T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UYARIYA DUYARLI VE BİYOBOZUNUR AMFİFİLİK KOPOLİMERLERİN SENTEZİ, SOL-JEL FAZ GEÇİŞ VE İLAÇ SALIM DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ

YASEMİN TAMER

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
FİZİKOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. HÜSEYİN YILDIRIM

İSTANBUL, 2014

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UYARIYA DUYARLI VE BİYOBOZUNUR AMFİFİLİK KOPOLİMERLERİN SENTEZİ, SOL-JEL FAZ GEÇİŞ VE İLAÇ SALIM DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ

Yasemin TAMER tarafından hazırlanan tez çalışması 20.10.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. Nergis ARSU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. Saadet PABUCCUOĞLU
İstanbul Üniversitesi

Prof.Dr. Tarık EREN
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. A. Tunçer ERCİYES
İstanbul Teknik Üniversitesi

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011-01-02-DOP07 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve akademik hayata adım attığım ilk andan itibaren her konuda desteğini, yardımını, anlayış ve değerli önerilerini esirgemeyen ve her zaman örnek aldığım ve alacağım tez danışmanım değerli hocam Prof.Dr. Hüseyin YILDIRIM'a,

Tezimi inceleyerek harcayacakları vakit için Prof.Dr. Atilla GÜNGÖR, Prof.Dr. Saadet PABUCCUOĞLU ve Prof.Dr. Tarık EREN'e,

Tez izleme komitesinde olan ve tezimi değerlendirecek olan sayın hocam Prof.Dr. Nergis ARSU ve Prof.Dr. Ferdane KARAMAN'a laboratuvar imkanlarını benimle paylaştıkları için,

Bu tezdeki ölçümlerin yapılmasında emeği geçen Doç.Dr. Demet KARACA BALTA ve bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştığı için Doç. Dr. Gökhan TEMEL'e,

Tezin deneysel kısmında katkılarını esirgemeyen ve her zaman dostluğundan mutluluk duyduğum, sevgili arkadaşlarım Nurcan KARACA, Arş.Gör.Dr. Özlem YAZICI ve Arş.Gör.Dr. Serap ACAR DERMAN'a,

Doktora eğitimim boyunca sağladıkları burs için TÜBİTAK-BİDEB 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı'na,

Ve bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen, her zaman yanımda, attığım her adımda arkamda olan ve başarım gururları olan hayattaki en büyük şansım sevgili annem ve babama,

Her zaman yanımda olan sevgili kardeşlerim Dilek BALÇIK, Elif KARAMAN, eşi ve ailemize yeni katılacak olan küçük yeğenime verdikleri büyük destek için,

Sıkıntılı tez yazım sürecinde verdikleri manevi destek için eşimin ailesine,

Beni hep destekleyip gözeten, güven ve güç veren onsuz asla ayakta kalamayacağım, sevgili eşim; sevincim, umudum, sabrım, gücüm kısacası yaşama sebebim olan biricik oğlum *BERKAY, y*anıbaşımda olduğunuz ve bir arada olduğumuz sürece, üstesinden gelemeyeceğimiz hiçbir şey yok, ikinize de

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Eylül, 2014

Yasemin TAMER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ x

KISALTMA LİSTESİ xi

ŞEKİL LİSTESİ xiii

ÇİZELGE LİSTESİ xvi

ÖZET xvii

ABSTRACT xix

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 5
1.3 Hipotez 5

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ 7

2.1 Kontrollü Salım Sistemleri 7
2.1.1 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması 12
2.1.1.1 Uygulama Yerine Göre Kontrollü Salım Sistemleri 12
2.1.1.2 İlaç Salım Mekanizmasına Göre Kontrollü Salım Sistemleri 12
2.1.1.2.1 Difüzyon Kontrollü Salım 14
2.1.1.2.2 Kimyasal Kontrollü Salım 15
2.1.1.2.3 Çözücü Kontrollü Salım 16
2.1.1.2.4 Dış Etkilere Bağlı Salım 16
2.1.2 Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Taşıyıcılar 17
2.1.2.1 Biyobozunur polimerler 18
2.1.2.2 Biyobozunmaz polimerler 19

2.1.3 Kontrollü Salım Sistemlerinin Avantajları Ve Dezavantajları 20
2.1.4 Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan İlaç Taşıma Sistemleri 22
2.1.4.1 Lipozomlar 23
2.1.4.2 Niozomlar 24
2.1.4.3 Mikrotanecikler 25
2.1.4.4 Mikroküreler 25
2.1.4.5 Mikrokapsüller 25
2.1.4.6 Nanotenecikler 26
2.1.4.7 Nanoemülsiyonlar: 28
2.2 Polimerik Miseller 30
2.2.1 Polimerik Misel Oluşumu ve Yapısı 31
2.2.2 Polimerik Misellerin Morfolojisi 34
2.2.3 Polimerik Misellerin Özellikleri 36
2.2.4 Polimerik Misel Sistemlerinin Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi 37
2.2.5 Polimerik Misel Hazırlama Yöntemleri 38
2.2.6 Polimerik Misellerin Hedeflendirilmesi 39
2.2.6.1 Pasif Hedeflendirme 40
2.2.6.2 Aktif Hedeflendirme 41
2.2.6.2.1 Uyarı cevaplı hedeflendirme 41
2.2.6.2.2 Biyolojik uyarı ile hedeflendirme 41
2.2.6.2.3 Dışarıdan uyarı ile hedeflendirme 42
2.2.6.2.4 Spesifik ligantlar bağlayarak hedeflendirme 42
2.2.7 Polimerik Misel Sistemlerinin Avantajarı ve Dezavantajları 42
2.2.8 Polimerik Misellere İlaç Yüklenmesi 43
2.2.8.1 Polimerik Miseller Kullanılarak İlaçların Çözünür Hale Getirilmesi 43
2.2.8.2 İlaç yüklü polimerik misellerin hazırlanması 45
2.2.8.2.1 Doğrudan Çözme Yöntemi 46
2.2.8.2.2 Diyaliz Yöntemi 46
2.2.8.2.3 Emülsiyon Oluşumu Yöntemi 47
2.2.8.2.4 Çözücü Buharlaştırma ile Film Oluşum Yöntemi 47
2.2.8.2.5 Dondurararak Kurutma Yöntemi 47
2.2.9 İlaç Yükleme Etkinliğini Belirleyen Faktörler ve Yükleme Etkinliği 48
2.2.9.1 Çekirdeği ve Kabuğu Oluşturan Blokların Uzunluğu 48
2.2.9.2 İlaç ve Çekirdek Arasındaki Etkileşimler 48
2.2.9.3 İlacın Özellikleri 50
2.2.9.4 Misel Hazırlama Yöntemi 50
2.2.9.5 Diğer Parametreler 51
2.2.10 Polimerik Misellerden İlaç Salımı 51
2.2.11 Polimerik Misellerin Karakterizasyonu 53
2.2.11.1 Kritik Misel Konsantrasyonu 53
2.2.11.2 Tanecik Boyutu ve Boyut Dağılımı 55
2.2.11.3 Misellerin Yükü 56
2.2.11.4 Misellerin Kararlılığı 57

2.2.11.4.1 Termodinamik Kararlılık 57
2.2.11.4.2 Kinetik Kararlılık 59
2.2.12 Misellerin Morfolojisi 61
2.2.13 Polimerik Misellerin Hazırlanmasında Kullanılan Kopolimerler.....62
2.2.13.1 Poli(etilen glikol) (PEG) 67
2.2.13.2 Poli (ε-Kaprolakton) (PCL) 68
2.2.13.3 Poli (β-amino ester) (PBAE) 70
2.2.14 Uyarı Duyarlı Polimerik Miseller 74
2.2.14.1 pH Duyarlı Polimerik Miseller.....74
2.2.14.1.1 Zayıf Poliasitler.....75
2.2.14.1.2 Zayıf Polibazlar.....76
2.2.14.2 Sıcaklık Duyarlı Polimerik Miseller.....78
2.2.14.3 Diğer Uyaranlara Duyarlı Polimerik Miseller.....80
2.3 Sol-Jel Faz Geçişi 80
2.3.1 Sol-Jel Faz Geçişinin Saptanması 84
2.4 Etoposid.....86
2.4.1 Fizikokimyasal Özellikleri 86
2.4.2 Miktar Tayini Yöntemleri 88

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR 89

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar 89
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....89
3.1.2 Kullanılan Cihazlar 92
3.1.2.1 Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FTIR) 92
3.1.2.2 Ultraviyole -Görünür Bölge Spektrometresi 92
3.1.2.3 Jel Geçirgenlik Kromotografisi (GPC).....92
3.1.2.4 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi 93
3.1.2.5 Floresans spektrometre 93
3.1.2.6 Tanecik Büyüklüğü Ölçer (Particle Sizer).....93
3.1.2.7 Zeta Potansiyel Ölçer (Zeta Sizer).....93
3.1.2.8 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope).....93
3.1.2.9 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) 93
3.2 Deneysel Yöntemler.....94
3.2.1 UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Etoposid Standart Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması 94
3.2.2 Kopolimerlerin Sentezi 94
3.2.2.1 Amfifilik Trilok Kopolimerlerin Sentezi 94
3.2.2.1.1 mPEG-b-PCL Sentezi.....94
3.2.2.1.2 mPEG-b-PCL-AC Sentezi 95
3.2.2.1.3 mPEG-b-PCL-b-PBAE Sentezi 95
3.2.2.2 Graft Kopolimerlerin Sentezi.....99
3.2.2.2.1 mPEG-b-PCL-COOH Sentezi 99

3.2.2.2.2 OH Sonlu PBAE Sentezi.....99
3.2.2.2.3 PBAE-g-PCL-b-mPEG Sentezi 100
3.2.2.3 4 Kollu Yıldız PEO Kaplı YPCL-b-PBAE Kopolimerlerinin Sentezi 101
3.2.2.3.1 4 kollu Yıldız YPCL-b-PBAE Kopolimerlerinin Sentezi 101
3.2.2.3.2 4 kollu Yıldız YPCL-b-PBAE Kopolimerlerinin PEO ile Kaplanması 102
3.2.3 Polimerik Misellerin Hazırlanması.....104
3.2.4 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Karakterizasyonu.....104
3.2.4.1 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin pH Duyarlılıkları ..104
3.2.4.2 Polimerik Misellerin Kritik Misel Konsantrasyonları.....105
3.2.4.3 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Boyutu ve Boyut Dağılımı Analizi 105
3.2.4.4 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Yük Tayini 106
3.2.4.5 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Morfolojilerinin Tayini.....106
3.2.5 Amfifilik Kopolimerlerin Hidrolitik Olarak Biyobozunma Özelliği 106
3.2.6 Kopolimerlerin Sol-Jel Faz Geçiş Özellikleri 106
3.2.7 Polimerik Misellere, Nanotaneciklere ve Jellere Etoposid Yüklenmesi 107
3.2.8 Polimerik Misellere ve Nanotaneciklere Etoposid Yüklenme Kapasitesi Tayini 107
3.2.9 Polimerik Misel, Nanotanecik ve Jellerden İn vitro Etoposid Salımı .108

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 109

4.1 UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Etoposidin Standart Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması 109
4.2 Kopolimerlerin Karakterizasyonu 110
4.2.1 Amfifilik Triblok Kopolimerlerin Karakterizasyonu 110
4.2.2 Graft Kopolimerlerin Karakterizasyonu.....118
4.2.3 Yıldız Kopolimerlerin Karakterizasyonu.....125
4.2.3.1 PEO Kaplı Yıldız Kopolimer Nanotaneciklerin Karakterizasyonu 131
4.3 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Karakterizasyonu 134
4.3.1 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin pH Duyarlılıkları.....134
4.3.2 Polimerik Misellerin Kritik Misel Konsantrasyonları 137
4.3.3 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Boyutu ve Boyut Dağılımı Analizi 142
4.3.4 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Yük Tayini 148
4.3.5 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Morfolojilerinin Tayini 153
4.4 Amfifilik Kopolimerlerin Hidrolitik Olarak Biyobozunma Özellikleri.....161
4.5 Kopolimrlerin Sol-Jel Faz Geçiş Özellikleri.....166
4.5.1 Kopolimer Konsantrasyonunun Etkisi 168

4.5.2 PBAE Grubunun Etkisi 174
4.5.3 mPEG Molekül Ağırlığının Etkisi 177
4.5.4 Hidrofobik/Hidrofilik Blok Oranın Etkisi 179
4.6 Polimerik Misellerin, Nanotaneciklerin ve Jellerin Enkapsülasyon Etkinliği ve Etoposid Yükleme Kapasitesi Tayini 182
4.7 Polimerik Miseller, Nanotanecikler ve Jellerden In Vitro Etoposid Salımı 185
4.7.1 Polimerik Misel ve Nanotaneciklerden In Vitro Etoposid Salımı 185
4.7.2 Jellerden In Vitro Etoposid Salımı 193
4.8 Genel Değerlendirme ve Öneriler 199

KAYNAKLAR 204

ÖZGEÇMİŞ 218

SİMGE LİSTESİ

X_{sp}	Flory-Huggins etkileşim parametresi
k	Boltzman sabiti
T	Sıcaklık
V_s	Çözünmüş ilacın molar hacmi
δ_p	Çekirdeği oluşturan bloğun Scatchard-Hildebrand çözünürlük parametresi
δ_s	İlacın Scatchard-Hildebrand çözünürlük parametresi
P	Dağılım katsayısı
T_g	Camsı geçiş sıcaklığı
T_m	Erime sıcaklığı
ζ	Zeta potansiyeli
σ_y	Akma gerilimi
R	Yarıçap
L	Uzunluk
d	Yoğunluk
g	Yerçekimi ivmesi
λ	Dalgaboyu
pK_a	Asitlik sabiti
pK_b	Bazlık sabiti

KISALTMA LİSTESİ

AC	Akriloil klorür
AEE	2-(2-Aminoetoksi)etanol
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
APD	3-Amino-1,2-propandiol
ε-CL	ε-Kaprolakton
CMC	Kritik misel konsantrasyonu
CMT	Kritik misel sıcaklığı
DACH	1,4-Diazasikloheptan
DCC	N,N'-Disiklohegzilkarbodiimid
DCM	Diklorometan
DEGDA	Di(etilen glikol) diakrilat
DLS	Dinamik Işık Saçılması
DMAP	4-(Dimetilamino)piridin
DMEDA	N,N-dimetiletilendiamin
DMF	Dimetilformamid
EE	Enkapsülasyon etkinliği
EPR	Arttırılmış geçirgenlik ve alıkoyma etkisi
FDA	Gıda ve ilaç yönetimi
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskoisi
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
HCl	Hidroklorik asit
HDA	1,6-Hekzandiol diakrilat
HDEDA	1,6-Hekzandiol etoksilat diakrilat
HLB	Hidrofilik-lipofilik denge
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LCST	Düşük kritik çözünme sıcaklığı
$\bar{M}_n$	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
NaOH	Sodyum Hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
Na_2SO_4	Sodyum sülfat
^{1}H-NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
mPEG	Metoksi poli(etilen glikol)
PAA	Poli(akrilik asit)

PACA	Poli(alkil siyanoakrilat)
PBAE	Poli(β-amino ester)
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCL	Poli(ε-kaprolakton)
PDI	Polidispersite
PDLLA	Poli(D,L-laktik asit)
PDMAEMA	Poli(dimetilaminoetil metakrilat)
PDMS	Poli(dimetil siloksan)
PEAA	Poli(2-etil akrilik asit)
PEG	Poli(etilen glikol)
PEGDA	Poli(etilen glikol) diakrilat
PEI	Polietilenimin
PEO	Poli(etilen oksit)
PGA	Poli(glikolik asit)
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolit)
PMAA	Poli(metakrilik asit)
POE	Poli(orto ester)
PPAA	Poli(2-propil akrilik asit)
PPO	Poli(propilen oksit)
PTOL	Pentaeritritol
PVA	Poli(vinil alkol)
PVI	Poli(vinil imidazol)
PVP	Poli(N-vinil pirolidon)
RES	Retiküloendotelyal sistem
RP-HPLC	Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
$Sn(Oct)_2$	Kalay oktoat
TEA	Trietilamin
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
THF	Tetrahidrofuran
UV-VIS	Ultraviolet-görünür bölge
XPS	X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi
YK	Yükleme kapasitesi

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 İlaç-plazma konsantrasyonunun zamanla değişimi 9
Şekil 2. 2 Çeşitli ilaç salım şekilleri a)anında salım, b) geciktirilmiş salım, c) tekrarlanan salım, d) uzatılmış etkili salım, e) sürekli salım f) kontrollü salım 11
Şekil 2. 3 Lipozomun şematik yapısı.....23
Şekil 2. 4 Niozomun şematik yapısı.....24
Şekil 2. 5 Mikrokapsül ve mikrokürenin yapısal farkı.....26
Şekil 2. 6 Nanoemülsiyon oluşumu 29
Şekil 2. 7 Polimerik misel oluşumu.....31
Şekil 2. 8 (a) Yıldız benzeri ve (b) crew-cut misel yapılarının gösterimi 34
Şekil 2. 9 Çeşitli misel yapıları (a) küresel misel, (b) silindirik misel, (c) disk şekilli misel, (d) vezikül, (e) hamburger şekilli misel, (f) ahududu şekilli misel ve (g) toroidal misel.....35
Şekil 2. 10 EPR etkisi.....41
Şekil 2. 11 İlacın hidrofobikliğine bağlı olarak misel içerisindeki konumu 44
Şekil 2. 12 Farklı tip amfifilik blok kopolimerlerden hazırlanan polimerik miseller 64
Şekil 2. 13 ε-kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonunun şematik gösterimi 69
Şekil 2. 14 Poliesterlerin hidrolitik olarak bozunması.....69
Şekil 2. 15 Poli(ε-kaprolakton)'un hidrolitik olarak bozunması.....70
Şekil 2. 16 Michael tipi katılma polimerizasyonu ile poli(β-amino ester) sentezi.....71
Şekil 2. 17 Amin bileşiklerinin protonlanması 73
Şekil 2. 18 Çeşitli pH duyarlı poliasitler (a) PAA, (b) PMAA, (c) poli(2-etil akrilik asit) (PEAA) ve (d) poli(2-propil akrilik asit) (PPAA) 76
Şekil 2. 19 Çeşitli pH duyarlı polibazlar (a) poli (N,N'-dimetilaminoetilmetakrilat) (PDMAEMA), (b) poli (N,N'-dietilaminoetilmetakrilat) PDEAEMA, (c) Poli (vinil prolidon) (PVP) ve (d) Poli(vinil imidazol) (PVI).....77
Şekil 2. 20 Misellerin jel oluşturmak üzere düzenlenmesi.....82
Şekil 2. 21 pH ve sıcaklık duyarlı blok kopolimer çözeltilerinin sol-jel mekanizması ..83
Şekil 2. 22 Tüp ters çevirme yönteminin şematik gösterimi 84
Şekil 2. 23 Viskoelastik sıvı ve jellerde düşen bilye test yönteminin şematik gösterimi 85
Şekil 2. 24 Etoposidin kimyasal yapısı 86
Şekil 3. 1 mPEG-b-PCL-b-PBAE1 amfifilik triblok kopolimerinin sentezi 97

Şekil 3. 2 Farklı mPEG-b-PCL-b-PBAE kopolimerlerinin sentezi 98
Şekil 3. 3 mPEG-b-PCL-COOH kopolimerinin sentezi 99
Şekil 3. 4 Farklı PBAE-g-PCL-b-mPEG graft kopolimerinin sentezi 100
Şekil 3. 5 Farklı PBAE-g-PCL-b-mPEG graft kopolimerinin sentezi.....101
Şekil 3. 6 4 kollu yıldız şekilli YPCL polimerinin sentezi ve akrillenmesi.....102
Şekil 3. 7 4 kollu yıldız şekilli YPCL-b-PBAE kopolimerlerinin sentezi 103
Şekil 4. 1 Etoposidin metanol içerisindeki UV absorpsiyon spektrumu.....109
Şekil 4. 2 Etoposidin kalibrasyon doğrusu 110
Şekil 4. 3 mPEG-b-PCL-b-PBAE'nin FTIR-ATR spektrumu 111
Şekil 4. 4 Farklı PBAE bloğu içeren triblok kopolimerlere ait FTIR-ATR spektrumları 112
Şekil 4. 5 a) mPEG-b-PCL, b) mPEG-b-PCL-AC ve c) mPEG-b-PCL-b-PBAE (B1) kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları.....113
Şekil 4. 6 a) B5, b) B7 ve c) B9 triblok kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları.....116
Şekil 4. 7 PBAE-g-PCL-b-mPEG (G1) graft kopolimerinin FTIR-ATR spektrumları....119
Şekil 4. 8 Farklı PBAE gruplarına sahip graft kopolimerlere ait FTIR-ATR spektrumları 119
Şekil 4. 9 a) mPEG-b-PCL-COOH, b) PBAE, c) PBAE-g-PCL-b-mPEG (G1 veya G5) graft kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları 121
Şekil 4. 10 a) PBAE ve b) PBAE-g-PCL-b-mPEG (G7 veya G9) graft kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları.....123
Şekil 4. 11 PEO kaplı YPCL-b-PBAE (Y1) yıldız kopolimerlerine ait FTIR-ATR spektrumları 126
Şekil 4. 12 a) 4 kollu PCL, b) 4 kollu PCL-AC, c) 4 kollu PCL-b-PBAE1 ve d) 4 kollu PCL-b-PBAE2 yıldız kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları 129
Şekil 4. 13 PEO kaplı Y1 kopolimerinin XPS spektrumu 132
Şekil 4. 14 Amfifilik triblok kopolimerlerin titrasyon eğrileri 135
Şekil 4. 15 Graft kopolimerlerin titrasyon eğrileri 136
Şekil 4. 16 Yıldız kopolimerlerin titrasyon eğrileri 136
Şekil 4. 17 B1 kopolimerinin floresans spektrumu 138
Şekil 4. 18 G1, G5, G7 ve G9 kopolimerlerinin CMC grafikleri 139
Şekil 4. 19 Triblok kopolimerlerden hazırlanan misellerin farklı pH değerlerindeki boyut dağılımları 143
Şekil 4. 20 Graft kopolimerlerden hazırlanan misellerin farklı pH değerlerindeki boyut dağılımları 146
Şekil 4. 21 Yıldız kopolimerlerden elde edilen nanotaneciklerin farklı pH değerlerindeki boyut dağılımları 147
Şekil 4. 22 Amfifilik triblok kopolimer misellerin farklı pH'lardaki zeta potansiyeli değişimleri 151
Şekil 4. 23 Graft kopolimer misellerin farklı pH'lardaki zeta potansiyeli değişimleri 152
Şekil 4. 24 Yıldız kopolimer nanotaneciklerinin farklı pH'lardaki zeta potansiyeli değişimleri.....153

