: 100 µg MMC/g mPGMA; Kriyojelleşme sıcaklığı, T<sub>c</sub>: -18°C; pH: 7.4.

#### 4.6. Kinetik Çalışmalar

In-vitro ilaç salım kinetiği ve salım parametreleri Korsmeyer-Peppas modeline göre analiz edilmiştir. Bu eşitlikte  $M_t/M_\infty$ , t anındaki ve dengedeki ilaç salım kesrini, k Korsmeyer-Peppas sabitini ve n difüzyon türünü gösteren bir sabiti ifade etmektedir.

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (4.1)$$

n ve k değerleri salım verilerinin doğrusallaştırılmış eşitlikte yerine konulması ile elde edilmiştir. Çizelge 4.4 sunulan tezde hazırlanan kriyojeller için n, k ve R<sup>2</sup> değerlerini göstermektedir. n değerleri dikkate alındığında eğer n = 0.5 ise Fickian difüzyon etkindir ve ilaç salımının difüzyon kontrollü olduğunu gösterir. n > 0.5 ise anormal veya Fickian olmayan difüzyon; n = 1'de ise tip II difüzyon kinetiği etkindir. Bu durum ilaç salımının şişme kontrollü olarak gerçekleştiğini gösterir. 0.5 < n < 1 ise Fickian ve tip II difüzyonun karışımını ifade eder ve Fickian olmayan difüzyon olarak adlandırılır. Çizelgedeki değerlere bakıldığında Polimer I ve Polimer II için n > 0.5 bulunmuş ve

kompozit sistemin Fickian olmayan difüzyon davranışı gösterdiği belirlenmiştir. İlaç yükleme miktarının artırıldığı Polimer III-V örnekleri için  $n < 0.5$  bulunmuştur. Kompozit kriyojel yapısındaki ilaç yükleme miktarı arttıkça  $k$  değerinin beklendiği gibi arttığı görülmektedir.

**Çizelge 4.4.** Polimer I-V için MMC salım kinetik verileri.

<b>Kriyojel</b>	<b>n</b>	<b>k</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Polimer I	0.78	0.077	0.97
Polimer II	0.56	0.156	0.97
Polimer III	0.43	0.235	0.97
Polimer IV	0.35	0.309	0.97
Polimer V	0.27	0.408	0.97

#### **4.7. Sitotoksosite Çalışmaları**

Bu çalışmada hazırlanan yüzey MMC baskılanmış mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kompozit kriyojellerin sitotoksosite çalışmaları fare fibroblast hücre hattı L929 kullanılarak belirlenmiştir. Fibroblast hücrelerin canlılığı kriyojeller ile hücrelerin etkileştirilmesinden 24 saat sonra analiz edilmiştir. 50 µg MMC/g mPGMA; 100 µg MMC/g mPGMA ve 150 µg MMC/g mPGMA ilaç içeren kriyojeller kullanılarak gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmalarında hücre canlılığı sırası ile % 97, % 98 ve % 100 olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre hazırlanan mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kompozit kriyojellerin sitotoksik özellikte olmadığı söylenebilir. Bu, ilaç salım uygulamaları açısından oldukça önemli bir sonuçtur.

## 5. YORUM

- Sunulan tez çalışmasında, Mitomisin C'nin kontrollü salımı için Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kompozit kriyojeller hazırlanmıştır. Hazırlanan kriyojellerin karakterizasyonu ve in-vitro ortamda ilaç salım performansının belirlenmesi üzerinde çalışmalar yapılmıştır.
- Eşboyutlu mPGMA mikropartiküller (1.6  $\mu\text{m}$ ) dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. mPGMA mikropartiküllerin fizikokimyasal ve manyetik özellikleri belirlenmiştir. mPGMA mikropartiküllerin boyutları dar bir dağılıma sahiptir. mPGMA mikropartiküllerin polidispersite indeksi (PDI) yaklaşık 1.008'dir. mPGMA mikropartiküllerin şişme oranı % 52'dir. mPGMA mikropartiküllerin spesifik yüzey alanı 3.2  $\text{m}^2/\text{g}$  olarak ölçülmüştür. Yoğunluğu ise 1.09  $\text{g}/\text{mL}$ 'dir. Eşboyutlu mPGMA mikropartiküllerin  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  içeriği, manyetik alan rezonansı ve g değerleri sırasıyla % 4.5, 2055 Gauss ve 2.28 olarak bulunmuştur.
- MAH,  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları üzerinden iyonik koordinasyonla MMC ile etkileşmek üzere metal şelatlayıcı ligand ve/veya komonomer olarak seçilmiştir. MAH'ın imidazol grubu geçiş metal iyonları ile şelat yapma özelliğine sahiptir. Ön-kompleks molekülünü hazırlamak için MAH ve  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları oranı literatür verilerine dayanarak 1:1 (mol/mol) olarak belirlenmiştir. Ön-kompleks oluşumu UV-spektrofotometre ile karakterize edilmiştir. MAH molekülündeki histidin  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarını imidazol azotu, amino azotu ve karboksil oksijen atomu üzerinden üç dişli olarak bağlar. MAH- $\text{Cu}^{2+}$  ön-kompleksi, farklı ilaç yükleme oranlarına sahip ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için farklı miktarlarda MMC ile etkileştirilmiştir. Kompleks oluşumu UV-spektrofotometre ile absorpsiyon bantlarındaki kayma/azalma gözönüne alınarak gösterilmiştir.
- mPGMA mikropartikül gömülü PHEMA temelli kriyojellerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. mPGMA mikropartiküller kriyojel polimer yapı içerisinde düzgün ve homojen bir dağılıma sahiptir. Polimerik yapıdaki makrogözenek boyutlarının 20  $\mu\text{m}$ 'den büyük olduğu görülmektedir. Bu makrogözeneklerin dolayısı ile kanalların kriyojel yapıda birbirleriyle bağlantılı olduğu belirlenmiştir.

- İlaç yükleme oranının şişme davranışı ve yüzey alanına olan etkisi  $-18^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta sentezlenen PHEMA temelli kriyojeller için incelenmiştir. Mitomisin C yükleme miktarının artması ile hem şişme oranının hem de yüzey alanının önemli miktarlarda arttığı görülmektedir. Mitomisin C yükleme miktarının  $50\ \mu\text{g}$ 'dan  $250\ \mu\text{g}$ 'a artırılması ile şişme oranı % 475'ten % 690 değerine yükselmiştir. Şişme oranı neredeyse 1.5 katlık bir artış göstermiştir. Yüzey alanı değerleri incelendiğinde de benzer bir davranış gözlenmiştir.  $50\ \mu\text{g}$  Mitomisin C yükleme oranında kriyojelin yüzey alanı  $22.3\ \text{m}^2/\text{g}$  iken  $250\ \mu\text{g}$  Mitomisin C yükleme oranında bu değer  $29.8\ \text{m}^2/\text{g}$  değerine yükselmiştir. Yüzey alanında % 30 civarında bir artış gözlenmiştir.
- Kriyojelleşme sıcaklığının şişme davranışı ve yüzey alanına olan etkileri  $100\ \mu\text{g}$  MMC/g mPGMA ilaç yükleme oranında sentezlenen Mitomisin C baskılanmış PHEMA temelli mPGMA gömülü kompozit kriyojeller için incelenmiştir. Kriyojelleşme sıcaklığının  $-14^{\circ}\text{C}$ 'dan  $-18^{\circ}\text{C}$ 'a azalması ile hem şişme oranında hem de yüzey alanında ilk etapta önemli sayılabilecek bir artış görülmüştür. Kriyojelleşme sıcaklığının  $-18^{\circ}\text{C}$ 'dan  $-24^{\circ}\text{C}$ 'a düşürülmesi ile hem şişme oranında hem de yüzey alanında çok önemli bir artış gözlenmemiştir.  $-18^{\circ}\text{C}$ 'da hazırlanan kompozit kriyojel için şişme oranı % 526 iken  $-24^{\circ}\text{C}$ 'da hazırlanan kompozit kriyojel için bu değer % 538'e ulaşmıştır. Benzer eğilim yüzey alanı değerleri için de gözlenmiştir. Yüzey alanı değerleri  $-18^{\circ}\text{C}$ 'da hazırlanan kompozit kriyojel için  $24.9\ \text{m}^2/\text{g}$ ,  $-24^{\circ}\text{C}$ 'da hazırlanan kompozit kriyojel için  $25.1\ \text{m}^2/\text{g}$ 'dır. Görüldüğü gibi her iki özelliğe de en düşük sıcaklıkta ( $-24^{\circ}\text{C}$ ) hazırlanan kompozit kriyojel için  $-18^{\circ}\text{C}$ 'a göre önemli bir değişim gözlenmemiştir.
- Mitomisin C baskılanmış mPGMA mikropartiküllerden muhtemel  $\text{Cu}^{2+}$  iyonları sızması da incelenmiştir. Salım ortamında da herhangi bir  $\text{Cu}^{2+}$  iyonu sızması gözlenmemiştir. Bu sonuç hazırlanan ön-kompleksün etkin ve kararlı bir şekilde polimerik yapıda kaldığını göstermektedir.
- PHEMA temelli kriyojellere 5 farklı ilaç yükleme miktarında ( $50, 100, 150, 200, 250\ \mu\text{g}$  MMC/g mPGMA) ilaç baskılanmış mPGMA mikropartiküller gömülerek kompozit ilaç taşıyıcı sistem hazırlanmıştır. Mitomisin C baskılanmış kompozit polimer matriksteki ilaç miktarı arttıkça toplam ilaç salım oranı artmıştır. İlaç