Şekil 4. 25 a)B1, b)B2, c)B3, d)B4, e)B5, f)B6, g)B7, h)B8, i)B9 ve j)B10 triblok kopolimerlerinden elde edilen polimerik misellerin SEM görüntüleri.....155
Şekil 4. 26 a)G1, b)G2, c)G3, d)G4, e)G5, f)G6, g)G7, h)G8, i)G9 ve j)G10 graft kopolimerlerinden elde edilen polimerik misellerin SEM görüntüleri 157
Şekil 4. 27 a)Y1, b)Y2, c)Y3, d)Y4, e)Y5, f)Y6, yıldız kopolimerlerinden elde edilen nanotaneciklerin SEM görüntüleri.....160
Şekil 4. 28 Triblok kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları.....162
Şekil 4. 29 Graft kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları.....164
Şekil 4. 30 Yıldız kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları.....165
Şekil 4. 31 Kopolimerlerin sol-jel faz geçiş özellikleri 167
Şekil 4. 32 (a) B4, (b) B6, (c) B8, (d) B10 triblok kopolimerlerinin farklı konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçişleri.....171
Şekil 4. 33 (a) G4, (b) G6, (c) G8, (d) G10 graft kopolimerlerinin farklı konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçişleri.....172
Şekil 4. 34 (a) Y2, (b) Y5 yıldız kopolimerlerinin farklı konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçişleri 173
Şekil 4. 35 Blok kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PBAE etkisi 175
Şekil 4. 36 Graft kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PBAE etkisi.....176
Şekil 4. 37 Yıldız kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PBAE etkisi.....177
Şekil 4. 38 B1 ve B3 kopolimerlerinin sol-jel faz geçişleri üzerine mPEG molekül ağırlığının etkisi.....178
Şekil 4. 39 G1 ve G3 kopolimerlerinin sol-jel faz geçişleri üzerine mPEG molekül ağırlığının etkisi.....179
Şekil 4. 40 Blok kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PCL/mPEG oranının etkisi 180
Şekil 4. 41 Graft kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PCL/mPEG oranının etkisi 181
Şekil 4. 42 Yıldız kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PCL/mPEG oranının etkisi 182
Şekil 4. 43 Etoposid yüklü triblok kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri 186
Şekil 4. 44 Etoposid yüklü graft kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri 188
Şekil 4. 45 Etoposid yüklü yıldız kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri 192
Şekil 4. 46 Farklı miktarlarda etoposid içeren B1 kopolimer jellerinden in vitro etoposid salımı.....194
Şekil 4. 47 Amfifilik triblok kopolimerlerden hazırlanan jellerin in vitro etoposid salım grafikleri 196
Şekil 4. 48 Amfifilik graft kopolimerlerden hazırlanan jellerin in vitro etoposid salım grafikleri 197
Şekil 4. 49 PEO kaplı yıldız kopolimerlerden hazırlanan jellerin in vitro etoposid salım grafiği 198

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Kontrollü salım sistemlerinin uygulama yollarına göre sınıflandırılması 13
Çizelge 2. 2 Polimerik miseller ve nanotaneciklerin ilaç taşıma etkinlikleri..... 30
Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler 89
Çizelge 4. 1 Amfifilik triblok kopolimerlerin molekül ağırlıkları ve polidispersiteleri 118
Çizelge 4. 2 Amfifilik graft kopolimerlerin molekül ağırlıkları ve polidispersiteleri..125
Çizelge 4. 3 Sentezlenen yıldız kopolimerlerin molekül ağırlıkları 130
Çizelge 4. 4 Yıldız kopolimer nanotaneciklerinin yüzey elementel bileşimlerinin yüksek çözünürlüklü C1s pik analizleri.....133
Çizelge 4. 5 Farklı yapılardaki kopolimerlerin CMC değerleri.....141
Çizelge 4. 6 Etoposid yüklenmiş ve yüklenmemiş polimerik misellerin ve nanotaneciklerin pH 7,4'deki tanecik büyüklüğü ve dağılımı 150
Çizelge 4. 7 Farklı yapılardaki kopolimer çözeltilerin değişik konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçiş özellikleri 170
Çizelge 4. 8 Polimerik misellerin ve nanotaneciklerin % enkapsülasyon etkinliği ve % yükleme kapasitesi 184

ÖZET

UYARIYA DUYARLI VE BİYOBOZUNUR AMFİFİLİK KOPOLİMERLERİN SENTEZİ, SOL-JEL FAZ GEÇİŞ VE İLAÇ SALIM DAVRANIŞLARININ İNCELENMESİ

Yasemin TAMER

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM

Bu tez çalışmasında, kontrollü ilaç salım uygulamalarında kullanılabilecek biyouyumlu ve biyobozunur özellikte, farklı bileşimlere sahip sıcaklık ve pH duyarlı amfifilik kopolimerlerin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi. Misel oluşturabilme davranışları ve fizyolojik koşullardaki sol-jel faz geçiş özellikleri belirlenen bu kopolimerlerin ilaç salım davranışları belirlendi.

Çalışmanın birinci kısmında, ε-kaprolakton (ε-CL), metoksi poli(etilen glikol) (mPEG) ve çeşitli amin ve diakrilat bileşikleri kullanılarak, metoksi poli(etilen glikol)-b-poli(ε-kaprolakton)-b-poli(β-amino ester) (mPEG-b-PCL-b-PBAE) triblok kopolimerleri, poli(β-amino ester)-g-poli(ε-kaprolakton)-b-metoksi poli(etilen glikol) (PBAE-g-PCL-b-mPEG) graft kopolimerleri ve poli(etilen oksit) (PEO) ile kaplanmış 4 kollu yıldız poli(ε-kaprolakton)-b-poli(β-amino ester) (PEO kaplı 4YPCL-b-PBAE) kopolimerleri olmak üzere üç farklı yapıda amfifilik kopolimer sentezlendi. Sentezlenen amfifilik kopolimerlerin yapıları, ortalama molekül ağırlıkları ve polidispersiteleri Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskoisi (FTIR), Proton Nükleer Manyetik Rezonanas (^{1}H NMR) ve Jel Geçirgenlik Kromatografi (GPC) ile karakterize edildi. Diyaliz yöntemi ile hazırlanan polimerik misellerin kritik misel konsantrasyonları Floresans Spektrofotometresi ile; misellerin tanecik büyüklüğü, dağılımı ve yükü Dinamik Işık

Saçılması (DLS) ile; pH duyarlılıkları asit baz titrasyonu yöntemi ile; misel morfolojisi ise Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak karakterize edildi. Ayrıca, X-Işınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ile yüzey karakterizasyonu yapılan yıldız kopolimerlerin C1s spektrumunun eter (-C-O-) sinyalindeki artış PEO zincirlerinin nanotanecik yüzeyine etkili bir şekilde bağlandığını kanıtladı. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, amfifilik kopolimerlerin başarılı bir şekilde sentezlendiği ve düşük konsantrasyonlarda (0,001-0,068 mg/mL) misel oluşturabildiği gözlendi. Tanecik boyutu ölçümleri, blok kopolimerlerin misel boyutunun 60-92 nm, graft kopolimerlerin 95-121 nm ve yıldız kopolimerlerin 110-160 nm arasında olduğunu gösterdi. Fosfat tampon çözeltisi içerisinde pH 7,4'te biyobozunma davranışları incelenen kopolimerlerin yaklaşık % 50'sinin 2-3 gün içerisinde hidrolitik olarak bozunduğu görüldü.

İkinci aşamada; sentezlenen kopolimerlerin sol-jel faz geçiş özellikleri incelendi. Bu amaçla belirli konsantrasyonda hazırlanan kopolimer çözeltilerinin farklı sıcaklık ve pH değerlerinde jel oluşturma özelliği tüp ters çevirme yöntemi ile belirlendi. % 25 kopolimer konsantrasyonunda sentezlenen tüm kopolimerlerin jel oluşturabildikleri görüldü. Kopolimerlerin her bir bloğunun uzunluğu ayarlanarak kopolimer çözeltisinin oda sıcaklığında enjekte edilebilmesi, fizyolojik koşullarda (37˚C ve pH 7,4) ise jel oluşturabilmesi için gereken koşullar belirlendi.

Bu tez çalışmasının son bölümünde; suda zayıf çözünürlüğe sahip ve direk olarak kullanımında toksik bir antikanser ilacı olan etoposid, diyaliz yöntemi ile suda kendiliğinden oluşan polimerik misellerin hidrofobik çekirdeğinde hapsedilerek veya ilaç polimerle doğrudan karıştırılarak polimerik taşıyıcıya etkin bir şekilde çeşitli oranlarda (5, 10, 15, 20 mg/mL) yüklendi. Bu taşıyıcıların ilaç yükleme etkinliği UV-VIS spektrofotometresi ile tayin edildi ve optimum etoposid yükleme içeriği 10 mg/mL olarak bulundu. Etoposidin bu taşıyıcılardan in vitro salım çalışmaları misel ve nanotanecikler için asidik pH (5,0 ve 6,5) ve fizyolojik pH (7,4)'da jeller için fizyolojik pH'da incelendi. Kopolimerlerin iki farklı taşıyıcı olarak kullanımlarında yüklenen ilaçların salım sonuçları karşılaştırıldı.

Sonuç olarak; bu çalışmada sentezlenen kopolimerlerin hem etkili ve kolay bir salım yolu olan oral yoldan vücuda verilebilecek polimerik miseller olarak hem de sol-jel faz geçiş özelliklerinden yararlanarak enjekte edilebilir sistemler olarak kullanılabilecekleri gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Amfifilik kopolimer, biyobozunur, polimerik misel, sol-jel faz geçişi, enjekte edilebilir jel, etoposid.

ABSTRACT

SYNTHESIS OF STIMULI SENSITIVE AND BIODEGRADABLE AMPHIPHILIC COPOLYMERS, INVESTIGATION OF SOL-GEL PHASE TRANSITION AND DRUG RELEASE BEHAVIORS

Yasemin TAMER

Department of Chemistry

Phd. Thesis

Advisor: Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM

In this study, temperature and pH sensitive, biocompatible and biodegradable amphiphilic copolymers with different compositions were synthesized and characterized. These copolymers can be used for controlled drug delivery. The micelle forming behavior, the sol-gel phase transition properties and drug release behavior of these copolymers were determined.

In the first part of this study, amphiphilic copolymers were synthesized in three different architecture by using ε-caprolactone (ε-CL), methoxy poly(ethylene glycol) (mPEG) and different amines and diacrylate compounds: triblock copolymers, methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(ε-caprolactone)-b-poly(β-aminoester) (mPEG-b-PCL-b-PBAE); graft copolymers, poly(β-aminoester)-g-poly(ε-caprolactone)-b-methoxy poly(ethylene glycol) (PBAE-g-PCL-b-mPEG) and star copolymers, poly(ethylene oxide) (PEO) coated 4 armed poly(ε-caprolactone)-b-poly(ε-caprolactone) (PEO coated 4YPCL-b-PBAE). The structures, average molecular weights and polydispersities of these amphiphilic copolymers were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Proton Nuclear Magnetic Resonance (^{1}H-NMR) and Gel Permeation Chromatography (GPC). Polymeric micelles were prepared by dialysis

method and critical micelle concentration of these micelles were determined by Fluorescence Spectrophotometer. The particle size, particle size distribution and charge of the micelles were measured by Dynamic Light Scattering (DLS) technique. The pH sensitivity of the copolymers was found by acid base titration method and the micelle morphology was characterized by Scanning Electron Microscope (SEM). In addition, surface characterization of PEO coated star copolymers were identified by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). The increase in ether (-CO-) signal in the C1s envelope proved that PEO chains effectively bind to the nanoparticle surface. The results obtained from characterization studies were showed that the amphiphilic copolymers were successfully synthesized and they were able to form micelles at low concentrations (0,001 to 0,068 mg/mL). The particle size measurements showed that the micelle size of block copolymers was 60 to 92 nm, the micelle size of graft copolymers was 95 to 121 nm and the micelle size of star copolymers was between 110 to 160 nm. Biodegradation behavior of the synthesized copolymers were performed in phosphate buffer solution at pH 7.4 and hydrolytic degradation of approximately 50% of the copolymers was observed within 2-3 days.

In the second stage, the sol-gel phase transition properties of the synthesized copolymers were analyzed. The copolymer solutions were prepared at certain concentrations and the gel forming properties were determined at different temperature and pH values by tube inverting method. It was observed that all the copolymers at a concentration of 25% can form a gel. By adjusting the length of each block, the conditions of copolymer solution for injection at room temperature and gel formation under physiological environment (37°C and pH 7.4) were detected.

In the last part of this study; an anticancer drug, etoposide that was poorly soluble in water and highly toxic when used directly was loaded to copolymers in two different ways. In the first way, etoposide at diffrent concentrations (5, 10, 15, 20 mg/mL) was encapsulated in the hydrophobic core of the polymeric micelles that self assembly in water with dialysis method. The second way was direct mixing of etoposide with copolymers and the drug effectively loaded to the polymeric carrier during gel formation. The drug loading efficiency of these carriers were determined by UV-VIS spectrophotometer and the optimum etoposide loading content was found to be 10 mg/mL. In vitro release studies of etoposide from polymeric micelles and nanoparticles were evaluated in three different phosphate buffer media: acidic pH (5.0 and 6.5) and physiological pH (7.4). In vitro release studies of etoposide from gels were evaluated in physiological pH. The drug release properties of these two different carriers were compared.

In conclusion; it was shown that etoposide can be administered orally to the body which is an efficient and easy release way when loaded polymeric micelles. Also, etoposide can be administered by injection because of the advantage of sol-gel phase transition of the copolymers.

Keywords: Amphiphilic copolymer, biodegradable, polymeric micelle, sol-gel phase transition, injectable gel, etoposide.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

İlaç salım sistemleri, bir terapötik maddenin vücuda alımını sağlayan ve ilacın vücutta salım hızı, zamanı ve yerini kontrol ederek verimliliğini ve güvenliğini arttıran sistemlerdir [1]. Kontrollü ilaç taşıma sistemlerinin geleneksel ilaç alım yöntemlerine tercih edilmesinin sebebi daha düşük dozların tedavi için yeterli olması, böylece ilaç yan etkilerinin azaltılması, hassas ilaç etken maddelerinin taşıyıcı bir maddeye yüklenmesiyle bozunmaya karşı korunması ve hatta ilacın belirli bir bölgeye hedeflendirilmesini sağlamasıdır. İyi tasarlanmış bir kontrollü salım sistemi taşıdığı etkin maddenin bir kısmını hemen salarak gerekli ilaç kan plazma düzeyini en kısa zamanda oluşturmalı ve daha sonra da bu kan seviyesini belli bir süre sürdürmelidir [2],[3],[4].

Modern dünyanın en büyük problemlerinden biri olan ve milyonlarca kişinin ölümüne sebep olan kanser, önemi giderek artan bir sağlık sorunudur ve dünya genelinde ölümlerin nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir [5]. Birçok antikanser ilaç mevcut olmasına ve çok sayıda yeni ilaçlar geliştirilmesine rağmen bu ilaçların sudaki çözünürlüğü vücuda verilebilmeleri için yeterli değildir. Ayrıca, kullanılan antikanser ilaçları kanserli hücreyi ayırt edici özelliğe sahip değildir ve yan etki olarak sağlıklı hücrelerin üzerinde de toksik etki göstermektedir. Bu doğrultuda, kanser hastalığında teşhis ve tedavi amaçlı kullanılmak üzere, antikanser

ilaçlarının uygun taşıyıcılar kullanılarak sudaki çözünürlüğünün arttırılması ve tümörlü hücrelere hedeflendirilebilmesi büyük önem kazanmıştır ve bu konuda yoğun araştırmalar yapılmaktadır [6], [7], [8]. İlaç taşıyıcı sistemlerdeki son gelişmeleri göz önüne alırsak, özgün ilaç taşıyıcı yaklaşımlar, akıllı nanoboyuttaki biyouyumlu taşıyıcıların kanser hücrelerine hedeflenmesine olanak sağlayarak ilaç molekülünü hedeflenen bölgeye güvenli bir şekilde taşıması yönündedir.

Suda çözünürlüğü zayıf olan ve direk alınmalarında toksik etki yaratan ilaçların vücuda verilebilmesi için lipozomlar, niozomlar, mikrotanecikler, nanotanecikler ve nanoemülsiyonlar gibi çeşitli ilaç salım ve hedefleme sistemleri geliştirilmiştir [9], [10]. Bunların arasında özellikle polimerik ilaç tasıyıcı sistemler, ilaç dağılım süresini uzatmak, ilacın çözünürlüğünü arttırmak ve farmasötik moleküllerin taşınma özelliklerini geliştirmesi açısından gelecek vaad eden sistemler olarak ilgi çekmektedir [10]. Yapısal kararlılıkları, toksisitelerinin düşük ve ilaç taşıma kapasitelerinin yüksek olması, küçük boyutta olmaları ve suda çözünürlükleri sebebiyle amfifilik blok kopolimerlerden hazırlanan polimerik miseller ilaç taşıyıcı sistemlerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadırlar [11]. Amfifilik kopolimerler hidrofilik ve hidrofobik bloklarının çözünürlük farkı sebebi ile su içerisinde herhangi bir dış etken olmaksızın *çekirdek-kabuk* yapısında misel adı verilen nano boyutlu tanecikler oluşturmaktadır. *Çekirdek* denilen iç kısım, hidrofobik yapıdadır ve hidrofobik-hidrofobik etkileşimler sonucu suda iyi çözünemeyen ilaçların çözünürlüğünü arttırmaktadır. *Kabuk* denilen dış kısım ise, hidrofilik yapıdadır ve ilacın kan dolaşımında kalış süresinin uzatılmasında rol oynamaktadır [12]. Hidrofobik özellikteki ilaçların çözünürlüğünü arttırmaları ve nano boyutta hazırlanabilmeleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemler olarak büyük avantaj sağlayan polimerik miseller, AB tipi diblok kopolimerlerden, ABA, BAB veya ABC (C: hidrofilik/hidrofobik polimer) tipi triblok kopolimerlerden, graft kopolimerlerden veya yıldız şekilli kopolimerlerden hazırlanabilirler [13], [14].

Amfifilik blok kopolimerlerin su içindeki çözeltileri düşük konsantrasyonlarda yukarıda bahsedildiği gibi misel oluştururken, belirli bir konsantrasyonun üzerinde dış faktörlerin

etkisi ile sol halden jel hale geçiş gösterirler. Bu geçiş sırasında küçük kümeler halinde bir araya gelen miseller birbirlerine bağlanarak büyük kümeler ve en sonunda üç boyutlu bir ağ yapı oluşturarak jelleşirler [15]. Sol-jel faz geçiş özelliğine sahip bu sistemlerde ana hedef polimerik yapının oda sıcaklığında çözelti yani sıvı halde bulunması, vücuda enjekte edildiğinde ise çok kısa sürede yarı katı jel haline dönüşmesidir. Sıcaklık ve pH değişimi ile sol-jel faz geçişi gösterebilen bu amfifilik kopolimerler enjekte edilebilir ilaç taşıma sitemlerinde kullanılırlar [16].

Kontrollü salım sistemlerinde kullanılacak ilaç taşıyıcı polimerlerin biyolojik çevreyle iyi uyuşması, kimyasal olarak inert olması, dokuyla temas ettiğinden iltihaba yol açmaması, kanserojen etki göstermemesi ve toksik olmaması gerekir [17]. Bu sistemlerde hem taşıyıcı olarak, hem de sistemden salım hızını kontrol etmek üzere yaygın olarak kullanılan polimerler arasında poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve poli(ε-kaprolakton) (PCL) gibi poliesterler, poli(etilen glikol) ve yapıya pH duyarlı özellik kazandıran poli(β-amino ester)ler yer alır [18], [19], [20]. Bu polimerlerin istenilen bozunma hızında sentezlenebilmeleri, bozunması sonucu oluşan ürünlerin toksik etki yaratmaması ve istenilen mekanik dayanımda üretilebilmeleri önemli avantajları arasında yer alır. İlaç taşıyıcı sistemlerden istenilen özellikleri bir tek polimerin sağlaması mümkün olmayacağından birden fazla polimerin aynı sistem içerisinde kullanılması gerekir.

Bu tez çalışmasında; toksik olmayan, FDA onaylı, biyouyumlu ve biyobozunabilir polimerlerden hidrofobik özellikteki PCL, hidrofilik özellikteki mPEG ve pH duyarlı çeşitli PBAE grupları kullanılarak amfifilik kopolimerler hazırlandı. Misellerin hidrofilik kabuk kısmını oluşturan mPEG suda çözünürlüğü çok yüksek olan biyouyumlu bir polimerdir. Bu özelliğinden dolayı, nanotaşıyıcı sistemler için yüzey biyouyumluluğunu arttırmak için sterik bir koruyucu olarak kullanılır ve böylelikle protein adsorpsiyonu, pıhtılaşma gibi vücut reaksiyonlarını en aza indirger. Ayrıca, çeşitli hidrofobik bloklarla kolayca konjuge edilebilmesi de yaygın olarak kullanılma nedenlerinden biridir [21]. PCL, özellikle düşük camsı geçiş sıcaklığı ve yüksek geçirgenlik özelliği nedeniyle kontrollü

ilaç salım sistemlerinde kullanımı tercih edilen bir biyopolimerdir. Oldukça hidrofobik bir polimer olan PCL, suda çözünmediği için vücutta yavaş bozunur ve ilacın uzun süre misellerde hapsolmasını sağlar. Yapısında bulunan ester bağları nedeniyle hidrolitik olarak parçalanabilmesinden dolayı biyobozunur bir polimer olarak değerlendirilir [22].

Etkili bir ilaç salım sisteminde kullanılmak üzere, nötral ortamda yani kan pH'ında (pH 7,4) bozunmayan taşıdığı bütün ilaç yükünü sadece zayıf asidik kanserli doku ortamında bırakabilen bir polimerik yapı tasarlamak önemlidir. Bu sebeple kopolimerler hazırlanırken yapıya ortamın pH'sına duyarlı olan bir amin ve diakrilat bileşiği kullanılarak elde edilen PBAE grupları katılır. Bu polimer yapısında bulunan tersiyer amin gruplarından dolayı bazik bir karaktere sahiptir ve yüksek pH'ta tersiyer amin grubunun deiyonizasyonundan dolayı vücuttaki kan akışında yapının bozulmadan sürekliliğini sağlarken, düşük pH'ta tersiyer amin grubunun iyonizasyonundan dolayı pozitif yüklü hale gelerek içerisinde taşıdığı ilacın salınmasına neden olur. Ayrıca, PBAE hidrolitik olarak parçalanabilen ester gruplarından dolayı biyobozunur bir polikatyondur [23], [24].

Akciğer kanseri başta olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinen etoposid önemli bir antikanser ilacı olup, bu tez çalışmasında model ilaç olarak kullanıldı [25]. Bu ilacın kullanılacağı kanser hücresine hedefli etkin bir sistem tasarlamak için, polimerik taşıyıcının kimyasal yapısının yanı sıra, kanserli hücreyi tespit edebilme, vücudun diğer kısımlarına göre hasta dokunun daha yüksek olan sıcaklık ve daha düşük olan pH duyarlılığı gibi kriterlerin de göz önüne alınması gerekir. Bu ilacı sorunsuz bir şekilde hedeflenen dokulara taşıyabilecek en dayanıklı misel ve jel yapısını oluşturmak için seçilen hidrofobik ve hidrofilik polimer bloklarının optimum uzunluğu ve hazırlanan pH duyarlı PBAE gruplarından hangisinin daha etkili olduğu belirlenerek bu taşıyıcılara fiziksel olarak yüklenen etoposidin salım profili incelendi.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, kontrollü ilaç salım uygulamalarında kullanılabilecek biyouyumlu ve biyobozunur özellikte, uyarıya duyarlı nanoboyutta polimerik taşıyıcıların tasarlanması ve hazırlanması hedeflendi. Bu amaçla, biyouyumlu ve hidrofilik özellikteki mPEG, biyobozunur ve hidrofobik özellikteki PCL ve pH duyarlı farklı PBAE grupları kullanılarak triblok, graft ve yıldız yapıda olmak üzere üç farklı amfifilik kopolimerin sentezlenerek karakterize edilmesi, bu kopolimerlerin misel oluşturabilme özelliklerinin ve sol-jel faz geçiş özelliklerinin belirlenmesi düşünüldü. Çalışmamızda, etkin madde olarak oral biyoyararlanımı düşük olan ve oldukça hidrofobik bir antikanser ilacı olan etoposid kullanılması amaçlanmış ve hazırlanan misel ve jel sistemlerinin bu ilacı yükleme etkinliği ve in-vitro ortamda yüklenen ilacı salım kinetiğinin incelenmesi planlandı.