yükleme miktarı 50 µg MMC/g mPGMA iken % 70 olan ilaç salım oranı 250 µg MMC/g mPGMA değerinde neredeyse % 99 değerine yaklaşmıştır.

- 5 Farklı ilaç yükleme miktarında (50, 100, 150, 200, 250 µg MMC/g mPGMA) ilaç baskılanmış mPGMA mikropartiküller gömülü PHEMA temelli kompozit kriyojellerden ilaç salım oranları incelenmiştir. İlaç salım hızı ve miktarı ilaç yükleme oranı ile artmıştır. Başlangıçta hızlı olan ilaç salımı 60 saatten sonra çalışılan bütün ilaç salım yükleme miktarları için plato değerine ulaşmış ve sabit kalmıştır.
- Farklı sıcaklıklarda hazırlanan kriyojellerden MMC salımı incelendiğinde -14 °C'da hazırlanan kriyojeller ilk 30 dakikada MMC'nin % 56'lık bir kısmını salmışken -24°C'da hazırlanan kriyojellerin % 92'lik bir kısmını saldığı görülmüştür.
- Ortam pH'ının ilaç salım hızına etkisi incelendiğinde en hızlı ve en fazla miktarda MMC salımı pH 8.5'te gerçekleşmektedir. Bazik ortam pH'ında Cu<sup>2+</sup> ve MMC arasındaki etkileşimler daha zayıf olacağından salım daha hızlı gerçekleşmiş ve 120 saatin sonunda başlangıçtaki MMC'nin % 85'i salınmıştır. pH 4.5 ve 7.4 için bu değer sırasıyla % 68 ve % 76 olarak gözlenmiştir.
- Ortam sıcaklığının MMC salımına etkisi 15°C, 25°C ve 37°C'da incelenmiştir. MMC salım oranı ve hızının sıcaklık arttıkça arttığı görülmüştür.
- Kriyojellerden MMC salım kinetiği incelendiğinde, yapıdaki MMC yükleme miktarı azaldıkça ilaç difüzyonunun Non-Fickian difüzyon gösterdiği bulunmuştur.
- Yapılan sitotoksisite çalışmalarında, kriyojellerin fare fibroblast hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olmadığı gözlenmiştir. Kompozit yapılarıdaki MMC miktarının artması ile birlikte artış gösteren hücre canlılığı değerlerine bakılarak, biyouyumluluğun oldukça yüksek olmasından söz edilebilir.



## 6. KAYNAKLAR

1. 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.
2. Çetin, K., Denizli, A., 5-Fluorouracil delivery from metal-ion mediated molecularly imprinted cryogel discs, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 401-406, 2015.
3. Bakhshpour, M., Yavuz, H., Denizli, A., Controlled release of mitomycin C from PHEMAH-Cu(II) cryogel membranes. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(1), 946-954, 2018.
4. Oral, E., Peppas, N.A., Hydrophilic molecularly imprinted poly(hydroxyethyl methacrylate) polymers. *Journal of Biomedical Material Research*, 78A, 205-210, 2006.
5. Ardivisson, P., Plieva, F., Lozinsky, V.I., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. *Journal of Chromatography A*, 986, 275-290, 2003.
6. Tennikova, T.B., Freitag, R., An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication*, 23, 27-38, 2000.
7. Njayou, M., Quash, G., Purification of measles virus by affinity chromatography and by ultracentrifugation: a comparative study. *Journal of Virological Methods*, 32, 67-77, 1991.
8. Kokufuta, E., Jinbo, E., Hydrogel capable of facilitating polymer diffusion through the gel porosity and its application in enzyme immobilization. *Macromolecules*, 25, 3549-3552, 1992.
9. Kumakura, M., Preparation of immobilized cellulase beads and their application to hydrolysis of cellulosic materials. *Process Biochemistry*, 32, 555-559, 1997.
10. Galaev, I.Yu., Mattiasson, B., Smart polymers and what they could do in biotechnology and medicine. *Trends in Biotechnology*, 17, 335-340, 1999.
11. Chen, J.P., Enzymes immobilized in smart hydrogels, in: *Smart Polymers for Bioseparation and Bioprocessing*. *Polymers for Advanced Technologies* 230, 2002.

12. Kumakura, M., Preparation method of porous polymer materials by radiation technique and its application. *Polymers for Advanced Technologies*, 12, 415-421, 2001.
13. Scardi, V., Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatine. *Methods in Enzymology*, 135B, 293-299, 1987.
14. Andaç, M., Galaev, I.Y., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogels for protein purification, in: *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, Nature for Advanced Devices and Therapies, N.M. Neves and R.L. Reis, eds., Chapter 22, pp. 403-428, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2016.
15. Plieva, F.M., Karlsson, M., Aguilar, M.R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, Y.U., Pore structure in supermacroporous polyacrylamide based cryogels. *Soft Matter*, 1, 303-309, 2005.
16. Langer, R., Folkman, J., Controlled release of bioactive agents. *Trends in Biotechnology*, 2, 47-51, 1976.
17. Spivak, A.S., Optimization, evaluation and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1780, 1779-1794, 2005.
18. Pappioannou, E.H, Liakopoulou-Kyriakides, M., Papi, R.M., and Kyriakidis, D.A., Artificial receptor for peptide recognition in protic media: The role of metal ion coordination. *Materials Science and Engineering B*: 152, 28-32, 2008.
19. Tamahkar, E., Bakhshpour, M., Andaç, M., Denizli, A., Ion imprinted cryogels for selective removal of Ni(II) ions from aqueous solutions. *Separation and Purification Technology*, 179, 36-44, 2017.
20. Bakhshpour, M., Bereli, N., Şenel, S., Preparation and characterization of thiophilic cryogels with 2-mercapto ethanol as the ligand for IgG purification. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 261-268, 2014.
21. Bakhshpour, M., Derazshamshir, A., Bereli, N., Elkak, A., Denizli, A., [PHEMA/PEI]-Cu(II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: Application on the separation of IgG from human plasma. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 824-831, 2016.
22. Derazshamshir, A., Baydemir, G., Andac, M., Say, R., Galaev, I. Y., Denizli, A., Molecularly imprinted PHEMA-based cryogel for depletion of hemoglobin from human blood. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211, 657-668, 2010.