Bu bağlamda; bu tez metninin başlangıç bölümlerinde (Bölüm 1-2) kontrollü ilaç salım sistemleri, polimerik miseller, sol-jel faz geçişi ve etoposid hakkında genel bilgiler derlendi. Daha sonraki bölümlerde (Bölüm 3-4) ise amfifilik blok kopolimerlerin sentezi ve elde edilen deneysel sonuçlar ayrıntılı olarak açıklandı, değerlendirildi ve tartışıldı.

1.3 Hipotez

Sıcaklık ve pH duyarlı, biyobozunur polimerik misellerin hazırlanmasında kullanılan amfifilik blok kopolimerlerin ayrıca fizyolojik koşullarda jel oluşturabilmeleri bu taşıyıcıların hem oral kontrollü ilaç salımında hem de enjekte edilebilir sistemler olarak kullanılmalarına olanak sağlar. Bu çalışmada ilk olarak, üç farklı yapıda amfifilik kopolimer sentezlendi ve yapılarının aydınlatılmasına yönelik karakterizasyonlar yapıldı. Bir sonraki aşamada ise; sentezlenen bu kopolimerlerin fizyolojik koşullardaki sol-jel faz geçiş davranışları incelenerek enjekte edilebilir bir sistem olarak kullanılabilme potansiyelleri belirlendi. Tezin son kısmında; etoposidin polimerik misellere ve jellere yüklenme kapasitesi araştırıldı ve bu taşıyıcılardan in vitro salım çalışmaları yapıldı. Daha sonra yüklenen ilaçların salım sonuçları karşılaştırılarak bu

kopolimerlerin iki farklı taşıyıcı olarak kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması düşünüldü.

Yapılan çalışmada farklı tipteki biyouyumlu ve biyobozunur polimerik taşıyıcılar ilaç salımındaki etkinlikleri yönünden bir taramaya tabi tutuldu. Bu çalışma ile suda çözünmeyen, toksik olan ve çoğunlukla akciğer kanseri tedavisinde yaygın kullanımı olan etoposid için yeni polimerik taşıyıcıların geliştirilmesi ve kullanımlarına yönelik temel çalışmaların yapılması ve literatüre kazandırılması hedeflendi.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ

2.1 Kontrollü Salım Sistemleri

Uzun yıllar ilaç alanındaki çalışmaların başlıca amacı, çeşitli hasatlıkları tedavi edici yeni moleküllerin geliştirilmesi üzerine olmuştur. Ancak yeni bir ilacın geliştirilmesi ve patentinin alınması 10 yıldan daha uzun süren araştırma ve geliştirme faaliyetlerini gerektirir. Bu uzun sürecin ekonomik yükü ve her zaman beklenilen sonucu vermemesi, araştırmacıları yeni ilaç geliştirmek yerine var olan ilaçların kullanım ömrünü ve etkinliğini uzatmaya yöneltmiştir. Biyomedikal olarak ilaç alanındaki çalışmaların asıl hedefi; ilaç dozunu minimuma indirmek, dozlama aralığını uzatmak, hastanın yan ve zararlı etkilerden etkilenmemesini sağlayarak yaşam kalitesini arttırmak olmuştur. Bu beklentilere en iyi yanıt veren sistemler kontrollü salım sistemleridir [1].

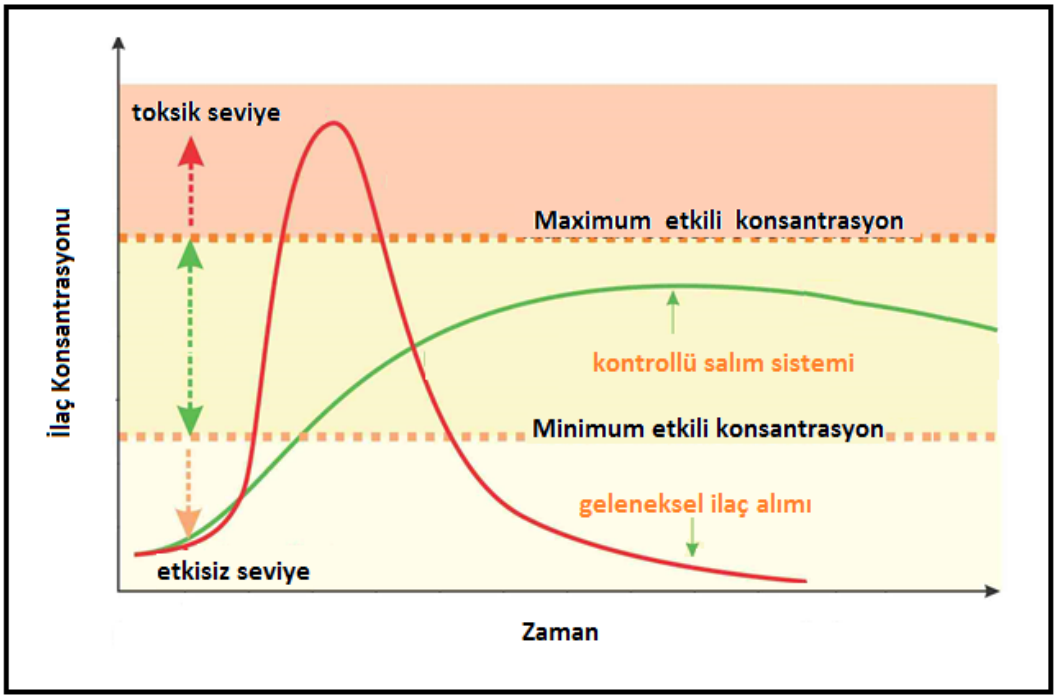
Kontrollü salım sistemleri etkin maddenin bölgesel olarak istenilen oranlarda ve önceden belirlenmiş zaman aralıklarında salım yapmasını sağlar [3]. Bu sistemlerin temel hedefi etkin maddenin istenilen oranlarda salımını sağlayarak kan plazma konsantrasyonundaki etkin madde miktarını sabit tutmaktır.

Her ilacın minimum ve maksimum kan konsantrasyonu aralığını tanımlayan terapötik aralık denilen bir değeri vardır. İlaç maksimum kan konsantrasyonu üzerinde toksik etki gösterirken, minimum kan konsantrasyonu altında ise tedavi edici özelliği yetersiz olmaktadır. Kan düzeyleri bu aralık içinde kaldığı sürece tutarlı ve yararlı bir tedavi söz konusudur [3]. Geleneksel ilaç salım şekillerinde etkin madde aniden salınarak kısa

zamanda maksimum kan konsantrasyonu düzeyine ulaşılır ve ardından hemen plazma düzeyi düşmeye başlar (Şekil 2.1). Düzenli bir dozlama aralığı ile, ilacın uygulaması sırasında sürekli olarak terapötik aralıkta kalması sağlanmaya çalışılır. İlaç alımını takiben kandaki ilaç konsantrasyonu başlangıçta bir süre artar ve bu süreyi ilacın sisteme yararlı hale gelme hızı belirler. Daha sonra çok kısa bir süre sabit kalarak hızla azalır. Konsantrasyonun düşme süresi, ilacın metabolize edilme, parçalanma ya da etki alanından uzaklaşma gibi yollarla sistem için yararsız hale gelme hızına bağlıdır. İlacın kan plazmasındaki konsantrasyonu etkin düzeyin altına düşebilir veya güvenilir düzeyin (toksik sınır) üstüne çıkabilir [26]. Etkin düzeyin altındaki ve güvenilir düzeyin üstündeki bölgeler boşa harcanmış ilaç miktarını ifade eder. Ayrıca, ilaç konsantrasyonunun etkili düzeyin altına düşmesi veya toksik düzeyin üstüne çıkması hasta için istenmeyen durumlar yaratabilir.

İlaç molekülünün yavaş ve sabit bir hızla vücuda verilmesini sağlayan kontrollü salım sistemleri ise ilaç konsantrasyonunu kanda sabit tutarak etkinin uzun süre devamını sağlarlar. Böylece klasik yöntemlerle söz konusu olan doz aşımı ya da yetersizliği gibi istenmeyen sonuçlar büyük ölçüde önlenir. Kontrollü salım sistemleri, organizma için gerekli olan ilacın salım hızını kontrol ederek hedef hücreye ulaştıran sistemlerdir. Geleneksel tedavi yöntemlerinde, ilaç, hormon veya proteinin plazmada etkili dozda tutulabilmesi için ilgili maddenin sıklıkla alınması gerekmektedir. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan ilacın plazma içerisindeki derişiminin istenilen süre kadar sabit kalması sağlanmakta ve sürekli ilaç, hormon veya protein alma gereksinimi ortadan kalkmaktadır[27].

Klasik dozaj şekilleri ilacı hemen salarak, kısa zamanda maksimum plazma düzeyi sağlamakta ve bunu takiben plazma düzeyi hızla düşmeye başlamaktadır ve bu durumda kan plazma konsantrasyonu sabit kalmaz. Değişmeyen ilaç kan seviyeleri için; ilacın kana geçme hızının kandan uzaklaşma hızına eşit olması gerekir, bundan dolayı kontrollü salım sistemleri ile sabit kan plazma konsantrasyonu elde edilebilir [4].



Şekil 2. 1 İlaç-plazma konsantrasyonunun zamanla değişimi

Geleneksel ilaç salım şekillerinde ilaç salım hızının yavaşlatılması sorununun giderilmesi yönünde çeşitli çalışmalar yapılmış ve kullanılan sistemler şu şekilde sınıflandırılmıştır. Şekil 2.2'de çesitli salım şekillerinin plazma konsantrasyonu-zaman grafikleri verilmiştir.

Sürekli etkili salım yapan sistemler: İlaç molekülünün kan plazma ve doku düzeyini aynı yolla verilen klasik dozaj formuna göre çok daha uzun süre sabit hızla devam ettirebilen sistemlerdir. Ancak sistem bulunduğu ortam şartlarından etkilenebildiği için salım mekanizmasını önceden belirlemek güçtür [3].

Modifiye salım yapan sistemler: Aynı yolla uygulanan klasik dozaj formlarından farklı yer veya hızda etkin madde salımı sağlayan sistemlerdir. Uzatılmış etkili ve geciktirilmiş etkili salım yapan ilaç şekilleri, modifiye salım yapan ilaç şekillerine dâhil edilmektedir.

Uzatılmış etkili salım yapan sistemler: Aynı yolla uygulanan klasik dozaj formlarına göre ilacı daha uzun sürede ve daha yavaş organizmaya veren ilaç şekilleridir [28]. Ancak salım hızı giderek düşer.

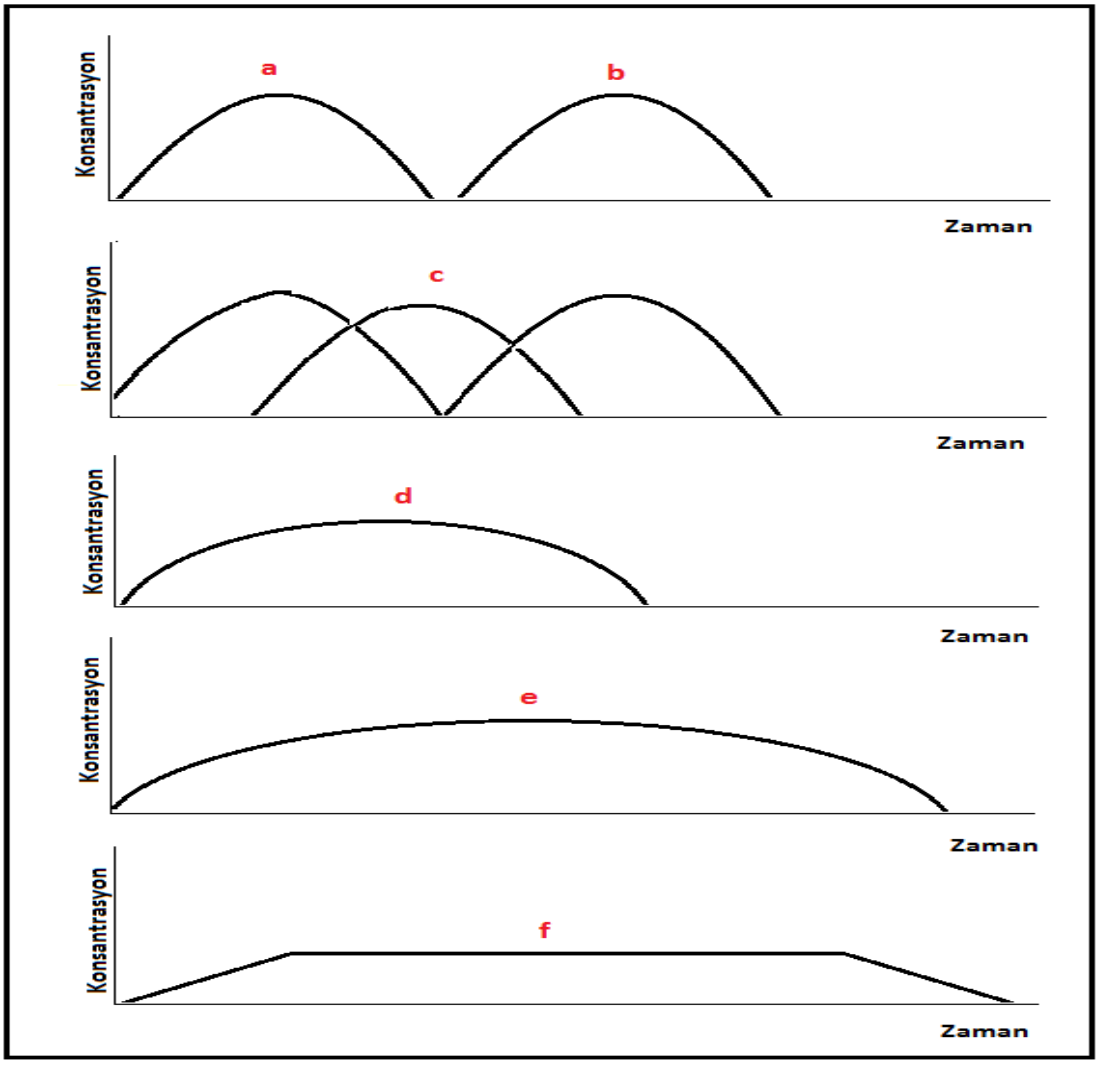
Geciktirilmiş etkili salım yapan sistemler: İlaç molekülünün sistemden salımını belli bir bölgede sağlayan sistemlerdir. Genellikle ilacı mide sıvısından korumak için bağırsakta salım yapabilen tabletler veya ürünler için kullanılmaktadır [28].

Tekrarlanan doz içeren sistemler: Dozaj formu içinde ilacın birden fazla dozunun mevcut olduğu ve bu dozların belli zaman aralıkları ile salımının sağlandığı sistemlerdir [28].

Kontrollü salım yapan sistemler: İdeal olarak istenen farmakolojik etkiyi mümkün olduğu kadar hızlı bir şekilde oluşturmak üzere ilacı yavaş ve sabit hızla vücuda vererek etkinin uzun süre devamını sağlayan sistemlerdir. Salım hızlarının önceden planlanabilmesi sürekli etkili sistemlerden farkını gösterir.

İyi tasarlanmış bir kontrollü salım sistemi taşıdığı ilacın bir kısmını hemen salarak gerekli kan düzeyini en kısa zamanda oluşturmalı ve daha sonra da bu kan seviyesini belirli bir süre sürdürmelidir. Bundan dolayı dozaj şekli, yükleme dozu ve sürdürme dozu olmak üzere iki kısımdan oluşur. İlacın tümünün taşıyıcı sistemden bırakılması için geçen süre yüklenen ilaç miktarına, kullanılan polimerin biyobozunma süresine ve çevresel şartlara (pH, sıcaklık, bulunulan ortamın bileşenlerine) bağlıdır. Dozlama aralığı, ilaç molekülünün modifiye edilerek eliminasyon hızının azaltılmasıyla veya taşıyıcıdan ilaç salımının modifiye edilerek absorbsiyonunun uzatılması ile arttırılabilmektedir. İlacın etkisini lokalize etmek için, kontrollü salım sağlayan sistem hastalıklı dokuya yerleştirilebilmeli ve uygun taşıyıcıların kullanımı ile etkin madde hedef bölgelere ulaştırılabilmelidir. Bu sistemlerde ilaç, aktif hedeflendirme ve pasif hedeflendirme olmak üzere iki farklı yolla ortama bırakılır. Pasif hedeflendirmede ilacın kan akış hızına bağlı olarak istenen bölgeye taşınması amaçlanmaktadır. Ancak, ilaç istenilen kan konsantrasyonuna ulaşmadan ortama bırakılabilir ya da hedeflenen bölgenin dışında bir yerde salınarak istenmeyen yan reaksiyonların oluşmasına sebep olabilir. Aktif hedeflendirmede ise taşıyıcı moleküle spesifik ligandlar gibi hedef uçlar takılarak ilacın istenen bölgeye bırakılması hedeflenmektedir. İdeal ilaç tedavisinde,

ilacın hedef dokuya doğrudan, istenen süre ve konsantrasyonda etki etmesi istenirken diğer sistemler üzerine olan yan etkilerinin de minimum olması amaçlanır [30].



Şekil 2. 2 Çeşitli ilaç salım şekilleri a)anında salım, b) geciktirilmiş salım, c) tekrarlanan salım, d) uzatılmış etkili salım, e) sürekli salım f) kontrollü salım [29]

Kontrollü salım işlemi, genellikle polimerik bir malzemeden hazırlanan taşıyıcı yapıya biyoaktif molekülün yüklenmesi ve yüklenen ajanın zamanla ortama bırakılması ilkesine dayanır. İlaç bir polimere ya da bir lipide bağlandığında veya enkapsüle edildiğinde, ilaç güvenliği ve ilacın istenilen etkinliği sağlayabilme yeteneği büyük oranda arttırılabilir ve yeni tedaviler mümkün olur. İlaç salımı, dozaj formu içerisinde kullanılan polimerin

özellikleri ile bağlantılıdır. Bu nedenle kullanılacak olan polimerin özelliklerinin, formülasyona uygunluğunun ayrıntılı olarak tetkik edilmesi gerekmektedir.

2.1.1 Kontrollü Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

Kontrollü salım yapan sistemler, uygulama alanları ve ilaç salımını kontrol eden mekanizma göz önüne alınarak iki grup altında sınıflandırılabilir.

2.1.1.1 Uygulama Yerine Göre Kontrollü Salım Sistemleri

Bu sistemlerde ilacın özelliklerine göre vücuda veriliş yolu seçilerek ilacın ve taşıyıcı sistemin tasarımı yapılır (Çizelge 2.1). İlaç molekülü oral, nazal, bukal, oküler, rektal, transdermal, enjeksiyon gibi değişik yollarla vücuda verilir. Her kullanılış yolunun kendine ait avantaj ve sakıncaları vardır. Kontrollü salım sistemi hazırlanırken çeşitli sistem alternatiflerinin hangisinin seçileceğine, ilacın özellikleri, dozu, amaç ve fizyolojik faktörler beraber değerlendirilerek karar verilir. İlacın metabolizmasını ve farmakokinetiğini önceden bilmek en ideal şekildir. Örneğin, proteinler ısı, ışık ve nem gibi dış etkenlerle enzim ve pH gibi biyolojik çevre koşullarından çok fazla etkilendiklerinden, enjeksiyon yoluyla doğrudan kan dolaşımına verilirler. Ancak, oral yolla ilaç verilmesi en çok tercih edilen yöntemdir ve ilacın mide bağırsak kanalında kontrollü olarak salınması istenir [3].

2.1.1.2 İlaç Salım Mekanizmasına Göre Kontrollü Salım Sistemleri

Kontrollü salım sistemlerinden ilaç molekülünün salımı için dört genel mekanizma vardır.

- İlaçların sistemden difüzyonu.
- Kimyasal ya da enzimatik bir reaksiyonla sistemin bozulmasını takiben ilaç salımı ya da ilaç molekülünün sistemden kopması.
- Sistemin şişmesi ya da ozmoz yoluyla çözücü hareketlenmesi.
- Fizyolojik bir gereksinime cevap olarak salımın gerçekleşmesidir.

Ayrıca bu mekanizmaların kombinasyonu da mümkündür. Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin ilaç salım hızı kullanılan polimere ve sistemin tasarımına bağlı olarak değişir ve en üst düzeyde verim almak için en uygun sistem seçilmelidir. Difüzyon kontrollü salımda membran sistemleri sabite yakın bir hızda salım gösterirken matris sistemlerin üretimi ucuzdur. Kimyasal kontrollü sistemlerde salım hızı polimerin bozunmasına bağlı olarak değişirken çözücü aktivasyonlu sistemlerde ise ilaç salım hızı ortamın pH'ı ile ilişkilidir.

Çizelge 2. 1 Kontrollü salım sistemlerinin uygulama yollarına göre sınıflandırılması

YÖNTEM	**UYGULAMA YERİ**
Enjeksiyon	Kas, damar ve karın zarı içine iğne ile
Oral yol	Ağızdan yutma şeklinde
Oküler yol	Gözün korneası üzerine veya kenar boşluklarına sürme veya yerleştirme yoluyla
Nazal yol	Burun mukozasına yapıştırma yoluyla
Bukal yol	Ağız içi mukozasına yapıştırma yoluyla
Pulmoner yol	Akciğerlere ağız veya burundan püskürtme yoluyla
Vajinal yol	Vajina veya rahim içine uygulama
Kolon yolu	Kalın bağırsağa ağız veya anüs yolu ile uygulama
Rektal yol	Kalın bağırsağın en alt bölgesine uygulama
Transdermal yol	Göğüs, kol ve kulak arkası derisi üzerine yapıştırma yolu ile uygulama
İmplant	Beyin, kemik ve derialtı gibi dokulara cerrahi yoldan uygulama

2.1.1.2.1 Difüzyon Kontrollü Salım

En yaygın kullanılan salım mekanizmasıdır. Salım hızı, ilacın konsantrasyonunun yüksek olduğu suda çözünmeyen bir polimerden düşük olan ortama doğru difüzyonuyla kontrol edilir. Membran sistemi ve matris sistemi olmak üzere iki tip difüzyon sistemi vardır. Her iki sistemde de salım, polimer filmin degradasyonuna ve ortamın derişimine bağlı olarak ilacın ortama bırakılmasıyla gerçekleşir.

Membran sisteminde ilaç molekülünü içeren çekirdeğin etrafı polimerik bir film yani membran ile kaplanmıştır. Membran suda çözünen özellikte, gözeneksiz veya mikrogözenekli olabilir. Membranın içinde dağıtılan etkin madde, salım sırasında sistemi çevreleyen ortama difüze olur. Kontrollü salım sağlayan membrandan difüzyonla etkin madde salımının kontrol edildiği bu sistemlerde ilaç salım hızı membranın kalınlığı ve polimerin yapısına bağlı olarak değişir [28]. İlacın membran yüzeyinden uzaklaştırılması yavaş olup, ilaç konsantrasyonu zamanla membran yüzeyinde artar. Bu sistemler vücut içerisine yerleştirilerek ya da transdermal olarak kullanılabilirler. Ancak bu sistemlerin sakıncaları da vardır. Örneğin bu sistemler genellikle vücutta parçalanmaz, dolayısıyla kullanımlarından sonra cerrahi işlemle uzaklaştırılmaları gerekir. Ayrıca membranda oluşabilecek çatlak veya yırtılmalar, ilacın yerel olarak aşırı yüklenmesine neden olur.

Matris sisteminde ise ilaç çözünmeyen bir polimerin oluşturduğu yapı içinde çözünmüş veya dağılmış halde bulunur ve ilaç buradan basit difüzyon ile salınır. Matrisi çevreleyen sıvı, porlardan ve granüller arası boşluklardan içeri geçerek ilacı çözer ve çözünen ilaç difüzyonla matrisin dışına salınır. Matrisin yüzeye yakın kısmından ilaç salımı kolayca olurken, derin tabakalarındaki molekülün çıkması çok daha uzun zaman alır ve dolayısı ile salım hızı düşer. İlacın salımı için kat ettiği difüzyon mesafesi birbirinden farklı olduğundan sabit salım hızı elde edilemez [28].

2.1.1.2.2 Kimyasal Kontrollü Salım

Kimyasal kontrollü salım, ilaç salımı sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyona bağlı olarak vücutta aşınan sistemler ve polimer zincirine takılı sistemler olmak üzere sınıflandırılabilirler.

Vücutta aşınan sistemler de ilaç, matris sistemlerinde olduğu gibi polimer içinde dağıtılmıştır. Ancak matris sistemlerde salım süresince polimer değişmeden kalıp ilaç difüzyon ile salınırken, vücutta aşınan sistemlerde polimer zamanla aşınmaya uğrar ve ilaç salınır. İdeal durumda, ilacın salımını kontrol eden değişken yalnızca yüzey aşınmasıdır. Bu sistemlerde taşıyıcı olarak kullanılan suda çözünmeyen polimerler, hidroliz, iyonlaşma veya ana zincirlere bağlı yan grupların protonlanmasıyla çözünür veya ana zincirin kopmasıyla suda çözünen küçük moleküllere dönüşürler. Suda çözünen polimerler ise, polimer matriste ana zincirleri birbirine bağlayan çapraz bağların kopmasıyla çözünür hale geçer. Bu sistemde taşıyıcı polimer aşınmaya uğrayarak vücut tarafından adsorbe edildiğinden bu tür implantların kullanımında cerrahi işlem gerekmez. Ancak, parçalanma ürünlerinin toksik, immunojenik veya kanser yapıcı olabileceği göz önünde tutulmalıdır.

İlaç molekülünün polimer zincirine kimyasal olarak bağlı olduğu sistemlerde, polimer ile salınacak ilaç arasında gerçekleşen tersinir veya tersinmez reaksiyonların sonucunda hidrolitik veya enzimatik yolla polimer zinciri parçalanır ve ilaç salınır [29]. Zincire takılı sistemlerin en basit şeklinde ilaç bir polimer zincirine takılır. Suda çözünen polimerler genellikle hücrelere hedefleme gibi taşıyıcı amaçlı, çözünmeyen polimerler ise daha uzun süreli uygulamalar için hazırlanan kontrollü salım yapan implantlarda kullanılır. Bu sistemlerde ilaç molekülü polimer zincirine doğrudan takılabileceği gibi, salım hızını ve hidrofilik özelliğini ayarlamak için bir ara grup üzerinden de bağlanabilir. Bu tür polimer-ilaç bileşimleri zehirlenmeyi azaltmak, tedavi etkinliğini arttırmak veya ilacı belirli bir hücre veya organa hedeflemek amacıyla birkaç saat gibi kısa süreli uygulamalarda kullanılmaktadır.

Zincire takılı sistemlerin diğer kontrollü salım sistemlerine göre en önemli üstünlüğü, sistemin ağırlıkça %80'inin ilaç olmasıdır. Geleneksel birçok taşıyıcı sistemde yapının ağırlıkça %70-90'ının taşıyıcı polimer olduğu göz önünde tutulursa, bunun ekonomik yönden önemli bir üstünlük olduğu görülür.

2.1.1.2.3 Çözücü Kontrollü Salım

Çözücü ortamın, şişme ya da ozmoz etkisiyle kontrollü salım yapmasıdır. Şişme kontrollü salım mekanizmasında etken madde bir polimer çözeltisinde çözülür veya dağıtılır. Dıştaki polimerik yapının ortam sıvısına maruz kalmasıyla polimer şişer ve polimer zincirleriyle çevrili olan ilacın dışarı difüze olmasını sağlar.

Ozmotik kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde, ilaç salımı ozmotik basınçla aktive edilmektedir. İlaç suyun geçirgenliğini kontrol eden yarı-geçirgen bir membranla çevrilmiştir ve genellikle konsantrasyonu doygunluk sınırının üstündedir ve ozmotik işlemi yürüten bir tuz içerebilir. İlaç-polimer sistemi su veya biyolojik sıvı ile temas ettiğinde, su yarı geçirgen membranın gözeneklerinden içeri girerek ilacı çözmeye başlar ve bir ozmotik basınç oluşur. Ozmotik basınç farkı kontrol altında tutularak salım hızı kontrol edilir. Ozmotik sistemlerde birden fazla ilaç molekülü bulunabilir ve bunlar farklı hızlarla salınabilir [30].

2.1.1.2.4 Dış Etkilere Bağlı Salım

pH, sıcaklık, sistemin bulunduğu ortamın türü ve ortamdaki ilaç molekülleri gibi ortam koşulları değiştirilerek veya dışarıdan manyetik alan ve ultrasonik titreşim uygulanarak ilaç taşıyan polimer yapının şişme-büzülme davranışları değiştirilebilir ve ilaç salımı kontrol edilebilir. Örneğin, manyetik tanecikler içeren taşıyıcı polimer vücut sıvısına maruz bırakıldığında manyetik ortamın da etkisi ile şişer ve difüzyon sisteminden daha hızlı ilaç salımı gerçekleşir. Ayrıca, ilaç salımının başlatılması için ultrasonik dalgaların veya elektrik enerjisinin kullanıldığı uyarıcı sistemler de kullanılır.

2.1.2 Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Taşıyıcılar

Kontrollü salım sistemlerinde kullanılacak polimerlerin biyolojik çevreyle uyumlu olması, kimyasal olarak inert olması, dokuyla temas ettiğinden iltihaba yol açmaması, kanserojen etki göstermemesi ve toksik olmaması gerekir. Aynı zamanda en az düzeyde aşınma göstermeli ve kolayca işlenebilir olmalıdır.

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde hem taşıyıcı olarak, hem de sistemden salım hızını kontrol etmek üzere en yaygın olarak kullanılan maddeler doğal ve sentetik polimerlerdir. Doğal polimerler, biyomalzeme alanının vazgeçilmez kaynaklarıdır ve biyolojik ortamdaki makromoleküllerin benzeri veya aynısı olduklarından, canlı vücuduyla temas ettiklerinde toksik etki, iltihaplanma gibi istenmeyen reaksiyonlar vermezler. Doğal polimerler; biyolojik olarak parçalanabilir olmaları, metabolize edilebilmeleri, kararlılıkları, molekül ağırlığı dağılımlarının kontrol edilebilir olması ve suda çözünen ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesi vermeleri nedenleriyle tercih edilirler. Ancak, elde edildikleri kaynağa bağlı olarak bileşimlerinin değişmesi, yüksek sıcaklıklarda bozunmaları ve bu nedenle şekillendirilmelerindeki güçlük ve tüm bunların ötesinde immünojenik olmaları (bağışıklık tepkisine yol açmaları) önemli dezavantajlarıdır [31].

Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan doğal biyomalzemelere protein yapısına sahip albumin, jelatin, kollajen, gluten, kazein; şeker yapısına sahip aljinat, dekstran, kitin, kitosan, nişasta, selüloz, pektin; lipid yapıya sahip stearik asit, etil stearat ve nükleotid yapıya sahip plazmit DNA örnek olarak verilebilir. Bu doğal polimerler biyolojik olarak bozunabilirler, toksik değildirler ve maliyetleri oldukça düşüktür.

Bu nedenle çeşitli farmasotik uygulamalarda geniş çapta kullanılmalarına rağmen birçok farmasotik uygulamada, bu polimerler ve sağladığı özellikler yetersiz kalmaktadır. Bu doğrultuda doğal polimerlerin kimyasal modifikasyonu öngörülmüş ancak bu sistemin de yetersiz kalması üzerine (karboksimetilselüloz gibi selüloz türevleri) sentetik polimerler geliştirilmiştir. Sentetik polimerlerin istenilen özelliklere

göre sentezlenebilmeleri, hazırlama ve saklama süresince dayanıklı olmaları ve yüksek saflıkta üretilebilmeleri gibi üstünlükleri vardır [32].

Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan sentetik polimerler biyobozunur olanlar ve biyobozunur olmayanlar olarak iki başlık altında toplanabilir.

2.1.2.1 Biyobozunur polimerler

Doğal olarak var olan mikroorganizmalar, bakteriler, mantar ve algler tarafından bozunmaya uğrayabilen polimerlere biyobozunur polimerler denir [22]. Biyolojik olarak parçalanan polimerler suda çözünmezler fakat biyolojik sıvılarla temas edince kimyasal ve fiziksel değişime uğrarlar. Bu polimerlerin çoğu kararsızdır ve kolaylıkla hidroliz olabilen fonksiyonel gruplar (ester, amid vb.) içerirler. Biyobozunur bir polimerden oluşan ilaç taşıyıcı sistem fizyolojik bir ortama yerleştirildiği zaman, su taşıyıcının içine difüzlenir ve polimer zincirlerini hidrolize ederek parçalar. Parçalanma ürünleri taşıyıcının yüzeyinden difüzyon yolu ile uzaklaşır. Kararsız hidrolitik bağlar ile su geçirgenliği ve çözünürlük gibi özellikler temel olarak hidrolitik olarak bozunma hızını belirlemekte ve yığın hidroliz veya yüzey erozyonu oluşmaktadır. Eğer suyun polimer içerisine girme hızı polimerin hidroliz hızından büyükse yığın parçalanma oluşur. Polimerin hidroliz hızı suyun difüzyon hızından büyükse polimer yüzey erozyonu ile parçalanır. Biyobozunur polimerlerin sahip olması gereken başlıca özellikler aşağıdaki gibi özetlenebilir [33]:

- Polimer vücuda uygulandıktan sonra iltihap oluşturmamalı ve toksik etki göstermemelidir.
- Polimerin bozunma süresi, dokunun iyileşme ve yenilenme süresi ile uyum sağlamalıdır.
- Bozunma ürünleri toksik olmamalı, metabolize edilebilmeli ve vücuttan kolayca atılmalıdır.
- Polimer uygulama alanına göre istenen şekli alabilmeli ve uygun geçirgenlikte olmalıdır.

Biyobozunur polimerler, bozunma türüne bağlı olarak ***"hidrolitik olarak bozunan polimerler"*** ve ***"enzimatik olarak bozunan polimerler"*** olarak ikiye ayrılır [31]. Polimerik biyomalzemelerin biyobozunmaları polimer zinciri üzerinde bulunan bazı bağların hidrolitik ya da enzimatik olarak kırılarak polimerin parçalanması olarak tanımlanabilir. Doğal polimerlerin birçoğu enzimatik olarak bozunmaya uğrarlar. Bozunma sonucu oluşan ürünler vücut tarafından tekrar absorbe edilir veya normal biyolojik yoldan elimine edilir.

Hidrolitik olarak bozunan polimerler, polimer zinciri üzerinde ester, anhidrit, karbonat, amit, üretan ve üre gibi hidrolitik kararlılığı düşük fonksiyonel gruplar içerirler. Poli(glikolik asit) (PGA), poli(laktik asit)ler (PLLA, PDLA), poli(laktit-ko-glikolit) (PLGA), poli(ε-kaprolakton) (PCL), poli(ortoester) (POE), poli(alkil siyanoakrilat) (PACA), polianhidritler, poliamitler ve poliüretanlar en çok kullanılan hidrolitik olarak bozunan polimerlerdir [34].

Enzimatik olarak bozunan polimerler, Kollajen, elastin, albümin ve fibrin gibi protein ve poli(amino asit)ler ile pektin, dekstran, kitin, kitosan ve aljinik asit gibi polisakkaritler örnek olarak verilebilir.

2.1.2.2 Biyobozunmaz polimerler

Biyolojik ortamda parçalanmayan biyobozunmaz polimerler, hidrofilik veya hidrofobik yapıdadırlar. Hidrofilik polimerler hidrojel olarak adlandırılırlar ve suda çözünmez ama şişerler. Hidrofobik polimerler ise suda çözünmez ve şişmezler. Poli(dimetil siloksan) (PDMS) medikal amaçlı kullanılan ve vücut ortamında bozunmayan bir polimerdir. Hidrojeller ve medikal dolgu malzemeleri bu türe en güzel örnektir. Poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) kontak lens yapımında yaygın olarak kullanılan ve bozunmayan hidrojel yapıda bir polimerdir.

2.1.3 Kontrollü Salım Sistemlerinin Avantajları Ve Dezavantajları

Kontrollü salım sistemleri tıp, tarım, gıda, veteriner, kozmetik ve gen mühendisliği gibi birçok alanda kullanılmaktadır ve diğer tüm sistemlerde olduğu gibi bu sistemlerin de kullanımlarında bazı avantaj ve sakıncalar vardır. Kontrollü salımın klinik açıdan en önemli faydası, kanda etkin madde düzeyinde meydana gelen iniş çıkışları önlemesi ve böylece ilacın plazma düzeyinin vücutta istenilen süre ve tedavi edici düzeyde sabit kalmasını sağlamasıdır. Bundan dolayı hemen salım yapan klasik sistemlerin sebep olduğu pik konsantrasyonlarının istenmeyen yan etkilerinin şiddeti ve sıklığını azaltabilmektedir.

Kontrollü salım sistemleri ile tek uygulamada ilacın kanda uzun süre etkin düzeyde kalması sağlanır. Fizyolojik ortamda proteinler gibi in vivo yarılanma ömrü kısa olan ilaçların enzimlerin yıkıcı etkisinden korunarak parçalanması önlenebilir ve yarılanma ömrü uzatılabilir. Bu sistemlerle hasta doku ve organlara hedeflendirilen ilaçların sistemik yan etkileri azaltılmış olup hasta bölge yerine, bütün vücudun etkilenmesi önlenir. Vücuda verilen ilacın büyük bir kısmı organizma koşullarından etkilenmeden hedeflenen bölgeye taşınabildiği için kullanılan toplam ilaç miktarı azalmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda, dokuları tahriş eden etkin maddelerin mide bağırsak sistemi mukozasındaki zararlı etkilerini azaltabilmekte veya önleyebilmektedir. Ayrıca, aynı anda iki veya daha fazla ilaç molekülünün aynı taşıyıcı ile vücuda verilebilmesine olanak sağlayan bu sistemlerin uzun süreli kullanımında, ilaç birikimi ve bunun sebep olduğu toksik etkiler minimum seviyeye indirilmiş olur [30].

İlacın sistemik yolla verilmesinin neden olacağı zararlı yan etkiler “polimer-ilaç” sisteminin lokal olarak uygulanması ile azaltılabilir ve hatta tamamen ortadan kaldırılabilir. Kullanılan polimerik sistemin uygulama bölgesinden uzaklaştırılabilir olması durumunda, yan etki ve etki istenilen zamanda sonlandırılabilir.

Büyük dozda ilacın birçok kerede verilmesi yerine kontrollü salım sağlayan sistemler ile sürekli az miktarda verilmesi, uygulamadan doğabilecek sıkıntıları giderebilir. Hastaların yaşamını kolaylaştıran ve yaşam kalitesini arttıran bu sistemlerle günde

birkaç kez ilaç alma gereksinimleri olmamakta, dozların sayısı ve sıklığı azalmakta ve hastaların gece ilaç alımı ya da ilaç almayı unutma olasılıkları ortadan kalktığı için tedaviye uyumları daha rahat olmaktadır. Böylece hastanın sık sık ilaç alması gerekmez, tedavide kolaylık ve süreklilik sağlanır. Ayrıca, bu yöntemle ilaç verilmesi daha ucuz ve ilaç kaybını önleyici olabilir. İyi bir tıbbi kontrolün bulunmadığı az gelişmiş bölgelerde ilaç kullanımı düzeltilebilir ve kolaylaştırılabilir. İyi tasarlanmış kontrollü salım sistemleri, maliyet-etki ilişkisi yönünden değerlendirildiğinde, genel sağlık harcamalarının düşmesine neden oldukları için, birinci derecede tercih edilebilmektedirler.

Kontrollü salım sistemlerinin sağladığı en büyük avantaj, ilaç salımının toksik seviyeye çıkarılmadan istenilen sürede etkin düzeyde uygulanabilmesidir. Ancak, klinik uygulamalarda bu sistemlerin yararlarının yanı sıra neden olabileceği zararlar da göz önüne alınmalıdır. Kontrollü salım sistemlerinin birçoğunun yapıtaşı polimerlerdir ve ilaç salım hızı ve süresi kullanım şekline, yoluna, amacına ve ilacın özelliklerine göre bir veya birkaç polimer kullanılarak ayarlanabilir. Ancak, kullanılan polimerik malzeme toksik veya biyoljik açıdan uyumsuz olabilir ve polimerin parçalanması ile ortaya çıkan yan ürünler vücutta zararlı etkiler gösterebilirler [29].

Uzun süre etkili olan sistemlerin içeriği özellikle önemlidir çünkü ilaç, mide bağırsak sistemini geçiş sırasında yararlanılabilecek şekilde hazırlanmamış ise tedavi sağlanamayabilir. Sürekli etkili ilaçların yapısının kompleks oluşu, beklenenden daha hızlı veya yavaş salımla sonuçlanan kararsızlık problemlerine yol açabilmekte ve kullanılan etkin madde miktarı yüksek olduğundan vücutta toksik düzeyler oluşabilmektedir. Dozaj seçimi, tek bir yararlı doz veya bunun katları olması nedeniyle sınırlıdır. Genelde bu sistemler; kırılmazlar, toz hale getirilemezler ve suda çözünmezler. Bu nedenle de belirli bir dozda hazırlanan tek bir ilaç seklinin diğer geleneksel ilaç verme şekillerinde olduğu gibi kişiye göre daha alt birimdeki dozlara bölünmesi mümkün olmayabilir. Ayrıca, her etkin maddenin bu sistemlerle hazırlanması mümkün değildir.

Polimeri uygun bir vücut bölgesine yerleştirmek için cerrahi müdahale gerekebilir ve yerleştirilen sistem ağrıya sebep olabilir. Bu tip ilaçlarla tedavi sırasında herhangi bir yan etki görüldüğünde ya da başka bir sebeple tedavinin kesilmesi gerektiğinde hemen salım yapan ilaçlarda olduğu gibi tedaviyi hemen kesmek mümkün olmayabilir. Örneğin, implantlar ancak ikinci bir cerrahi işlemle çıkartılabilmektedir ve oral olarak uygulanan sistemlerde ilacın salım süresi uzun olduğu için tedavinin kesilmesi zaman almaktadır. Bundan dolayı, vücuda verildikten sonra kontrolün bozulmasına sebep olacak aksaklıklar needeniyle sistemin güvenliği tam analamıyla garanti edilemeyebilir.

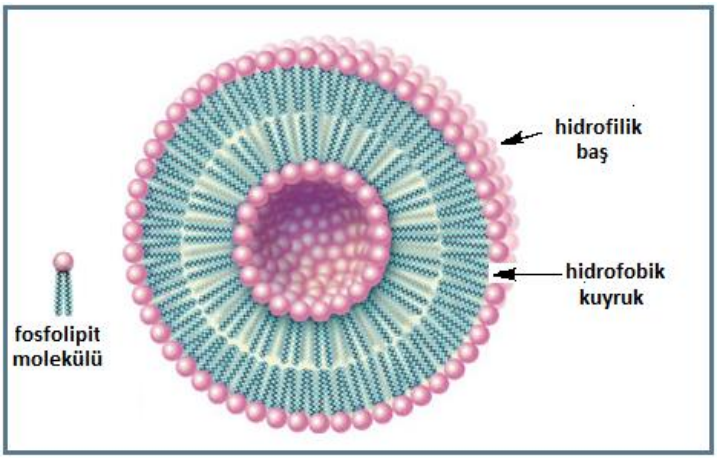
İlacın hasta tarafından alınmasının unutulması, tedavi sırasında ilacın etkisinde olabilecek azalma riskinin diğer ilaç verme şekillerine göre daha fazla olmasına neden olmaktadır. Bu tip sistemlerin geliştirilmesi ve üretilmesi diğer ilaç şekillerinden daha zor olup kullanılan polimerler veya sistemin maliyeti daha fazla olabilmektedir. Ancak, kullanım yerine uygun olarak seçim yapıldığında kontrollü salım sistemlerinin sakıncaları avantaja dönüştürülebilir.

2.1.4 Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan İlaç Taşıma Sistemleri

İlaç taşıyıcı sistemler, ilacın çeşitli birleşmeler ile salım hızını, dokulara salımını ya da her ikisini de kontrol eden sistemler olarak tanımlanırlar. Bu sistemlerde ilaç, bir başka kimyasal ile, bir ilaç taşıma sistemi ile ya da ilaç uygulama süresinin değiştirilmesiyle etki etmektedir. Geleneksel sistemlerin ya da yeni moleküllerin güvenlik ve etkinliğini artırmak, etkin madde parçalanmasını ve kaybını en aza indirmek, bu maddelerin zararlı yan etkilerini önlemek, biyoyararlanımlarını arttırmak ve etki yerlerinde birikmelerini sağlamak için; çeşitli ilaç salım ve hedefleme sistemleri geliştirilmiştir [17]. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerin herbirinin kendi avantajları ve eksiklikleri vardır, bundan dolayı belirli bir taşıyıcı sistemi seçilirken tüm hususlar dikkate alınmalıdır. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerin özellikleri istenilen yönde geliştirilebilir; yavaş parçalanan, uyarı duyarlı (pH, sıcaklık, manyetik alan, elektrik alan, vb.) veya istenilen bölgeye hedeflendirilebilirler.

2.1.4.1 Lipozomlar

Lipozomlar, boyutları 300 nm ile 10 µm arasında değişen, tekli ya da çoklu yağ asitleri ve fosfolipitlerin su içinde organize olması ile meydana gelen çift tabakalı veziküler yapılardır (Şekil 2.3) [35]. Çift tabakanın oluşumu, polar başlarını su fazına ve hidrofobik kuyruklarını birbirlerine doğru kendiliğinden çeviren yağ asidi zincirlerinin düzenlenmesine bağlıdır. Farklı yağ asitleri kullanılarak bu çift tabakanın özellikleri değiştirilebilir. Lipozomlar, birden farklı ilacın taşınması için kullanılabilecek taşıyıcılardır. Ortadaki kısma hidrofilik bir ilaç, dış kısmına hidrofobik bir ilaç yüklenebilir. İlacın fizikokimyasal özelliklerine ve yağ asidi tipine göre ilaç etkin maddeleri bu sistemlerde sulu kısımda hapsedilebildiği gibi çift tabaka arasına da yerleşebilir.