23. Odabasi, M., Say, R., Denizli, A., Molecular imprinted particles for lysozyme purification. *Materials Science and Engineering: C*, 27(1), 90-99, 2007.
24. Lozinsky, V., Plieva, F.M., Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 227-242, 1998.
25. Bereli, N., Saylan, Y., Uzun, L., Say, R., Denizli, A., l-Histidine imprinted supermacroporous cryogels for protein recognition. *Separation and Purification Technology*, 82, 28-35, 2011.
26. Savina, I.N., Cnudde, V., Hollander, S.D., Hoorebeke, L.V., Mattiasson, B., Galaev, I.Y., Prez, F.D., Polymeric cryogels as promising materials. *Soft Matter*, 3, 1179-1184, 2007.
27. Lozinsky, V.I., Fatima, Y. G., Plieva, M., Savina, I.N, Jungvid, H., Mattiasson, B., Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends in Biotechnology*, 21(10), 445-451, 2003.
28. Alkan, H., Bereli, N., Baysal, Z., Denizli, A., Antibody purification with protein A attached supermacroporous poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel. *Biochemical Engineering Journal*, 45, 201-208, 2009.
29. Gun'ko, V.M., Savina, I.N., Mikhalovsky, S.V., Cryogels: morphological, structural and adsorption characterization. *Advances in Colloids and Interface Science*, 187, 1-46, 2013.
30. Babaç, C., Yavuz, H., Galaev, I. Y., Pişkin, E., Denizli, A., Binding of antibodies to concanavalin A-modified monolithic cryogel. *Reactive and Functional Polymers*, 66, 1263-1271, 2006.
31. Arvidsson, P., Plieva, F. M., Savina, I. N., Lozinsky, V. I., Fexby, S., Bülow, L., Galaev, I.Y., Matiasson, B., Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns. *Journal of Chromatography A*, 977, 27-38, 2002.
32. Henderson, T. M. A., Ladewig, K., Haylock, D. N., Mclean, K. M., O'Connor, A. J., Cryogels for biomedical applications, *Journal of Material Chemistry B.*, 1, 26-8-2695, 2013.
33. Reichelt, S., Abe, C., Hainich, S., Knolle, W., Decker, U., Prager, A., Robert Konieczny. Electron-beam derived polymeric cryogels. *Soft Matter*, 9, 2484-2492, 2013.

34. Bereli, N., Şener, G., Altıntaş, E. B., Yavuz, H., Denizli, A., Poly(glycidyl methacrylate) beads embedded cryogels for pseudo-specific affinity depletion of albümin and Immunoglobulin G. *Materials Science and Engineering C*, 30, 323-329, 2010.
35. Perçin, I., Sağlar, E., Yavuz, H., Aksöz, E., Denizli, A., Poly(hydroxyethyl methacrylate) based affinity cryogel for plasmid DNA purification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 577-582, 2011.
36. Özgür, E., Bereli, N., Türkmen, D., Ünal, S., Denizli, A., PHEMA Cryogel for in-vitro removal of anti-dsDNA antibodies from SLE plasma. *Materials Science and Engineering C*, 31, 915-920, 2011.
37. Bereli, N., Şener, G., Yavuz, H., Denizli, A., Oriented immobilized anti-LDL antibody carrying poly(hydroxyethyl methacrylate) cryogel for cholesterol removal from human plasma. *Materials Science and Engineering C*, 31, 1078-1083, 2011.
38. Çimen, D., Denizli, A., Immobilized metal affinity monolithic cryogels for cytochrome c purification. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 93, 29-35, 2012.
39. Göktürk, I., Perçin, I., Denizli, A., Catalase purification from rat liver with iron-chelated poly(hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(l)-glutamic acid) cryogel discs. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46, 602-609, 2016.
40. Lusta, K.A., Immobilization of *E. coli* cells in macroporous polyacrylamide cryogels. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 24, 418-426, 1988.
41. Kumar, A., Srivastava, A., Cell separation using cryogel-based affinity chromatography. *Nature Protocols*, 5, 1737-1747, 2010.
42. Kumar, A., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Affinity fractionation of lymphocytes using a monolithic cryogel. *Journal of Immunology Methods*, 283, 185-194, 2003.
43. Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Macroporous monolithic hydrogels in a 96-mini-column plate format for cell surface-analysis and integrated binding/quantification of cells. *Enzyme Microbial Technology*, 40, 688-695, 2007.
44. Dainiak, M.B., Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. Cell chromatography: separation of different microbial cells using IMAC süper-macroporous monolithic columns. *Biotechnology Progress*, 21, 644-649, 2005.