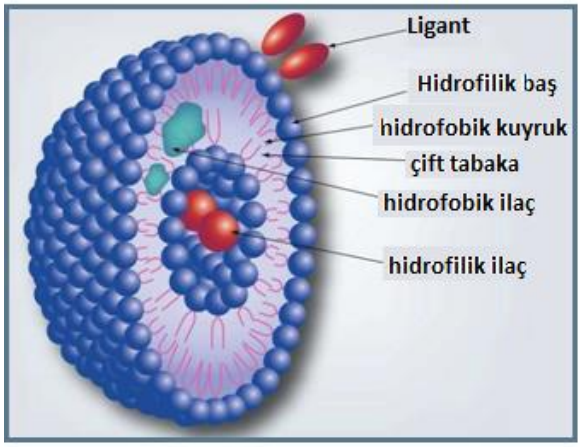
Şekil 2. 3 Lipozomun şematik yapısı

En büyük dezavantajları, düşük kararlılıklarıdır. Fosfolipit yapıda veziküller olduklarından dolayı sulu ortamda belirli bir süreden fazla tutulamazlar ve veziküller bozunmaya başlar. Lipozomal sistemlerin, lokal hastalıklar (göz, safra kesesi, akciğer) için uygun taşıyıcı sistemler oldukları gösterilmiştir [35]. Boyutları 1 µm'ye kadar olanların, retikülоendotelyal sistem tarafından vücuttan toplanarak karaciğer ve dalakta biriktikleri, 3 µm'den büyük olanların ise akciğerde toplandığı gösterilmiştir. Karaciğerde oluşan tümörlere karşı antineoplastik ajanlarla yüklü küçük boyutlu lipozomlar kullanılabilir. Monoklonal antikorlar ile yüzeyleri modifiye edilebilen bu

sistemlerde spesifik hedeflendirme de yapılabilmektedir. Ancak bu sistemlerin bazı sakıncaları da vardır. Öncelikle bu yapılar vücutta makrofajlar tarafından temizlenmeye çalışılmaktadır. Bilinen en baskın lipozom hücre etkileşimi endositozdur ancak birçok hücre tipi, özellikle de tümör hücreleri düşük endositoz yeteneğine sahip olduğu için lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımları kısıtlanır [36]. Buna karşın, lipozomlar kanser tedavisinde ilk onay almış ilaç taşıyıcı sistemlerdendir.

2.1.4.2 Niozomlar

Niozomlar, iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin ana bileşen olarak bulunduğu, yük verici madde ve kolesterolden oluşan amfifilik veziküllerdir. Veziküllerin kararlılığını sağlamak için oluşum aşamasında ortama kolesterol eklenir. Niozomun yapısı seçilen yüzey aktif maddeye, enkapsüle edilecek ilacın doğasına, buharlaşma sıcaklığına, membran katkı maddelerinin yapısına bağlı olarak değişir [37].



Şekil 2. 4 Niozomun şematik yapısı

Niozomlar şekil olarak lipozomlara benzerler (Şekil 2.4) ancak, poli(gliserol alkil eter), poli(oksietilen alkil eter) ve esterler başta olmak üzere iyonik olmayan yüzey etkin maddelerle hazırlanırlar. Veziküllerin kararlılıkları 4 grup kuvvete dayanır. Yüzey etkin madde molekülleri arasında var olan Van der Waals çekim kuvvetleri, yüzey etkin madde moleküllerindeki yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşimlerden doğan

itme kuvvetleri, yüzey etkin maddenin baş grubuyla ilgili olan entropik itici kuvvetler ve kısa aralıkta etkili olan itme kuvvetleridir [37].

2.1.4.3 Mikrotanecikler

Klinik açıdan bakıldığında, nispeten küçük boyuttaki uzun süre dolaşımda kalan çeşitli ilaç taşıyıcı mikrotanecikler, birçok tümör dokusunda geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma etkisi (EPR) ile veya engelli filtrasyon mekanizması ile etkili bir şekilde birikir [38,39]. Mikroküre ve mikrokapsül olarak ikiye ayrılır.

2.1.4.4 Mikroküreler

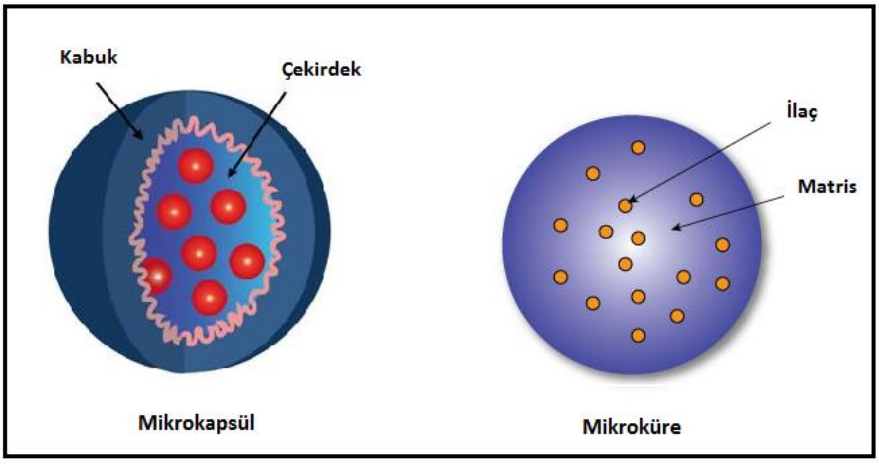
Mikroküreler, çapları birkaç µm'den 1 mm'ye kadar değişebilen, düzenli yapıda mikro taşıyıcılardır. Kitosan [40], albümin [41], selüloz, jelatin [42] gibi doğal polimerlerden ya da laktik asit, glikolik asit gibi doğal monomerlerden hazırlanabilirler [43].

Mikrokürelerden beklenen başlıca özellikler; ilacı kontrollü şekilde salması, yapı ve aktivitesini değiştirmemesi, ilacı hedef organ, doku ve hücreye taşıması ve hedefe ulaşana kadar ilaç salımı olmaması, hücre içi koşullara dayanıklı olması, düşük dozda ilaç kullanımına olanak sağlaması, düşük doza bağlı olarak toksisitenin azalması, biyolojik sistemle uyumlu olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmamasıdır [43]. Homojen ve küresel yapısı, pürüzsüz yüzeyiyle tipik bir mikroküre örneği Şekil 2.5'te görülmektedir. Mikroküreler, emülsiyon polimerizasyonu, dispers fazda jelleşme ve çapraz bağlama yöntemi ve çözücü buharlaştırma yöntemi gibi birçok yöntemle hazırlanabilmektedir.

2.1.4.5 Mikrokapsüller

Mikrokapsüller ilk mikrotanecikler olarak bilinmektedir. Çekirdek ve çeper olmak üzere iki tabakadan oluşurlar. Katı, sıvı ve gazın inert bir polimerle kaplanması ile elde edilirler. Çekirdek, etken maddenin bulunduğu kısım, çeper de kaplama yapılan maddenin oluşturduğu kısımdır. Mikrokapsül hazırlamak için kullanılan polimerler

doğal (jelatin, kitosan, kolajen, aljinat, albümin, vs.) ya da sentetik (PEG, PLA, PCL vb.) olabilir. Mikrokapsüller, taşınmak istenen maddenin kolay taşınmasını sağlamak, stabilitesini arttırmak ve etki süresini uzatmak için kullanılır [44].



Şekil 2. 5 Mikrokapsül ve mikrokürenin yapısal farkı

Mikrokapsül hazırlamak için kimyasal (yüzeylerarası polimerizasyon, in situ polimerizasyon gibi), fizikokimyasal (sulu çözücüden veya organik çözücüden faz ayrımı) ve mekanik yöntemler (Wurster Yöntemi ve püskürterek kurutma) kullanılır.

2.1.4.6 Nanotenecikler

Nanotanecikler, boyutları 10–100 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan ilacı kontrollü olarak salan katı koloidal yapılardır. Nanotanecik terimi nanokapsülleri ve nanoküreleri kapsar. Nanokapsüller, ilaç molekülünü içeren bir boşluğun polimerik bir membran ile çevrelenmiş olduğu veziküler sistemlerdir. Nanoküreler ise içerisinde ilacın fiziksel ve homojen olarak dağılmış olduğu matris sistemlerdir.

Nanotanecikler genel olarak aşağıdaki özellikleri sağladıkları için, ideal ilaç taşıyıcı sistemler olarak nitelendirilmektedirler [45]:

- Ucuz ve kolay hazırlanabilmeleri
- Biyoparçalanır ve biyouyumlu olmaları

- Parçalanma ürünlerinin toksik olmaması
- Küçük parçacık boyutları
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesi
- Kan dolaşımında uzun süre kalabilmeleri
- Etki edecekleri bölgede toplanabilmeleri
- İlacı kontrollü olarak salabilmeleri
- Kararsızlık sorunlarının olmaması

Enkapsüllenecek ilacın ve polimerin doğasına bağlı olarak nanotanecikleri hazırlamak için sulu ortamda çapraz bağlanma, organik çözücüden polimer çöktürmesi, emülsiyon polimerizasyonu, yüzeylerarası polimerizasyon, çözücü buharlaştırılması ve çözücü yerdeğişimi gibi birçok yöntem kullanılmaktadır [46]. Bu yöntemlerin çoğu biyofarmasötikler için zararlı olabilecek organik çözücü, ısı, ultrasonik titreşim veya kuvvetli karıştırma kullanılmasını gerektirir. Ayrıca, nanotanecik oluşumu elektrostatik etkileşimlere de dayandırılabilir. Bu polielektrolit komplekslerin hazırlanması sırasında böyle ağır şartlar gerekmez, bu nedenle ilacın olası zararı en aza indirilmiş olur.

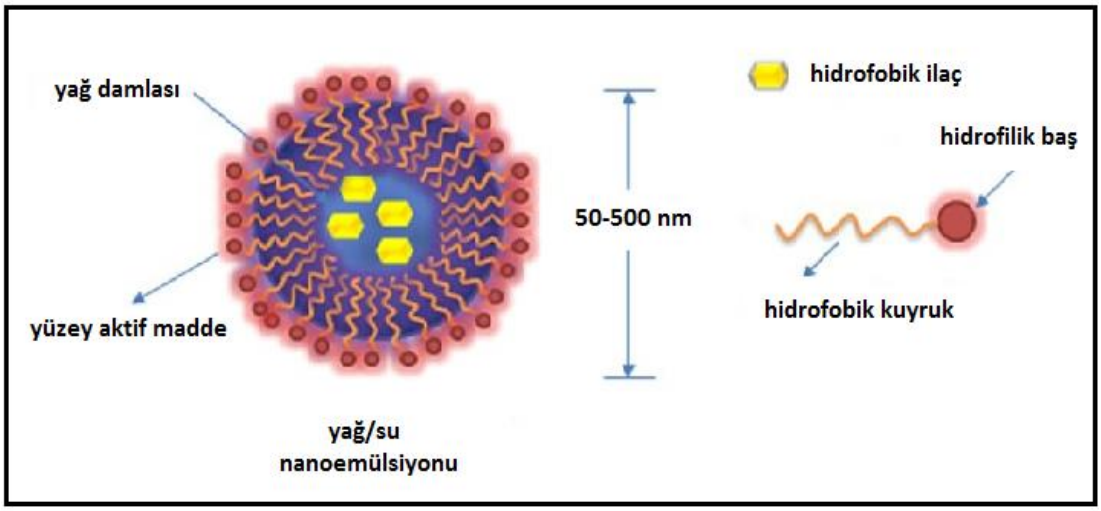
Nanotanecikleri hazırlamak için doğal ve sentetik birçok biyobozunur polimer kullanılır. Doğal polimerler proteinler (albumin, jelatin) ve polisakkaritler (aljinat, kitozan, dekstran) olmak üzere iki gruptur. Sentetik olarak ise polianhidrit, poli(ε-kaprolakton), poli(laktik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit) veya poli(alkilsiyano akrilat) gibi birçok polimerden yararlanılır. Nanotaneciklerin bağırsak mukozası ile olan etkileşimlerini artırmak amacıyla, yüzeyleri adsorpsiyon ya da hidrofilik moleküllerin aşılanması ile modifiye edilebilir. Örneğin PEG ile hidrofiliklik ve çitosan ile biyolojik olarak yapışkanlık katılabilir. Ayrıca, nanotaneciklerin yüzeyine antikorlar, glikoproteinler veya peptitler gibi ligandların aşılanması ile ilaçların belirli hedef hücrelere, hastalıklara veya bağırsak bölgelerine iletilmesi sağlanabilir [47]. Lipozomlar ve lipit bazlı sistemler gibi diğer

koloidal taşıyıcılarla kıyaslandığında, çoğu nanotanecik mide-bağırsak sisteminde daha kararlıdır.

Nanotanecikler, hücreye fagositoz yoluyla girer ve hücre içindeki lizozomal enzimler tarafından parçalanırlar. Pasif hedeflendirme ile en fazla karaciğer ve böbreklerde toplanan nanotanecikler karaciğerin kanser ve paraziter hastalıklarında kullanılırlar. Aktif olarak hedeflemede ise, monoklonal antikorlar nanotaneciklere antijen bağlayan bölgelerinden adsorbe olurlar ve bu antikorlarla kaplı nanotanecikler in vitro koşullarda hedef tümör hücrelerinde etkili olur. Damar içine verilen nanotanecikler, retiküloendotelyal hücrelerin fazla olduğu karaciğer, dalak ve kemik iliğinde toplanırken; deri altı ve adale içine verilenler ise böbrek ve bağırsaklarda yoğunlaşırlar, idrar ve dışkı yoluyla vücuttan atılırlar [48].

2.1.4.7 Nanoemülsiyonlar:

Nanoemülsiyonlar, bir sıvının diğer bir sıvı içerisinde damlacıklar halinde dağılmış olduğu birbiri ile karışmayan iki sıvıdan (yağ fazı ve su fazı) meydana gelir (Şekil 2.6). Sulu fazda süspansiyon haline getirilen nano boyuttaki yağ damlacıkları genellikle 20-200 nm arasında değişen boyutlara sahiptir [49]. Suda az çözünen ilaçların çözünürleştirilmesinde kullanılan nanoemülsiyonlar genellikle, dağılmış faz olarak yağ fazı ve dağıtıcı ortam olarak su fazından oluşur. Yağ damlacıkları, hidrofobik ilaçlar için bir depo görevi görür [50].



Şekil 2. 6 Nanoemülsiyon oluşumu

Nanoemülsiyonların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan yağ molekülleri; doymuş ve doymamış yağ asitleri, yağ asiti esterleri ve soya yağlarıdır. Faz ayrılma ve topaklanma (flokülasyon) eğilimi olmasına rağmen, yeterli raf ömrüne sahip kinetik olarak kararlı nanoemülsiyonlar poloksamer, lesitin ve Tween 80 gibi yaygın yüzey aktif maddeler kullanılarak elde edilebilir. Nanoemülsiyonların tanecik boyutlarının kontrol edilebilmesi ve kararlılığının arttırılması için çeşitli yüzey aktif madde bileşimleri kullanılır [51]. Nanoemülsiyonların üretim maliyetinin düşük olması, çeşitli yollarla ilaç taşıyabilmesi ve yüksek ilaç yükleme etkinliği gibi çeşitli avantajlarının yanı sıra, kandaki kararlılığın düşük olması, kontrollü salım özelliklerinin eksikliği ve taneciklerin topaklanma ve birleşme eğiliminde olması gibi dezavantajları da mevcuttur [51].

Çizelge 2. 2 Polimerik miseller ve nanotaneciklerin ilaç taşıma etkinlikleri [51]

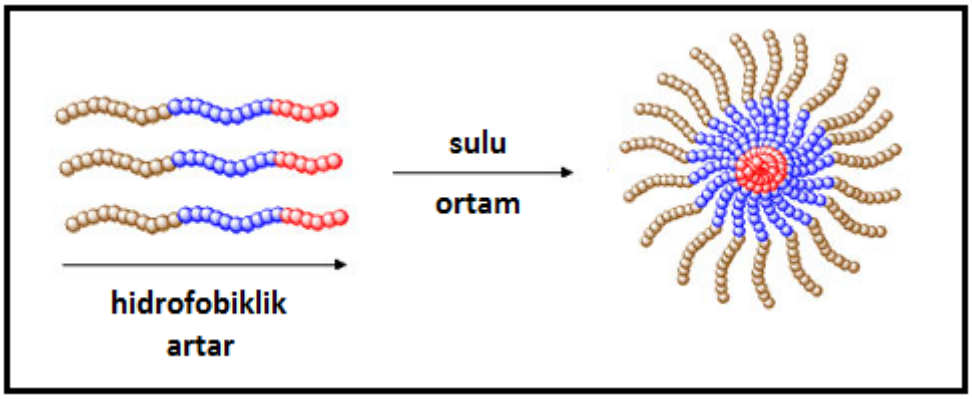
	Polimerik miseller	**Nanotanecikler**
Fizikokimyasal Özellikler	• 20-50 nm • Dinamik yapı • Hidrofilik kabuk ve hidrofobik çekirdek	• ~ 200 nm • Statik yapı • Değişken yüzey özellikleri
Aktif kısım **(ilaç, protein, aşı)**	• Hidrofobik çekirdek • Özellikle suda zayıf çözünen ilaçlar	• Enkapsülasyon • Hidrofilik veya hidrofobik Düşük veya yüksek molekül ağırlıklı
Terapötik uygulamalar	• Zayıf çözünen ilaçları çözünürleştirme	• Taşıyıcı • Hassas ilaçları koruma • Zayıf çözünen ilaçları çözünürleştirme
Absorpsiyon mekanizması	• İlacın pasif difüzyonu • İlaç yüklü misellerin endositozu	• Endositoz (büyük moleküllerin hücre içine alınması)
Taşıyıcının akıbeti	• Polimer kısmen unimer ve misel olarak absorplanır.	• Nanotaneciklerin kararlılığına bağlı olarak ilaçla beraber hücre içinde işlenmeden direk kana • taşınır.

2.2 Polimerik Miseller

Bir yüzey aktif madde molekülü gibi yapılarında hem hidrofilik hem de hidrofobik grup içeren amfifilik blok kopolimerler sulu çözeltilerinde çözünürlüğü zayıf maddelere karşı yüksek çözündürme kapasitesi olan dayanıklı yapıdaki polimerik miselleri meydana getirirler. Bu polimerik miseller, hidrofobik bloklardan meydana gelen bir çekirdek ve hidrofilik polimer zincirleriyle dayanıklı hale getirilmiş bir kabuktan oluşmaktadır ve bu küresel taneciklere genel olarak *çekirdek-kabuk* (core-shell) yapılar denilmektedir [52].

Polimerik misellerin çekirdek denilen iç kısmı hidrofobik yapıdadır ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak hidrofobik ilaç moleküllerinin kimyasal, fiziksel veya

elektrostatik etkileşimlerle çözünürlüğünü arttırarak yapıya eklenebileceği bir depo görevi görmektedir. Kabuk denilen dış kısmı ise, hidrofilik yapıdadır ve ilacın kan dolaşımında kalış süresinin uzatılmasında rol oynamaktadır. Miseller, çözünürlüğü az olan ilaçların çözünürlüğünü arttırmaları ve nano boyutta hazırlanabilmeleri nedeniyle, hücre duvarından geçişte retiküloendotelyal sistem tarafından tanınmadıklarından uygun ilaç taşıyıcı sistemler olarak düşünülmektedir.



Şekil 2. 7 Polimerik misel oluşumu

2.2.1 Polimerik Misel Oluşumu ve Yapısı

Amfifilik blok kopolimerler, hem hidrofilik hem de hidrofobik blok için seçici olan bir çözücüye konulduğunda, moleküllerin birleşmesine yol açan çekim kuvveti ve misellerin ayrı bir faz olarak sınırsız büyümesini önleyen itici kuvvetin etkisi ile kendiliğinden misel oluştururlar (Şekil 2.7). Bu kopolimerlerin kendiliğinden misel oluşturmasındaki en önemli itici güç, sulu çevreden hidrofobik kısımların çekirdeğe itilip uzaklaştırılmasından dolayı sistemin serbest enerjisinin azalmasıdır. Sulu çözeltilerde, ara yüzey serbest enerjisinin azaltılması için en önemli mekanizma hidrofobik etkidir [53], [54].

Çok düşük kopolimer konsantrasyonlarında polimer zincirleri kendiliğinden bir düzen oluşturamayacak kadar yetersiz sayıda oldukları için sadece tek zincirler (unimer) halinde bulunurlar. Çözelti içerisinde dağılmış olarak bulunan bu polimer zincirleri hava-su ya da organik çözücü-su arayüzeyinde adsorplanarak yüzey aktif madde gibi

davranırlar. Polimerin konsantrasyonu arttıkça, arayüzeyde daha çok zincir adsorplanır ve en sonunda çözeltinin ve arayüzeyin polimer zincirleri ile doymuş olduğu bir konsantrasyon değerine ulaşılır [55]. Amfifilik blok kopolimerler, sulu çözeltilerinde belirli bir konsantrasyonun üzerinde bulunduklarında, hidrofobik bloklar bulunduğu sulu ortam ile temastan korunarak içeriye doğru yönelirler. Hidrofilik bloğun sulu ortamla temasını sürdürmesi için bu gruplar dışarıda kalacak şekilde kümeleşirler ve polimer zincirleri miselleri oluşturmak için birleşmeye başlar. Misellerin oluşmaya başladığı bu konsantrasyon değerine kritik misel konsantrasyonu (CMC) denir ve tek zincirler ile misel oluşumunun denge halinde olduğu bu noktada sistemin serbest enerjisinde bir azalma meydana gelir. CMC'de suyun bir kısmı misel çekirdeğinin içinde bulunduğundan gevşek halde büyük miseller elde edilir. CMC'nin üzerindeki polimer konsantrasyonlarında ise unimer/misel dengesi düşük enerjili duruma yani misel oluşumu yönüne kayacağından su hidrofobik çekirdekten uzaklaşır, bu da misel boyutunda bir azalmaya neden olur ve daha sıkı ve kararlı miseller elde edilir [56], [57]. Yüksek polimer konsantrasyonlarında, miseller CMC değerinin altına seyreltilmedikleri sürece kararlıdır.

Amfifilik blok kopolimerler genellikle çok düşük CMC değerlerine sahiptir. Biyomedikal uygulamalarda kullanılacak amfifilik polimerden elde edilen miselin *in vivo* olarak kararlı kalabilmesi için CMC değerinin çok düşük olması gerekir. Vücuda verildikten sonra yüksek hacimdeki kanla meydana gelecek seyrelmeye karşı sadece düşük CMC'li miseller kararlı kalarak yapılarını koruyabilirler. Yüksek CMC'ye sahip amfifiller ise sulu ortamda ve kanda kolayca ayrılabilirler ve hedeflenen bölgeye ulaşamadan içerdikleri etken madde kanda çökebilir. Farmasötik alanda kullanılabilecek ideal bir misel sisteminin CMC değeri milimolar düzeyde veya daha düşük olmalıdır [58]. Bu nedenle CMC'si yüksek olan amfifillerin ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanımları uygun değildir. Diğer önemli konu ise çözeltide meydana gelebilecek agregasyona karşı misel kararlılığıdır. Genel olarak, amfifilik graft kopolimerlerden oluşan misellerin agregat oluşturma ihtimali daha yüksektir çünkü bu misellerde hidrofobik zincir daha az

hareketlidir ve blok kopolimerlerden oluşan misellerden daha gevşek bir biçimde paketlenmiştir. Bundan dolayı diğer misellerdeki hidrofobik bloklarla etkileşebilir ve büyük agregatlar oluşturabilirler [59].

Polimerik misellerin kritik misel konsantrasyonlarında aşağıdaki özellikler dikkate alınarak çeşitli düzenlemeler yapılabilir [57], [60].

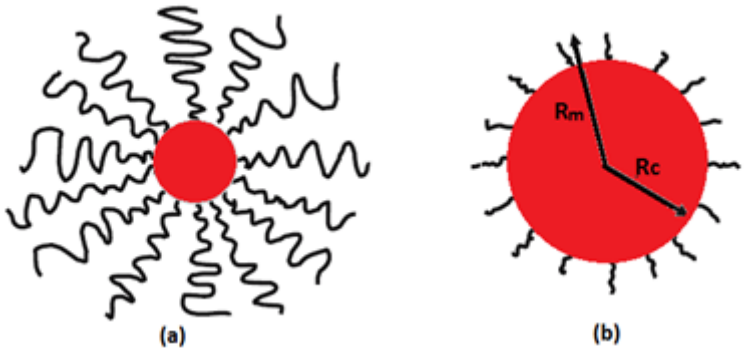
- Hidrofilik blok uzunluğu sabit tutulduğunda, hidrofobik blok uzunluğundaki artış CMC değerinde azalmaya neden olur.
- Hidrofobik blok uzunluğu sabit tutulduğunda, hidrofilik blok uzunluğundaki artış CMC değerinde küçük bir artışa neden olur.
- Belirli bir hidrofilik/hidrofobik oranda kopolimerin molekül ağırlığındaki artış CMC değerinde azalmaya neden olur.
- Genel olarak, aynı molekül ağırlığı ve aynı hidrofilik/hidrofobik oranda triblok kopolimerler için CMC değeri, diblok kopolimerlerinkinden daha büyüktür.

Misellerin oluşması için gerekli olan diğer bir parametre de Kraft sıcaklığı olarak bilinen kritik misel sıcaklığı (CMT)'dır. CMT değerinin altında kritik misel konsantrasyonunun hiçbir önemi yoktur, yani misel oluşmaz. Amfifilik polimerler bu sıcaklığın altında sadece tek zincirler halinde bulunuyorken, sıcaklık arttırıldıkça polimerin çözünürlüğü yavaşça artar ve polimerlerin misel oluşturabileceği minimum sıcaklığa erişilir. Bu sıcaklıkta polimerin çözünürlüğü CMC'ye eşit olur. Amfifilik blok kopolimerlerin hidrofobik bloklarının uzunluğunun artması Van der Waals kuvvetlerini arttıracağı için CMT değeri de artar [61].

CMC değerini bulmak için kullanılan metotlar CMT'yi belirlemek için de başarı ile uygulanabilir. Sıcaklık ve konsantrasyona bağımlılıklarından dolayı CMT ve CMC değerleri serbest enerji ve miselizasyonun entalpisi gibi misel oluşumunun termodinamik parametrelerini belirlemek için basit bir yöntem sağlar.

2.2.2 Polimerik Misellerin Morfolojisi

Polimerik miseller çekirdek ve kabuk arasında net bir ayırıma sahip küresel taneciklerdir. Kopolimer bileşimine (çekirdeği oluşturan bloğun gerilme derecesi ve kabuğu oluşturan bloklar arasındaki etkileşimi etkiler), kopolimer konsantrasyonuna (misellerin agregasyon sayısını arttırır), ortama asit, baz veya tuz katılmasına ve misellerin hazırlanmasında kullanılan organik çözücülere (çözücünün polaritesi ve blokların çözücüdeki bağıl çözünürlükleri) bağlı olarak farklı morfolojiler meydana gelir [65].

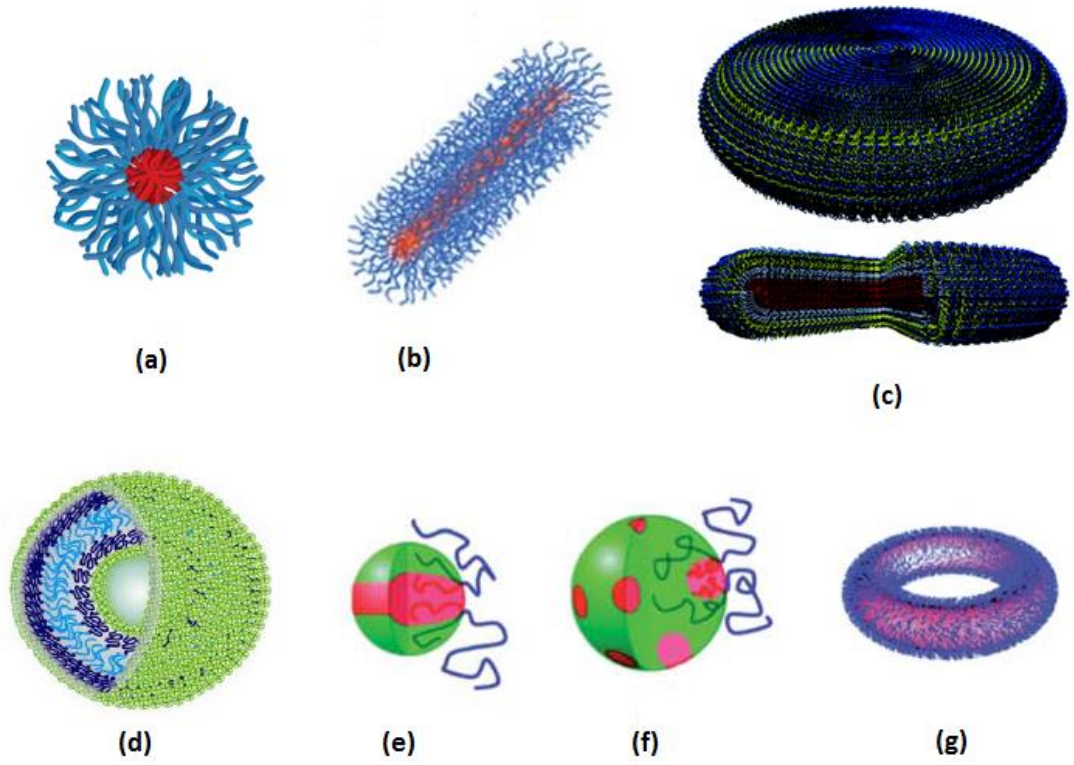


Şekil 2. 8 (a) Yıldız benzeri ve (b) crew-cut misel yapılarının gösterimi

Bileşimlerine bağlı olarak amfifilik AB tipi kopolimerlerden genel olarak yıldız benzeri ve "crew-cut" miseller olmak üzere iki yapının oluşumu söz konusudur. Hidrofilik blok hidrofobik bloktan daha uzun olduğu durumlarda sulu çözeltilerde küresel miseller oluştururlar. Kabukla kıyaslandığında küçük bir çekirdeğe sahip olan yıldız şekilli miseller de bunlara örnek olarak verilebilir. Genellikle, hidrofobik çekirdeği oluşturan blok uzunluğunun hidrofilik kabuğu oluşturan bloktan daha uzun olduğu asimetrik blok kopolimerlerden küresel olmayan ve "crew-cut" olarak bilinen yapılar oluşur. Şekil 2.8'de misellerin üzerinde gösterilen Rc çekirdeğin yarıçapını, Rm ise miselin genel olarak yarıçapını gösterir. Bu agregatların oluşumu çekirdeği oluşturan blokların esnekliği ve kabuğu oluşturan hidrofilik zincirler arasındaki etkileşim arasında bir kuvvet denge etkisi ile açıklanmıştır. Eğer hidrofilik blok uzunluğu çok yüksek ise,

kopolimerler suda unimer olarak bulunurken, çok uzun hidrofobik bloğa sahip olan moleküller çubuk ve lameller gibi küresel olmayan formlarda bulunurlar [65], [66].

Amfifilik moleküller içerdikleri hidrofilik/hidrofobik karakterden ve elektrostatik etkileşimlerden dolayı, sulu ortamda küre, silindir, vezikül, disk şekilli, toroidal vb. gibi farklı misel benzeri morfolojik yapılar oluştururlar (Şekil 2.9) [62], [63], [64].



Şekil 2. 9 Çeşitli misel yapıları (a) küresel misel, (b) silindirik misel, (c) disk şekilli misel, (d) vezikül, (e) hamburger şekilli misel, (f) ahududu şekilli misel ve (g) toroidal misel

Blok kopolimerlerin bloklarından biri için seçici olan bir çözücüdeki seyreltik çözeltilerinde oluşacak agregatların morfolojisini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir kural geliştirilmiştir. Hidrofilik bloğun kopolimerin toplam kütlesine oranı ($f_{hidrofilik}$) olarak ifade edilen bu kural molekül ağırlığı 2700-20000 g/mol olan polimerler için uygulanabilir. Bu oranın farklı değerleri için oluşacak yapılar aşağıda verilmiştir.

- $f_{hidrofilik}$ > % 45 olduğunda küresel miseller,
- $f_{hidrofilik}$ < % 50 olduğunda çubuk (silindir) benzeri miseller,

- $f_{hidrofilik}$ ~ % 35 olduğunda veziküller,
- $f_{hidrofilik}$ < % 25 olduğunda büyük bileşik miseller gibi ters çevrilmiş mikroyapılar gözlenir [63].

2.2.3 Polimerik Misellerin Özellikleri

Farmasötik alanda kullanılabilecek ideal bir misel sisteminin bazı özelliklere sahip olması gerekir. Öncelikle retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından tutulmadan çeşitli dokuların ve hücrelerin içine girebilmesi için uygun bir boyuta (10-100 nm) sahip olmalıdır. Hem in vitro hem de in vivo olarak kullanımda yeteri kadar uzun bir süre kararlı olmalı ve CMC değeri milimolar düzeyde veya daha düşük olmalıdır. Taşıyıcı matris ilaç molekülünü kendiliğinden yapısına alabilmeli ve hidrofobik bir ilacı yükleme etkinliğinin de % 5-25 arasında olması gerekir. Herhangi bir biyolojik reaksiyona neden olmadan vücutta yeterince uzun süre kalmalı ve seçici bir şekilde hedef alanda birikebilmeli, hedef doku veya hücrelerle temas ettiğinde ise yapısındaki serbest ilacı salabilmelidir. Misel yapısı vücutta yavaşça bozulmalı ve terapötik işlev tamamlandığında taşıyıcı maddenin bileşenleri vücuttan kolaylıkla atılabilen toksik olmayan inert yapılara ayrılmalıdır. Ayrıca, renal yol vasıtasıyla vücuttan atılabilmesi için parçalanma ürünlerinin molekül ağırlığının 50 kDa'dan (hidrodinamik çapı 5-10 nm) daha küçük olması gerekir [67].

Bu gereksinimleri karşılayabilmek için, miselin çekirdek kısmı yüksek yükleme kapasitesine sahip olmalı, içeriğindeki ilaç için kontrollü salım profili göstermeli ve çekirdeği oluşturan blok ile ilaç molekülü iyi bir uyum içerisinde olmalıdır. Hidrofobik çekirdek kısmı ilaç uyumluluğunu, hidrofobik ilaç için kargo boşluğunun boyutunu ve hidrofilik/hidrofobik oranı tanımlar. Bu parametreler, misele ilaç yükleme etkinliğini, ilaç salım profilini ve misel kararlılığını belirler. Miselin kabuk kısmı çekirdeği örtebilmek için yeterli yoğunlukta ve kalınlıkta olmalı ve misel için etkili bir sterik koruma sağlayabilmelidir. Daha genel olarak, misel kabuğu misel hidrofilikliğini, yükünü, hidrofilik blokların uzunluğunu, bu blokların yüzey yoğunluğunu ve miselin ileri

düzeyde fonksiyonlandırılabilmesi (hedefleme parçacıklarının bağlanması gibi) için uygun reaktif grupların varlığını belirlemelidir. Bütün bu özellikleri sağlayan polimerik miseller tekrarlanabilir basit ve ucuz bir yöntemle sentezlenebilmelidir [58].

Bu özellikler, bir misel taşıyıcısının farmakokinetik, biyodağılım, biyouyumluluk, uzun ömürlülük, biyomakromoleküllerin yüzey adsorpsiyonu, biyoyüzeylere yapışma ve hedeflendirilebilme gibi bazı önemli biyolojik özelliklerini kontrol eder.

2.2.4 Polimerik Misel Sistemlerinin Biyolojik Olarak Değerlendirilmesi

İlaç salımında kullanılacak polimerik sistemlerde bulunması istenilen özelliklerin başında biyolojik uyum gelir. Biyolojik uyum, polimerin vücutta kaldığı sürece, bulunduğu yerde olumsuz etki yapmamasını ifade eder. Biyolojik olarak parçalanan polimerlerin birçok yararı olmasına rağmen vücutta uzun süre kalmasından kaynaklanan bazı sakıncaları da vardır. Eğer ilaç salımı süresince polimer bütünlüğünü koruyorsa tedavi süresince vücudun polimer ile teması sakıncalı olabilir, bundan dolayı daha az toksik etkiye sebep olacaklarından ilaç salımı sırasında parçalanan polimerler tercih edilir. Ancak polimerin parçalanması sonucu oluşan monomerlerin, diğer metabolitlerin ve yan ürünlerin de dolaşıma girebileceklerini unutmamak gerekir. İlacın uzun sürede salınması ile kazanılan yararla polimerin parçalanmasından gelecek zarar iyi değerlendirilmelidir.

Toksisite sorunu genellikle polimerin üretimi ve işlenmesi sırasında kullanılan (katalizör, yüzey etkin madde, stabilizatör vb.) veya yapıya katılan maddeler, çevreden karışan kirlilikler ve yapıda polimerleşme sırasında kalan monomerlerden kaynaklanır. Bir polimerizasyon reaksiyonundan arta kalan monomerin, yapıda milyonda bir bulunması dahi büyük bir toksik etki yaratır [67].

Kolloidal ilaç taşıyıcıların etkin maddeyi hedef bölgeye ulaştırabilmeleri için dolaşım sisteminde uzun süre kalmaları gerekmektedir. Ancak vücuda verilen tanecikli sistemlerin çoğu yabancı ürünler olarak tanınır ve RES hücreleri tarafından fagositoz ile kan dolaşımından atılırlar. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerin uzun süre dolaşımda kalabilmesi

için uygun tanecik boyutuna sahip olması gerekir. Çünkü, vücuda alınan taneciklerin boyutu karşılaşacakları etki açısından farklılık gösterir. Tanecik boyutu,

- 5-10 nm ise böbreklerden süzülerek dolaşımdan atılır.
- > 10 nm ise yavaş eliminasyon gözlenir.
- 10-70 nm ise kılcalların arasından geçebilir ve dokularda etkili dağılım sağlayabilir.
- 70-200 nm ise vücutta uzun dolaşım zamanı sağlar.
- > 200 nm ise mekanik filtrasyon ile vücuttan uzaklaştırılır [68].

Bu nedenle ilaç taşınımında kullanılacak polimerik misellerin boyutunun 10-100 nm arasında uygun bir boyuta sahip olması istenir ve sadece 100 nm'den küçük tanecikler endositozla hedef hücreye alınabilir. Tanecik küçültüldüğünde özellikle yüzey alanında artış olmakta çözünme yüzeyden gerçekleştiği için biyoyararlanım artmaktadır.

Polimerik misellerin sterik kararlılığı yani hidrofilik bir polimerle tanecik yüzeyinin kaplanması dalak, karaciğer ve kemik iliğinin RES hücreleri tarafından tanınmasını zorlaştırır dolayısı ile vücuda verildiklerinde dolaşımda daha uzun süre kalabilirler [69].

Miselin kabuk kısmında poli(etilen glikol) (PEG) gibi hidrofilik bir polimerin bulunması yüzey yükünün korunması ve hidrofilik yüzeyin artmasına neden olur ve böylece protein adsorpsiyonunu yöneten elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler gibi iki temel kuvvet engellenir. Kısacası PEG yoğunluğunun yüksek olması ve misel boyutunun küçük olması karaciğerde fagositik mononükleer sistem tarafından atılmadan ve dalaktaki endotel hücreler arasındaki filtrasyonu atlayarak kandaki dolaşımda daha uzun kalmasına ve kararlılıklarına katkı sağlar. Sonuçta uzayan dolaşım süresi, istenilen doku bölgelerinde ilacın birikmesini arttırır [51].

2.2.5 Polimerik Misel Hazırlama Yöntemleri

Polimerik miselleri hazırlamak için *doğrudan çözme yöntemi* ve *diyaliz yöntemi* olmak üzere iki yöntem vardır. Hangi yöntemin kullanılacağı, blok kopolimerlerin su içindeki

çözünürlüğüne bağlı olarak değişir. Eğer kopolimer suda çözünebiliyorsa (blok kopolimer düşük molekül ağırlığına sahip ve çözünmeyen bloğu kısa ise) doğrudan çözme yöntemi, kopolimer suda çok az miktarda çözünüyorsa diyaliz yöntemi kullanılır.

Doğrudan çözme yönteminde, kopolimer CMC değerinin üstünde bir konsantrasyonda direk olarak su veya diğer sulu ortamlarda çözülür, gerekli olduğu durumlarda çözünmeyi kolaylaştırmak için karıştırma, ısıtma ve ultrasonik işlemler uygulanır. Bu yöntem Pluroniklerden ve suda belirli bir çözünürlüğe sahip benzer blok kopolimerlerden misel hazırlamada yaygın olarak kullanılır [69].

Diyaliz yönteminde ise, suda çözünmeyen veya çok düşük çözünürlüğe sahip kopolimer önce su ile karışabilen bir organik çözücüde (tetrahidrofuran, diklorometan, dimetilformamid gibi) çözülür ve daha sonra bidistile suya karşı diyaliz edilir [57]. Genellikle misellerin hazırlanması için bu yöntem kullanılmaktadır. Çekirdek kısmı hidrofilik kısmından daha büyük olan miselleri oluşturan kopolimerler suda çözünmez. Bu durumda, kopolimer organik bir çözücüde çözülür ve üzerine yavaşça su eklenir. Kritik su içeriğine ulaşılınca miseller oluşur ve karışımdaki organik çözücü bidistile suya karşı diyaliz edilerek ortamdan uzaklaştırılır.

2.2.6 Polimerik Misellerin Hedeflendirilmesi

Bütün ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlarken iki temel amaç söz konusudur. Taşıyıcı sistem ilaç molekülünü vücutta istenen organ veya dokuya taşıyarak, en kısa zamanda istenen kan konsantrasyonunu sağlamalı ve bu konsantrasyonu öngörülen süre zarfında devam ettirmelidir. İdeal olarak ilaç taşıyıcı sistem, ilacı istenen organ veya dokuya istenen hızda taşımalıdır. Ayrıca sistemin düşük veya yüksek dozlarda etkin ve güvenli tedavi sağlaması, ilaçların kararlılığını arttırması ve vücudun diğer bölgelerinde istenmeyen bir etkileşmeye neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde farmakolojik yanıt elde etmesi de istenir.

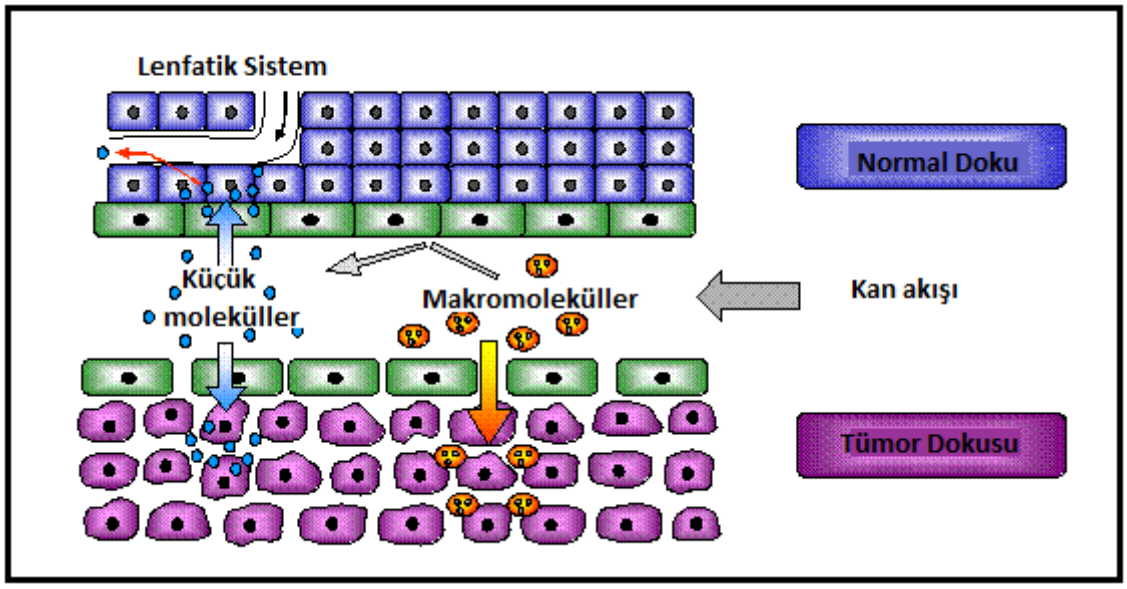
Hidrofobik ilaçları çözünür hale getirmenin ötesinde, blok kopolimer miseller aynı zamanda taşıdıkları ilacı belirli dokulara aktif veya pasif olarak hedeflendirebilirler.

Başarılı bir ilaç hedeflemenin ön koşulu in vivo dolaşım zamanlarının uzaması ve taşıyıcı içinde ilacın yeterli tutulmasıdır. Uzun dolaşım süresi sterik engellemeye sebep olur ancak bu hidrofilik kabuğun varlığı ve polimerik misellerin küçük boyutu sayesinde yenilir. Miseller böbrekler tarafından vücuttan atılımı önleyecek kadar büyük (> 50kDa), dalakta interendothelial hücre yarıkları tarafından bypass filtrasyon için oldukça küçüktür (<200 nm) [70].

2.2.6.1 Pasif Hedeflendirme

İlaçlar herhangi bir taşıyıcı sisteme yüklenmeden direk olarak enjeksiyon ya da oral yollardan alınırsa hedef bölge dışında tüm vücutta dağılır. Normal dokular ilaç molekülleri de dahil herhangi bir moleküle veya çok küçük parçacıklara karşı daha az geçirgenken, yeni oluşmakta olan kanser dokularının geçirgenliği daha fazladır. Çünkü, kanserli dokuların geçirgenliğini sağlayan gözenekleri ve hücreler arası geçiş yolları daha büyüktür. İlaç molekülleri uzun süre dolaşımda kalabilen lipozomlar, nanotanecikler, polimerik miseller gibi belirli boyutlara sahip ilaç taşıma sistemlerine yüklendikleri zaman normal dokulardan daha çok kanser hücresine yönlenirler bu da artmış geçirgenlik ve alıkoyma etkisi (Enhanced Permeability and Retention, EPR) yani pasif hedeflendirme olarak bilinir (Şekil 2.10) [38]. Bundan dolayı ilaç molekülleri vücuda nano boyuttaki tanecikler ile verilebilirse, bu dokularda diğer dokulara göre daha fazla oranda birikirler. Tanecikler yeterince küçültülebilir ve yüzeyleri uygun bir şekilde modifiye edilebilirse, bu parçacıkları yok eden RES hücrelerinden daha fazla kaçar ve bu hücreler tarafından daha az oranda yıkılırlar.