45. Dainiak, M.B., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells. *Journal of Chromatography A*, 1123, 145-150, 2006.
46. Ahlqvist, J., Kumar, A., Sundstrom, H., Ledung, E., Hornsten, E.G., Enfors, S.O., Mattiasson, B., Affinity binding of inclusion bodies on supermacroporous monolithic cryogels using labeling with specific antibodies. *Journal of Biotechnology*, 122, 216-225, 2006.
47. Teilum, A., Hansson, M.J., Dainiak, M.B., Mansson, R., Surve, S., Elmer, E., Onnerfjord, P., Mattiasson, G., Binding mitochondria to cryogel monoliths allows detection of proteins specifically released following permeability transition. *Analytical Biochemistry*, 348, 209-221, 2006.
48. Allender, C.J., Richardson, C., Woodhouse, B., Heard, C.M., Brain, K.R., Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 195, 39-43, 2000.
49. Cai, W., Gupta, R.B., Molecularly-imprinted polymers selective for tetracycline binding. *Separation and Purification Technology*, 35, 215-222, 2004.
50. Puoci, F., Iemma, F., Muzzalupo, R., Spizzirri, U.G., Trombino, S., Cassano, R., Picci, N., Spherical molecularly imprinted polymers (SMIPs) via a novel precipitation polymerization in the controlled delivery of sulfasalazine. *Macromolecule Bioscience*, 4, 22-26, 2004.
51. Singh, B., Chauhan, N., Preliminary evaluation of molecular imprinting of 5-fluorouracil within hydrogels for use as drug delivery systems. *Acta Biomaterialia*, 4, 1244-1254, 2008.
52. Ansell, R.J., Mosbach, K., Magnetic molecularly imprinted polymer beads for drug radio-ligand binding assay. *Analyst*, 123, 1611-1616, 1998.
53. Bakhshpour, M., Idil, N., Perçin, I., Denizli, A., Biomedical applications of polymeric cryogels. *Applied Science*, 9(3), 553-575, 2019.
54. Müller-Schulte, D., Schmitz-Rode, T., Thermosensitive magnetic polymer particles as contactless controllable drug carriers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 302, 267-271, 2006.
55. Ugelstad, J., Stenstad, P., Kilaas, L., Prestvik, W.S., Herje, R., Berge, A., Hornes, E., Monodisperse magnetic polymer particles. *Blood Purif*, 11, 349-369, 1993.

56. Yeom, S.H., Daugulis, A.J., Lee, S.H., Bioremediation of phenol-contaminated water and soil using magnetic polymer beads. *Process Biochemistry*, 45, 9, 1582-1586, 2010.
57. Hu, Y., Li, Y., Liu, R., Tan, W., Li, G., Magnetic molecularly imprinted polymer beads prepared by microwave heating for selective enrichment of  $\beta$ -agonists in pork and pig liver samples. *Talanta*, 84, 462-470, 2011.
58. Zhang, Z., He, P., Zhang, J., Li, Y., Wang, Q., Recent advances in magnetic targeting based on high magnetic field and magnetic particles. *High Volt.*, 2(4), 220-232, 2017.
59. Saçak, M., *Polimer Teknolojisi*, Gazi Kitabevi, Ankara, 455s. 2012.
60. Brannon-Peppas, L., Peppas, N., *Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Polimerler*, *Kontrollü Salım Sistemleri*, Gürsoy A. (ed.) İstanbul, 21-40, 2002.
61. Philippova, O., Barabanova, A., Molchanov, V., Khokhlov, A., Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. *European Polymer Journal*, 47, 542-559, 2011.
62. Sorensen, C.M., *Magnetism, Nanoscale Materials in Chemistry*. K.J. Klabunde, ed., John Wiley & Sons, Inc. 169-221, 2001.
63. Corchero, J.L., Villaverde, A., Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 27, 468-476, 2009.
64. Balaita, L., Popa, M., Polymer magnetic particles in biomedical applications. *Revue Roumaine de Chimie*, 54(3), 185-199, 2009.
65. Öztürk, N., Türkmen, D., Karakoç, V., Akgöl, S., Manyetik polimerler, *Protein kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, Denizli A., Küfrevioğlu Ö. İ. (ed.) Ankara, Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., 73-99, 2010.
66. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., Kobayashi, T., Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1), 1-11, 2005.
67. Jian-Min, S., Fei-Yun, G., Tao, Y., Hai-Xia, Z., Ming, M., Yan-Jie, Y., Feng Y., cRGD-functionalized polymeric magnetic nanoparticles as a dual-drug delivery system for safe targeted cancer therapy. *Pharmacological Research* 70, 102- 115, 2013.