Polimerik misellere yüklenen anti-kanser ilaçlarının da EPR etkisinden dolayı pasif hedeflendirme ile seçici ve etkili bir şekilde tümörlü ve iltihaplı vücut alanlarında hedef olmayan bölgelerdekinden çok daha fazla birikmeleri beklenmektedir. Pasif hedeflendirmede bu biyodağılım misellerin yüzey özellikleri, veriliş yolları, tanecik boyutları ve taneciklerin kararlılığı gibi pek çok faktöre bağlıdır [38], [39].



Şekil 2. 10 EPR etkisi

2.2.6.2 Aktif Hedeflendirme

Aktif hedeflendirmede amaç, hedeflendirilen miseller ile hedef hücrelere ilaç salımının etkinliği ve seçiciliğini artırmaktır. Böylece yan etkiler azaldığı gibi daha iyi etkinlik de sağlanmaktadır [71]. Aktif hedeflendirme dört farklı şekilde yapılabilir:

2.2.6.2.1 Uyarı cevaplı hedeflendirme

İkinci hedefleme mekanizması, çeşitli doku ve organlardaki birçok patolojik olaya yerel sıcaklık artışı veya asidoz eşlik etmektedir ve poli (N-izopropil akrilamid)'in poli (D,L-laktit) ile veya diğer gruplarla olan kopolimerleri gibi sıcaklık veya pH duyarlı bileşiklerden oluşan polimerik miseller bu alanlarda parçalanarak yapılarında bulunan ilacı salabilirler.

2.2.6.2.2 Biyolojik uyarı ile hedeflendirme

Bu tür hedeflendirme, genellikle vücutta çeşitli doku ve organlardaki patolojik proseste bölgesel sıcaklık artışı veya asidoz meydana gelmesine dayanmaktadır. Örneğin; normal kan pH'ı 7,4 iken tümörlü bölgelerin pH değerleri 6,8-7,0 arasındadır. Bu

durumda polimerik taşıyıcının tümör alanında birikmesi ile yüklenen ilaç moleküllerinin serbest bırakılması veya sitoplazmaya girmesi için pH duyarlı blok kopolimer miseller kullanılabilir [72].

2.2.6.2.3 Dışarıdan uyarı ile hedeflendirme

Bazı ilaç taşıma sistemleri, taşıdıkları ilacı dışsal uyarılara cevap olarak bırakmak için tasarlanmışlardır. Örneğin poloksamer misellerden doksorubisinin in vitro ve in vivo salımını tetiklemek için ultrason başarıyla uygulanabilir [73]. Ayrıca, katı tümör bölgelerine uygulanabilecek yerel ısıtma işleminden de yararlanılabilir.

2.2.6.2.4 Spesifik ligantlar bağlayarak hedeflendirme

Hidrofilik blokların suya maruz kalan uç gruplarına antikorlar veya şeker parçacıkları gibi spesifik ligantlar takılabilir. Bu durumda, antikor için herhangi bir sterik engel yaratmadan miselleri hedeflendirebilmek için, misel oluşturan polimerik hidrofilik kısmının aktive edilmiş suya maruz kalan serbest ucuna seçilen bir antikor veya onun bir kısmı kimyasal olarak takılır. Spesifik hücre hedeflemede, hidrofilik bloğun uçlarına membran reseptörleri ile kolaylıkla karşılaşıp etkileşebilecek misel kabuğundan dışarıya doğru uzanan moleküller takılır. Burada hidrofilik kabuk kısmını fonksiyonlandırmanın temel amacı polimerik misellerin biyodağılımını ayarlamak ve reseptör kaynaklı endositoz ile spesifik hücresel alımı uyarmaktır. Hedeflendirilmiş miseller modifiye edilmemiş benzerlerine göre genellikle daha fazla hücresel alım ve geliştirilmiş in vitro etkinlik gösterir [74].

2.2.7 Polimerik Misel Sistemlerinin Avantajarı ve Dezavantajları

- Çözünürlüğü düşük etkin maddeleri çözünür hale getirmekte ve böylece biyoyararlanımlarını artırmaktadırlar.
- İnsan vücudu tarafından tekrar absorplanabilecek veya vücuttan atılabilecek toksik olmayan ürünlere in vivo olarak parçalanabilirler.

- PEG gibi hidrofilik bir blok varlığından dolayı gerekli bölgede etkin maddenin toplanabilmesini sağlamak için vücutta yeteri kadar uzun süre kalabilirler.
- Misel formundaki ilaç, biyolojik ortamın etkisi altında mümkün olabilecek inaktivasyondan korunur.
- İlacın toksisitesini / istenmeyen diğer yan etkilerini azaltır veya yok ederler.
- Nanometre boyutlarında büyüklüğe sahip olmaları, EPR etkisi ile istenilen bölgelere etkin bir şekilde nüfuz etmelerine ve burada birikmelerine olanak sağlamaktadır.
- Dış yüzeye spesifik ligantlar bağlanarak hedeflendirilebilirler.
- Büyük miktarlarda, kolaylıkla ve tekrarlanabilir bir şekilde üretilebilirler [75].

Bütün bu avantajların yanısıra sınırlı miktarda ilaç molekülü çözünmesi, ilaç yüklendikten sonra sudaki kararlılığın zayıf olması ve ne kadar yüksek miktarda ilaç yüklenirse kararlılığın da o kadar azalması polimerik misellerin klinik uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Polimerik misel salım sistemlerinin diğer bir dezavantajı ise *in vivo* ilaç taşıyıcısı olarak uygulamalarını sınırlandıran CMC ile ifade edilen konsantrasyona bağımlı özelliklerinin bulunmasıdır [75].

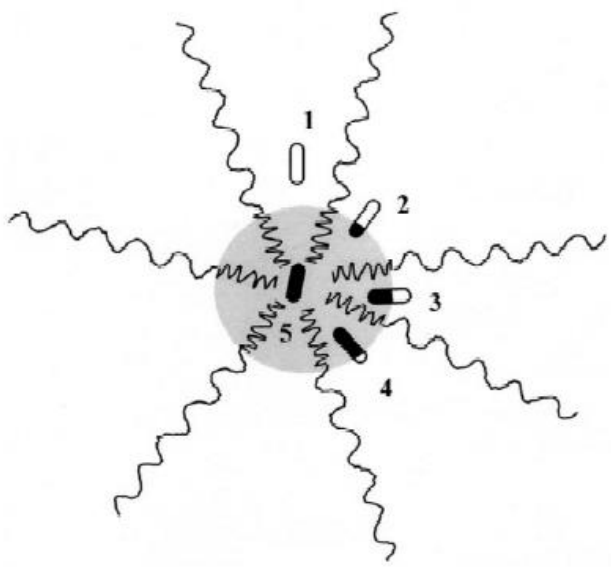
2.2.8 Polimerik Misellere İlaç Yüklenmesi

2.2.8.1 Polimerik Miseller Kullanılarak İlaçların Çözünür Hale Getirilmesi

İlaçların yaklaşık % 40'ı suda çözünmez ya da çözünürlükleri 100 µg/mL'den azdır [76]. İlaç moleküllerinin zayıf çözünürlüğünü yenmek için; ilaç molekülünün kimyasal yapısını değiştirmek, yapısına polar bir fonksiyonel grup takmak ya da tanecik boyutunu nanometre ölçeğine düşürmek gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir [77].

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılan polimerik misellerin en önemli özelliği suda çözünmeyen veya az çözünen ilaç moleküllerinin çözünürlüğünü arttırabilmeleridir. İlaçların çözünürleştirme işlemi ilk olarak misel çekirdeğindeki çözücü (su) moleküllerinin yer değiştirmesi üzerinden ilerler ve daha sonra çözündürülmüş ilaç,

hidrofobik blokları bu bölgeden uzağa iterek misel çekirdeğinin tam merkezinde birikmeye başlar. Etkili ve iyi bir çözündürme, misel çekirdeğinin çözünen ilaç ile birlikte büyümesine bağlı olarak misel boyutunda artışa neden olur [57].



Şekil 2. 11 İlacın hidrofobikliğine bağlı olarak misel içerisindeki konumu (ilaç molekülündeki siyah renk hidrofobik kısmı, beyaz renk ise hidrofilik kısmı gösterir)

Amfifilik kopolimerlerden elde edilen misellerin yapılarında anizotropik bir su dağılımı vardır ve su konsantrasyonu yüzeyden misel çekirdeğine doğru azalır. Bundan dolayı yüksek miktarda su içeren yüzeyden hidrofobik çekirdeğe doğru gidildiğinde farklı polaritelere sahip kısımlar meydana gelir. Sonuç olarak, misel içerisinde çözülecek bir ilacın miseldeki konumu onun polaritesine bağlıdır. Miselleri içeren sulu çözeltilerde, polar olmayan moleküller misel çekirdeği içerisinde çözünürken, polar moleküller misel yüzeyinde adsorbe olur ve orta polaritedeki moleküller misel tanecikleri boyunca bazı ara konumlara dağılır. Şekil 2.11'den de görüldüğü gibi 1. durumda suda çözünen hidrofilik ilaç sadece miselin kabuk kısmında adsorbe olmuşken suda hiç çözünmeyen 5. durumdaki hidrofobik ilaç molekülü ise sadece misel çekirdeğinde adsorbe olur. Farklı hidrofobik/hidrofilik orana sahip ilaç molekülleri ise 2., 3. ve 4. durumlarda gösterildiği gibi misel tanecikleri içerisinde ara konumlarda bulunur [57].

Polimerik miseller ile suda çözünmeyen hidrofobik ilaçların çözünürleştirme işlemi kısaca, çözünen ilaç ve misel çekirdeğini oluşturan hidrofobik blok arasındaki etkileşimlere bağlıdır. Bununla birlikte ilaç molekülleri ve su arasındaki yüzeyler arası etkileşimler kadar hidrofilik misel kabuğunu oluşturan blok ve çözünen ilaç arasındaki etkileşimler de çözünme işlemini etkileyebilir. Misellerin ilaç tutabilme kapasiteleri; amfifilik kopolimerin ve ilacın kimyasal yapısına, ilacın polaritesine ve dolayısıyla misel içerisindeki konumuna, sıcaklık ve pH gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Amfifilik kopolimerin hidrofobik bloğunun uzunluğunun artması hidrofobik bir ilacın misel çekirdeğindeki çözünürlüğünü kolaylaştırır.

Polimerik misellerin çözünürleştirme özelliğinin belirlenmesinde uygun bir çekirdek oluşturabilecek hidrofobik polimerin seçimi çok önemlidir. Polimer ve ilaç molekülü arasındaki etkileşim ve birbirleri ile olan uyumları kararlılık, ilaç tutabilme verimliliği ve ilaç salım kinetiği gibi birçok önemli özelliği etkiler. Örneğin, Shuai ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda PEG-b-PCL misellerine yüklenen doksorubisin miktarının polimer ve ilaç arasındaki hidrofobik etkileşimlere ve PCL kristalliğine bağlı olduğunu gösterdi [78]. Lin ve arkadaşları çeşitli poli(laktonların) (PLLA, PCL ve poli(δ-valerolakton)) hidrofobiklikleri arasındaki farkın indometasin yükleme verimliliğinde ve bu misellerden salımında bir etkiye sahip olduğunu buldu [79].

2.2.8.2 İlaç yüklü polimerik misellerin hazırlanması

Amfifilik blok kopolimerlerin oluşturduğu miseller ile ilaç taşınması farklı yollarla yapılabilir. İlaç molekülü hidrofobik çekirdeği oluşturan bloğa kimyasal olarak bağlanarak polimerik ilaçlar oluşabilir veya üzerinde yük taşıyan ilaç molekülleri karşıt yük taşıyan hidrofobik çekirdeği oluşturan blok ile elektrostatik olarak etkileşerek blok iyonomer komplekslerini oluşturur [63]. Böyle bir durumda ilacın misel çekirdeğine yüklenmesi geçici kovalent veya elektrostatik bağlanma ile misel oluşumu sırasında kendiliğinden gerçekleşir. Ancak ilaç molekülü misel çekirdeğine fiziksel olarak da bağlanabilir ve bu durumda misellere ilaç yüklenmesi misel hazırlama yöntemine bağlı

olarak farklı yollar üzerinden yürür. Hidrofobik etkileşimler, suda çözünmeyen ilaçların misel taneciklerine fiziksel olarak tutunmalarını yani çözünürlüğünün arkasındaki itici kuvveti oluşturur ve hidofobik blok uzunluğunun artması misel taneciklerine çözünmeyen ilaçların eklenmesini kolaylaştırır [63].

2.2.8.2.1 Doğrudan Çözme Yöntemi

Direk çözme yönteminde, organik bir çözücüde çözülerek kurutulan ilaç kopolimerin sudaki çözeltisine direk ilave edilir veya uçucu bir organik çözücüde çözünen ilaç önceden hazırlanan misellerin sudaki çözeltisine ilave edilir ve daha sonra çözücü sistemden uçurulur [52]. Bu işlem, daha çok poloksamer gibi kısmen hidrofobik kopolimerler için kullanılır ve çekirdeği oluşturan kısımların dehidratasyonu ile miselleşme meydana getirmek için sulu çözeltinin ısıtılmasını gerektirebilir. Bu yöntem genellikle düşük ilaç yüklenmesine neden olur.

2.2.8.2.2 Diyaliz Yöntemi

Bu yöntem suda kolaylıkla çözünmeyen amfifilik kopolimerler için uygulanır. Yüklenecek ilaç misel oluşturan kopolimerle beraber organik bir çözücüde (dimetilsülfoksit, N,N-dimetilformamid, asetonitril, THF, etanol, aseton veya dimetilasetamid gibi) çözülür ve daha sonra suya karşı diyaliz edilir [57].

Misel oluşumunu meydana getiren mekanizma, çözücü çıkarma işlemine bağlıdır. Organik çözücü su ile yer değiştirdiğinde işlem sırasında polimerin hidrofobik kısmı etkin madde yüklü misel çekirdeğini oluşturmak için şekillenir. Yapıya yavaş bir şekilde giren su misel çekirdeğinin şişmesine neden olur. Organik çözücüyü çıkarmak için suya karşı birkaç gün boyunca diyaliz yapılır. Organik çözücünün yüzdesi azaldığında sağlam, etkin madde yüklü miseller oluşturmak için misel çekirdeğindeki şişme derecesi azalır.

2.2.8.2.3 Emülsiyon Oluşumu Yöntemi

Suyla karışmayan uçucu bir organik çözücünün (diklorometan, kloroform, etil asetat gibi) kullanımını içeren su içinde yağ (o/w) emülsiyonu yöntemi ile hidrofobik bir ilacın fiziksel olarak tutulması sağlanır. Bu yöntem kullanılarak, polimer zincirleri tarafından kararlı hale getirilmiş organik çözücü damlacıkları içinde ilaç molekülleri hapsedilir ve organik fazın buharlaştırılması ile ilaç molekülleri korunur.

2.2.8.2.4 Çözücü Buharlaştırma ile Film Oluşum Yöntemi

Bu yöntem, polimer ilaç etkileşimlerini desteklemek adına polimerik bir film sağlamak için organik fazın uçurulmasını gerektirir. Isıtılmış sulu bir çözücü ile filmin tekrar sulandırılması ilaç yüklü polimerik miselleri meydana getirir. Yeterli raf ömrüne sahip enjekte edilebilir formülasyonlar üretmek için şu ana kadar bahsedilen tüm yöntemler sterilizasyon ve dondurarak kurutma adımlarını da gerektirir.

2.2.8.2.5 Dondurararak Kurutma Yöntemi

İlaç ve polimerin her ikisininde, su ve su ile karışabilen bir çözücü içerisinde çözünmesine ve daha sonra çözücülerin liyofilizasyonuna (vakumda dondurarak kurutma) dayanmaktadır. Dondurarak kurutulmuş polimer-ilaç katısının enjekte edilebilir bir taşıyıcı içerisinde yeniden çözülmesiyle ilaç yüklü miseller kendiliğinden oluşur. Su ile kolaylıkla karışabilen tersiyer butanol (TBA), yüksek buhar basıncından dolayı birçok uygulamada yardımcı çözücü olarak kullanılır. Ayrıca, TBA hızlı bir şekilde süblimleşme özelliğinden dolayı liyofilizasyon işlemini hızlandırarak yüksek derecede gözenekli dondurularak kurutulmuş katı (ince ve iğne benzeri kristaller) oluşumuna neden olur [80]. Dondurarak kurutma yöntemi ile iki hidrofobik antikanser ilacı, paklitaksel ve dosetaksel, PVP-b-PDLLA kopolimerine başarı ile yüklenmiş ve 30-60 nm büyüklüğe sahip monodispers boyut dağılımı ile kararlı küresel miseller elde edilmiştir [81].

2.2.9 İlaç Yükleme Etkinliğini Belirleyen Faktörler ve Yükleme Etkinliği

Kontrollü ilaç salım sisteminde kullanılanacak polimerik miselin etkili bir ilaç salımı gerçekleştirebilmesi için ilaca uygun çekirdek bloğunun seçimi önemli bir faktördür. Çünkü her amfifilik blok kopolimer sisteminin bütün ilaç tiplerini etkili bir şekilde salabilmesi mümkün değildir [75].

2.2.9.1 Çekirdeği ve Kabuğu Oluşturan Blokların Uzunluğu

Çekirdeği oluşturan hidrofobik bloğun uzunluğu arttıkça, miselin çekirdek boyutu ve hidrofobik ilaçları tutabilme yeteneği de artar. Kabuğu oluşturan hidrofilik bloğun uzunluğundaki artış ise CMC değerinin artmasına neden olur. Bu durumda çözelti içinde amfifilik polimerin belirli bir konsantrasyonunda bu polimerin küçük bir kısmı misel olarak bulunur ve misele bağlanacak ilaç miktarı düşer. Ayrıca ilaç molekülünün hidrofobik/hidrofilik dengesi, miselin hangi kısımlarına ilacın yerleşeceğini belirleyeceği için bu denge de yükleme etkinliğini etkileyecektir. Sonuç olarak kabuk kısmına veya çevresine yerleşen moleküller misellerden oldukça hızlı salınabilir [63].

2.2.9.2 İlaç ve Çekirdek Arasındaki Etkileşimler

Yüklenen ilaç molekülü ve çekirdeği oluşturan blok arasındaki uyum ilaç yükleme etkinliğini gösterir ve bu uyum ilacın polaritesi, yükü ve hidrofobikliği gibi özelliklere bağlıdır [51]. Bununla birlikte çözünürlüğü iyi olmayan ilaç ile en iyi uyumu sağlayan hidrofobik bloğun yapısı seçilebilir. Genel olarak, ilaç molekülü ile hidrofobik kısım veya çekirdeği oluşturan amfifilik polimerin hidrofobik yan zincirleri arasındaki yapısal benzerlik uyumluluğun bir göstergesidir. Uyumu belirlemek için suda zayıf çözünen ilaç molekülünün polaritesi ile polimerin hidrofobik bloğunun polaritesi de kıyaslanabilir. Genel bir kural olan benzer benzeri çözer kuralı (ancak polimerik misellerde çekirdek gerçekte ilacı çözmez) burada da geçerlidir. Benzer polaritelere sahip ilaç ve çekirdeği oluşturan bloklar farklı polaritelere sahip olanlara göre daha uyumludur. Polimer ve çözünen ilaç arasındaki uyumu değerlendirmek için, polariteyi kullanarak uyumluluğu

belirlemeye yardımcı olan Florry-Huggins etkileşim parametresi kullanılabilir [51], [63]. Bu parametre, x_{sp} aşağıdaki gibi tanımlanır.

$$x_{sp} = (\delta_s - \delta_p)^2 V_s / kT \quad (2.1)$$

x_{sp} : çözünmüş ilaç ve çekirdeği oluşturan polimer blok arasındaki etkileşim parametresi

δ_s : kullanılan ilacın Scatchard-Hildebrand çözünürlük parametresi

δ_p:çekirdeği oluşturan polimer bloğunun Scatchard-Hildebrand çözünürlük parametresi

V_s : çözünmüş ilacın molar hacmi

k : Boltzmann sabiti

T : sıcaklık (˚K)

İlaç ve polimerin çözünürlük parametreleri grup katkısı yöntemi kullanılarak hesaplanabilir ve ilacın çözünürlük parametresi farklı çözücü sistemlerinde ilacın çözünürlüğü ölçülerek deneysel olarak bulunabilir. Teorik olarak, x_{sp} değeri ne kadar düşükse, ilaç ve misel çekirdeği arasındaki uyum o kadar büyüktür ve bu zayıf çözünen ilacın çekirdekteki iyi enkapsülasyonunu gösterir [51].

Misel çekirdeği içerisinde ilaç enkapsülasyonunu yöneten önemli parametrelerden biri de polimer ve ilacın karışabilirliğidir. Blok kopolimerin hidrofilik-lipofilik dengesi (HLB) ve polimer/ilaç oranı (P/İ) gibi faktörlere de dikkat edilmelidir. Örneğin, PEO-b-PCL blok kopolimerlerinde, uzun PCL blokları kısa olanlara göre daha iyi ilaç yükleme etkinliği gösterir [82]. Ayrıca, hazırlamada kullanılan ilacın konsantrasyonu (P/İ oranı düştükçe) arttıkça miselin enkapsülasyon kapasitesi de artar. Bu gibi durumlarda, oldukça düşük P/İ oranı ilacın çözünürleştirilmesini sağlar. Bununla birlikte, ilaç ve çekirdek bloğu arasındaki uyum düşük olduğu zaman yeterli çözünürlüğünü elde etmek için P/İ oranı genel olarak arttırılmalıdır.

2.2.9.3 İlacın Özellikleri

İlaç molekülünün kendi hidrofilik/hidrofobik dengesi de yükleme etkinliğini etkiler, bu dengeye bağlı olarak ilaç molekülü farklı misel bölümlerinde yer alır. Kabuk bölgesinde veya kabuğa yakın yerlere yerleşen ilaç molekülleri miselden çok hızlı salınır ve bu moleküller başlangıçtaki ilaç salım hızının büyük olmasına neden olur. Bazı durumlarda ilaç molekülü çekirdekte çözünmez ve çekirdeğin içinde ayrı bir faz olarak bulunur, bu miselden ilaç salımını engeller [68].

Ayrıca daha hidrofobik olan bir ilaç molekülünün misel yapısına birleştirilmesi daha kolaydır. Torchilin tarafından sentezlenen Poli(laktit)-b-PEG misellerine Sudan siyahının birleştirilme yüzdesi yaklaşık % 65 iken, testosteron için bu oran % 1'in altındadır. Bunun sebebi Sudan siyahının (log P =7,6) oktanol:su sisteminde dağılım katsayısının testosterondan (log P =3,35) çok yüksek olmasıdır [57]. Üzerinde aktif yük taşıyan ilaçların misellere birleştirilebilmesi için misel oluşturan kopolimerin hidrofobik bloğu karşıt yüke sahip olmalıdır. Bu özellikle DNA'nın misel formlarını elde etmek için çok önemlidir.

2.2.9.4 Misel Hazırlama Yöntemi

Misellere ilaç yükleme etkinliğini belirleyen faktörlerden bir diğeri de miselleri hazırlamak için seçilen yöntemdir [52]. Ayrıca seçilen misel hazırlama yöntemine ek olarak, yönteme özgü parametreler de (organik çözücünün yapısı, çözücü oranı) misellere ilaç yüklenmesini etkiler.