68. Leto-Aikaterini, T., Panayiotis, B., Alexandros, C., Nikos, B., George, K., Development of multiple stimuli responsive magnetic polymer nanocontainers as efficient drug delivery systems. *Macromol. Biosci.* 14, 131-141, 2014.
69. Ru, C., Fenghua, M., Chao, D., Harm-Anton, K., Zhiyuan, Z., Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. *Biomaterials.* 34, 3647-3657, 2013.
70. Avcıbaşı, U., Avcıbaşı, N., Akalın, H.A., Ediz, M., Demiroğlu, H., Gümüş, F.G., Özçalışkan, E., Türkcan, C., Aktaş Uygun, D., Akgöl, S., Synthesis and biodistribution of novel magnetic poly(HEMA–APH) nanopolymer radiolabeled with iodine-131 and investigation its fate in vivo for cancer therapy. *J Nanopart Res.* 15, 2021, 2013.
71. Avcıbaşı, U., Demiroğlu, H., Ediz, M., Akalın, H.A., Özçalışkan, E., Şenay, H., Türkcan, C., Özcan, Y., Akgöl, S., Avcıbaşı, N., Radiolabeling of new generation magnetic poly(HEMA–MAPA) nanoparticles with <sup>131</sup>I and preliminary investigation of its radiopharmaceutical potential using albino Wistar rats. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 56, 708-716, 2013.
72. Altıntaş, E.B., Uzun, L., Denizli, A., Synthesis and characterization of monosize magnetic poly(glycidyl methacrylate) beads, *China Particuology*, 5, 174-179, 2007.
73. Garıpcan, B., Denizli, A., A Novel chromatographic affinity support material for separation of immunoglobulin-G from human plasma, *Macromolecular Bioscience*, 2(3) 135-144, 2002.
74. Saylan, Y., Denizli, A., Supermacroporous composite cryogels in biomedical applications, *Gels*, 5, 20, 5020020, 2019.
75. Yavuz, H., Çetin, K., Akgönüllü, S., Battal, D., Denizli, A., Therapeutic Protein and Drug Imprinted Nanostructures as Controlled Delivery Tools, in: *Design and Development of New Carriers, Volume IX Sustained and Controlled Delivery Systems Part*, A.M. Grumezescu, ed., Chapter 12, pp. 439-473, Elsevier, 2018.
76. Denizli, A., Kiremitçi, M., Pişkin, E., A Subcutaneous polymeric matrix system p(HEMA/BGA) for controlled release of an anticancer drug (5-fluorouracil): I synthesis and structure, *Biomaterials*, 9(3) 257-262, 1988.
77. Denizli, A., Kiremitçi, M., Pişkin, E., A Subcutaneous polymeric matrix system p(HEMA/ BGA) for controlled release of an anticancer drug (5-fluorouracil): II release kinetics, *Biomaterials*, 9(4) 363-366, 1988.

78. Yavuz, H., Denizli, A., A new affinity separation medium: supermacroporous cryogels, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.10733-4, 1-12, 2015.
79. Öncel, P., Çetin, K., Topçu, A.A., Yavuz, H., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogel membranes for mitomycin C delivery, Journal of Biomaterials Science Polymer Edition, 28(6) 519-531, 2017.
80. Türkmen, D., Bereli, N., Çorman, M.E., Shaikh, H., Akgöl, S., Denizli, A., Molecular imprinted magnetic nanoparticles for controlled delivery of mitomycin C, Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 42(5) 316-322, 2014.
81. Bakhshpour, M., Yavuz, H., Denizli, A., Molecularly imprinted cryogels for controlled delivery of anti-cancer drug mitomycin C, Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 46(1) 946-954, 2019.
82. Zaidi, S.A., Molecular imprinting: a useful approach for drug delivery, Materials Science for Energy Technologies, 3, 72-77, 2020.