Misel çekirdeğini oluşturan bloğun ilaç molekülüne olan eğiliminin yanı sıra organik fazın oranı ve yapısı gibi parametreler etkin madde yüklü polimerik misellerin hazırlanmasını ve son ürünün özelliklerini etkileyebilir. Örneğin Sant ve grubu, PEG-b-poli(alkil akrilat-ko-MAA) misellerine farklı iki yöntem kullanarak çeşitli hidrofobik ilaçlar yükledi ve su içinde yağ emülsiyon yöntemi kullanarak hazırladıkları polimerik misellerin ilaç yükleme etkinliğinde diyaliz yöntemine göre 1.5 kat artış gözlemlediler. [83].

Farklı yöntemlerle hazırlanan miseller arasındaki farklar Vangeyte tarafından bulundu. [84]. PEG-b-PCL miselleri için, diyaliz yöntemi tanecik boyutunda yeterli kontrol sağlamazken, kopolimeri içeren organik fazın hızlı bir şekilde sulu faza eklenmesi (ya da tersi) ve bunu takip eden diyaliz yöntemi ile unimodal boyut dağılımına sahip kararlı miseller oluşturuldu. Organik çözücünün yapısının, sıvı fazların eklenme sırasının ve organik fazdaki kopolimerin konsantrasyonunun formülasyonların boyutunu ve polidispersite indeksini önemli derecede etkilediği bulundu.

2.2.9.5 Diğer Parametreler

İlaç taşıyan polimerik misellerin aşırı kararlı olması da istenilen bir durum değildir. Çünkü bu durum ilaç etkinliğini ve biyoyararlanımı negatif yönde etkiler ve böyle misellerden ilaç salımı çok zor olur veya ilaç hiç salınmaz [85]. Bundan dolayı bir ilaç salım sistemi tasarlanırken, misellerin kararlılığı ile miselin ayrışarak veya bozunarak ilacı serbest bırakması arasında uygun bir denge bulunmalıdır.

Polimerik misellere yüklenen ilaç yeterince hidrofobik değilse, vücuda verildikten sonra misel yeterince kararlı olsa bile ilaç yavaşça salınabilir ancak misele yüklenen ilacın gecikmeli olarak salınması bile serbest ilaç moleküllerinden daha düşük aktivite gösterir. İlacın hidrofobik bloğa kovalent olarak bağlandığı durumlarda, ilacın misel yapısından salınabilmesi için ilaç ve polimer arasındaki bağın kırılması gerekir. Miselden ilaç salım hızı misel yapısı, misel çekirdeğinin faz durumu, dış ortamın pH değeri ve sıcaklık gibi birçok parametre ile kontrol edilebilir.

2.2.10 Polimerik Misellerden İlaç Salımı

Polimerik misellerden ilaç salımı üzerine yapılan yaygın çalışmalara rağmen blok kopolimer misellerden ilaç salım mekanizması tamamı ile anlaşılamamıştır. Bununla birlikte çoğu grup araştırılan koşullar altında misellerin sabit kalması şartıyla difüzyonun ve kopolimer bozunmasının iki temel salım mekanizması olduğuna inanmaktadır. Polimer ve ilaç arasındaki etkileşimin gücü ve biyobozunma hızı ilaç

salım hızı ile yönetilir. Bununla birlikte in vitro çalışmalarda gözlendiği gibi misellerden ilaç salım hızı genellikle kopolimer bozunmasının hızını geçer. Sonuç olarak polimerin parçalanması çoğu kez ilaç salımının ana mekanizmalarından biri olarak göz ardı edilebilmektedir. Bu yüzden ilaç difüzyonu misellerden ilaç salımının temel mekanizması olarak düşünülebilir [75].

Polimerik misellerden ilaç salımını etkileyen temel faktörler şu şekilde sıralanabilir [75].

İlacın Özellikleri: Genellikle ilaç konsantrasyonundaki artış ile ilaç salım hızı azalmaktadır. Daha büyük ve daha ağır molekül ağırlıklı ilaçlar ise daha küçük molekül ağırlıklı etkin maddelere göre daha düşük difüzyon katsayısına sahiptir.

Çekirdeği Oluşturan Bloğun Özelliği: Hidrofilik blok uzunluğunu sabit tutarak çekirdeği oluşturan bloğun molekül ağırlığını arttırmak çekirdeğin büyüklüğünü arttırır. Hidrofobik bloğun molekül ağırlığındaki ve çekirdeğin boyutundaki bu artış miselde tutulan ilacın salım hızını azaltır. Çekirdeğin yapısı, özellikle çekirdeğin hidrofobikliği ve polaritesi sulu ortama karşı çekirdeğin geçirgenliğini belirlediği için ilacın salım hızını etkiler. Çekirdeği oluşturan bloğu daha büyük olan miseller daha hidrofilik veya polar özelliğe sahip olanlara kıyasla çekirdekte daha az su bulundururlar. Daha küçük hidrofobik bloğa sahip kopolimerlerden hazırlanan miseller ise hızlandırılmış ilaç salım hızına sahiptir. Tg'si yüksek olan veya yapılarında büyük gruplar bulunduran polimerlerin hareket edebilme yeteneği sınırlıdır ve bundan dolayı yüklenen ilacın difüzyon katsayısı düşük olur.

İlaç ve Polimer Arasındaki Uyum: İlaç ve polimer arasındaki etkileşiminin artması ilacın difüzyon katsayısını azaltarak daha yavaş ilaç salımına neden olur.

Bu faktörlerin dışında misel yapısı, dış ortamın pH'sı, sıcaklığı ve ilacın misel içindeki yerleşme durumu da salım hızını etkiler.

2.2.11 Polimerik Misellerin Karakterizasyonu

2.2.11.1 Kritik Misel Konsantrasyonu

CMC değeri misellerin biyolojik performansı açısından büyük önem taşımaktadır. CMC değeri düşük miseller, geniş kan hacmi ile seyrelerek dolaşımda uzun süre kararlı bir şekilde kalabilirler. Ancak CMC değeri yüksek olan miseller vücuda verildikten sonra kanda unimerlere ayrılabilirler ve ilaç kanda çökerek agregatlar oluşturabilir. Bu durumda ilaç agregatlarının istenmeyerek biriktiği bölgelerde lokal toksisite meydana gelir [57]. Kopolimerlerin CMC değeri, toplam molekül ağırlığına, hidrofilik/hidrofobik blok oranına, hidrofilik ve hidrofobik bloğun uzunluğuna ve yapısına bağlıdır. Diblok kopolimerlerin CMC değerleri aynı molekül ağırlığına ve hidrofilik/hidrofobik orana sahip triblok kopolimerlerinkinden genellikle daha düşüktür.

Bir amfifilik molekülün kritik misel konsantrasyonunun bulunması için CMC değerinde veya CMC'ye yakın bir değerde sistemin özelliklerinde değişiklik yaratan herhangi bir fiziksel parametre (arayüzey gerilimi, iletkenlik, osmotik basınç, misel boyutu, viskozite gibi) kullanılabilir. Örneğin polimer çözeltisinin CMC değeri yüzey gerilimi ölçümü yöntemiyle şu şekilde belirlenebilir. Çeşitli konsantrasyonlardaki polimer çözeltilerinin yüzey gerilimleri Du Nouy halkası veya Wilhelmy plakası kullanılarak ölçülür. CMC değeri konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak yüzey gerilimindeki ani düşüşle gösterilir ve hava-su veya organik faz-su arayüzeyinde polimerin doygunluğunu gösterir [97].

Ancak, polimerik bir miselin CMC değeri çok düşük olduğu için bu yöntemlerle hassas olarak belirlenmesi çok zordur. Bu nedenle yüksek hassasiyete sahip HPLC yöntemi, ışık saçılması yöntemiyle tanecik boyutu ölçümü ve floresans spektroskopisi gibi sadece belirli yöntemler kullanılmaktadır [57], [58]. HPLC bazlı jel geçirgenlik kromatografisi misel içerisinde toplanan polimer zincirlerini, tek polimer zincirlerinden ayırmak için kullanılır. Dinamik ışık saçılması (DLS) tekniği misel sisteminin CMC değerini, misel boyutunu ve polidispersitesini belirlemek için kullanılan hızlı ve yüksek verimli bir yöntemdir [86]. DLS ölçümlerinde, ışık çözelti içinde süspansiyon haline getirilmiş

misellere çarptığında tüm yönlere saçılır ve zamana bağlı olarak saçılma yoğunluğu çözeltideki taneciklerin boyutunu ve dağılımını belirlemek için kullanılır.

Bu yöntemler içerisinde en hassas ve kesin olanı floresans spektroskopisidir [87]. CMC değerini floresans tekniğini kullanarak belirlemek için, floresan özellik gösteren maddeler misellerin içinde enkapsüle edilir ve çeşitli misel konsantrasyolarında floresanslarının bulundukları ortama bağlı olarak değişmesinde yararlanılarak bu maddenin salımı spektrofotometre ile ölçülür [88]. Diğer yöntemlere göre daha düşük polimer konsantrasyonlarında CMC değerinin başlangıcını belirleyebildiğinden ve misel çekirdeği ile birleşme eğiliminden dolayı floresan boya olarak sıklıkla hidrofobik piren kullanılır.

Piren kendisini çevreleyen ortamın polaritesine karşı hassastır. Polimer çözeltilerine piren eklendiğinde CMC değerinin altında, piren polar bir ortamda yani suda çok küçük bir miktarda çözünür, ancak miselleşme işlemi sırasında piren molekülü tercihen hidrofobik ve polar olmayan misel çekirdeğinde tutulur ve eşzamanlı olarak spektroskopik özelliklerinde değişiklikler meydana gelir [57]. Amfifilik polimerin farklı konsantrasyonlarında piren molekülünün verdiği floresans şiddeti takip edildiğinde, sulu ortamlarda hidrofobik çevreye karşı pirenin 3 farklı davranışı gözlenir. Eksitasyon spektrumunun maksimumunda bir kırmızı kayma, pirenin birinci ve üçüncü titreşim bantlarının şiddetlerinin oranında (I_1/I_3) bir azalma ve floresans ömründe 200 ns'den 350 ns'ye bir artış görülür [89].

Polimer konsantrasyonunun logaritmasının I_1/I_3 bantlarının şiddetlerinin oranına karşı çizilen grafiğin eğiminin aniden değiştiği nokta CMC değerini verir. Floresan teknikleri ile CMC belirlenirken miselleşme olduğunda eğimdeki değişimi tam olarak tespit edebilmek için piren konsantrasyonu oldukça düşük tutulmalıdır (10^{-7}M). Ayrıca, emisyon sıcaklık, pH ve iyonik güç gibi çevresel faktörlere karşı çok hassas olduğu için floresan deneyleri dikkatli yapılmalıdır.

2.2.11.2 Tanecik Boyutu ve Boyut Dağılımı

Polimerik misellerin en ilgi çekici özelliklerinden biri tanecik boyutlarının (10-100 nm) küçük olmasıdır. Bu özellik kopolimerin molekül ağırlığı, misel hazırlama yöntemi, hidrofobik ve hidrofilik blokların oranı gibi faktörlere bağlıdır [9]. Misellerin tanecik boyutu ve boyut dağılımı (polidispersitesi) DLS tekniği ile doğrudan ölçülebilir. DLS yöntemi, ayrıca polimerik misellerin küreselliği hakkında da bazı bilgiler verir.

DLS ile izotonik bir tamponda veya suda dağıtılan misellerin ölçümü yapılmaktadır. Taneciklerin boyutları Brownian hareketlerinin hızıyla ilgilidir. Brownian hareketleri taneciği çevreleyen çözücü moleküllerinin bombardıman hareketi ile meydana gelen hareketlerdir. Tanecikler büyük olduğunda Brownian hareketleri yavaş olurken, taneciklerin küçük olması halinde çözücü molekülleri taneciklere daha fazla çarpar ve tanecikler daha hızlı hareket ederler. Taneciklerdeki bu hareketlilik farkından dolayı ışık kaynağından gönderilen ışık saçılımı farklı dalgalanmalar gösterir. Küçük tanecikler daha hızlı hareket ettiği için saçtıkları ışığın sıklığındaki dalgalanma hızı büyük taneciklerdekinden daha hızlıdır. Bu esasa dayanarak DLS saçılan ışığın sıklığındaki dalgalanma hızını ölçer ve bu ölçümleri taneciklerin hidrodinamik çaplarını hesaplamak için kullanır.

Miseller oldukça dar boyut dağılımına sahiptirler fakat hidrofobik çekirdeğin hidrofilik zincirler ile kaplanması yetersiz olduğu durumlarda agregasyona meyillidirler [75]. Misellerin boyut ve boyut dağılımı diyaliz yöntemiyle misel oluşturulurken polimeri çözmek için kullanılan çözücünün cinsinden etkilenebilir [90]. Misellerin boyutu özellikle in vivo davranışlarında önemli bir etkiye sahiptir çünkü misellerin endotel tabakasından geçişi ve böbreklerdeki filtrasyonu boyutlarına bağımlı durumdadır.

Ayrıca misel boyutu atomik kuvvet mikroskobu (AFM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile de hesaplanabilir.

2.2.11.3 Misellerin Yükü

Polimerik misellerin yüzey karakterizasyonunda en çok kullanılan parametre zeta potansiyel değeridir. Polimerik misellerin sahip oldukları yüzey yükleri hem vücuttaki dağılımlarını etkilemekte hem de hücreler tarafından tutulmalarında rol oynamaktadır. Zira hücre membranları negatif yüklüdür ve pozitif yüklü polimerik misellerin için yüksek bir ilgi göstermektedirler. Bu nedenle hücre membranları ile olan etkileşimi artırabilmek için son yıllarda yüzeyi nötral veya negatif yüklü (anyonik) olan nanopartiküllerin pozitif yüklü (katyonik) yapıya yönelik modifikasyonları ağırlık kazanmıştır [91].

Polimerik misellerin yüzeyindeki değişiklikler ve misellerin elektriksel yükü zeta potansiyeli değeriyle belirlenir. Zeta potansiyeli, kolloidal sistemlerin özelliklerinin anlaşılmasını, kontrol edilmesini ve tanecikler üzerindeki elektriksel yükün ya da potansiyelin belirlenmesini sağlar. Bir sıvı içerisinde dağılmış olan tanecikler genellikle yüzeylerinde bir yük taşırlar. Eğer sıvıya bir elektrik alan uygulanırsa bu yüklü tanecikler uygulanan alanın pozitif ya da negatif kutbuna doğru hareket ederler. Onların seçtiği yön taşıdıkları yükün işaretini net bir şekilde gösterir ve geçiş hızları da taşıdıkları yükün büyüklüğü ile orantılıdır. Böylece belirli bir elektrik alanın etkisi altında ölçülen parçacık hızı ve yönü kullanılarak zeta potansiyeli (ζ) hesaplanabilir [92].

Kolloid tanecikler üzerindeki yük sistemin kararlılığı açısından çok önemlidir. Misellerin zeta potansiyeli onların kolloidal kararlılığının bir göstergesidir. Ayrıca hücrelere alım ve taneciklerin farmakokinetiklerinin ayarlanmasını sağlayan hücre membranları ve proteinler gibi biyolojik maddeler ile etkileşimlerini de etkiler. Genel olarak zeta potansiyelin değeri -35 mV'dan düşük (negatif yüklü tanecikler için) ve +35 mV'dan büyük (pozitif yüklü tanecikler için) olmalıdır. Pek çok durumda daha yüksek zeta potansiyel değeri kolloit taneciklerin üzerindeki yükün büyüklüğünü ve disperse haldeki tanecikler arasında daha güçlü bir itme etkileşimini, daha yüksek kararlılığı ve tekdüze çap oluşumunu gösterir [93].

2.2.11.4 Misellerin Kararlılığı

Farmasötik ilaç yüklü misellerin dolaşımda uzun süre kalarak ilacı hedeflenen bölgeye taşıyabilmeleri ve burada yeterli miktarda birikmeleri sağlanana kadar kararlı olmaları gerekir. Ayrıca bu ilaç taşıma sistemleri miseli oluşturan tek zincirli hallerine yavaş yavaş ayrışmalı ve vücuttan kolay ve sorunsuz olarak uzaklaştırılabilmelidir. Polimerik misellerin kararlılığı termodinamik ve kinetik kararlılık olmak üzere iki şekilde incelenir. Termodinamik kararlılık, miseller oluşurken dengeye ulaşana kadar sistemin nasıl davrandığını tanımlarken, kinetik kararlılık ise sistemin zaman içindeki davranışını karakterize eder [55].

2.2.11.4.1 Termodinamik Kararlılık

Amfifilik blok kopolimerlerin kendiliğinden misel oluşturabilmeleri termodinamik bir süreçtir [55]. Sulu ortamdaki kopolimer konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun üzerinde olduğunda polimerik miseller termodinamik olarak kararlıdır. Çözelti konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun altında ise sulu ortamdaki amfifilik blok kopolimerler yığın fazda ve hava-su arayüzeyinde tek zincirler halinde bulunurlar. Polimer konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun üstüne çıkarıldığında ise hidrofobik blokların sulu çevreden uzaklaştırılarak kendiliğinden misel oluşturmalarının arkasındaki itici kuvvet, sistemin Gibbs serbest enerjisini düşüren hidrofobik etkileşimlerdir [51], [94]. İlaç salım sistemlerinde, polimerik miseller fizyolojik çevreye girdiklerinde CMC'nin düşük olması seyrelme ile ayrışmaya karşı misellerin daha dirençli olduğunu gösterir. Negatif ΔH° değerine sahip olan polimerlerde sıcaklığın CMC üzerindeki etkisi tam tersidir ve sıcaklığın artması ile CMC değeri de artar [51].

Polimerik miseller düşük CMC değerlerinden dolayı hem in vitro hem de in vivo olarak yüksek termodinamik kararlılık gösterirler ve buna bağlı olarak CMC, seyreltme sırasında misellerin termodinamik kararlılığını belirlediği için ilaç salım sistemlerinin tasarlanması için çok önemli bir parametredir [55], [75]. İntravenöz (damar içi)

enjeksiyon uygulamalarında polimerik misellerin dolaşımda seyrelmesi sonucunda kopolimer zincirleri ayrılıp kan akışına ilacı erken salacağından hedef alanda ilaç yetersiz şekilde birikecek ve kanda toksik etki yaratacağı için blok kopolimer misellerin termodinamik kararlılığı çok önemlidir [52], [75].

Amfifilik kopolimerlerin hidrofobik bloğunun uzunluğu ve bileşimi direk olarak kararlılıkla ilişkilidir [95]. Kopolimerin hidrofobikliğini arttırmak hidrofobik çekirdeğin kohezyonunu arttırarak CMC değerinin düşmesine neden olur ve polimerik misele daha yüksek termodinamik kararlılık kazandırır [88], [96]. Maksimum kararlılık için kopolimerin hidrofilik ve hidrofobik zincir uzunlukları arasında bir denge olmalıdır. Belirli bir noktadan sonra hidrofobik zincir uzunluğunun artması misel şeklini bozar ve küresel olmayan agregatlar elde edilir.

Termodinamik kararlılık kabuktaki polimer zincirlerinin birbirleri ve sulu ortam ile olan etkileşimlerinden de etkilenir. İlaç taşımada kullanılan polimerik misellerin birçoğunda hidrofilik blok olarak PEG kullanılır. Bağımsız PEG zincirleri moleküllerarası Van der Waals kuvvetleri ile etkileşir, PEG zincirleri hidrojen bağı ve dipol/dipol kuvvetleri gibi hidrofilik etkileşimlerle çözeltideki su ile etkileşir [97]. PEG zincir uzunluğunun ve yüzey yoğunluğunun artması, polimerleri daha sert ve daha uzun fırça benzeri biçimlerde bulunmaya zorlayacaktır. Buna karşın, düşük molekül ağırlıklı PEG zincirleri ve düşük yüzey yoğunluğu, misellerin yüzeyinin sınırlı olarak kaplanmasına ve bundan dolayı hidrofobik çekirdeğin sulu ortama maruz kalmasına neden olarak misel kararsızlığına yol açar. Hidrofobik çekirdeğin sulu ortama maruz kalmasını önlerken yüzey zincirlerinin akışkan hareketine olanak sağlayan yeterli bir hidrofobik polimer yüzey kaplaması gereklidir.

İlaç molekülü ile hidrofobik çekirdek arasındaki etkileşim de misel kararlılığını etkileyebilir. Enkapsüllenmiş hidrofobik ilaç, çekirdek ve ilaç arasındaki hidrofobik etkileşimlerden dolayı miseli kararlı bir halde tutar. Lee ve arkadaşları, hidrofobik bloğunda farklı miktarlarda karboksilik asit grubu içeren PEO-b-PLA misellerinin CMC değerini ve bu misellerde enkapsüle edilen papaverinin salımını ilaç ve polimer

çekirdeği arasındaki kohezif kuvvetler yönünden inceledi. İyon etkileşimleri açısından daha fazla karboksilik asit fonksiyonluluğu içeren blok kopolimerin papaverin yükleme etkinliğini arttırdığı gözlendi. İlaç ve misel çekirdeği arasında gelişen bu etkileşimin CMC değerini ve ilaç salım hızını düşürdüğü bulundu [98].

2.2.11.4.2 Kinetik Kararlılık

Kinetik kararlılık misellerin zaman içindeki davranışını (unimerlere ayrışması) ve hatta CMC'nin altındaki bir konsantrasyona seyreltilseler bile ilaç taşıma görevini yerine getirmek için yeterince uzun süre dolaşımda bulunabileceklerini gösterir. Bir misel sisteminin kinetik kararlılığı yığın ve misel arasındaki tek polimer zincirlerinin değişim hızı ile ilgilidir. Bir misel sisteminin kinetik kararlılığı çekirdeği oluşturan polimerin fiziksel haline, amorf veya kristal yapıda olmasına bağlıdır ve çekirdeği oluşturan bloğun camsı geçiş sıcaklığı (T_g) önemli rol oynamaktadır. Misel çekirdeğini oluşturan hidrofobik blok yarı kristal yapıda ise misel yapının T_g veya erime sıcaklığı (T_m) değerine bağlı olarak kritik misel konsantrasyonunun altındaki seyrelmelerde bile misel sistemi uzun süre kinetik olarak kararlı kalabilir. Camsı geçiş sıcaklığı 37°C'yi aşan hidrofobik bloğa sahip olan blok kopolimer miseller donmuş çekirdeğe sahip olarak adlandırılır, çekirdekteki zincirlerin moleküler hareketliliği kısıtlanır ve seyreltilmesi üzerine genellikle yüksek kinetik kararlılık gösterirler [63]. Çekirdeği oluşturan bloğu daha düşük T_g'ye (37˚C'nin altı) sahip olan miseller ise T_g'nin yukarısındaki sıcaklıklarda çekirdeği oluşturan polimer zincirlerinin serbest hareketleri sonucunda daha yüksek T_g'si olanlardan daha hızlı ayrışma eğilimindedir [52], [75]. Blok kopolimer misellerin yüksek kristal yapıdaki çekirdeği misel kararlılığına katkıda bulunur ve çekirdekten ilacın difüzyon hızını azaltarak misel sistemine yüksek oranda ilaç tutabilme özelliği kazandırır. Polimerin aşınma ile içindeki ilacı salabilmesi için T_g > 37˚C olması gerekir ayrıca ilaç yarı kristal bir polimerin kristal bölgesinden difüze olamaz.

Kısaca, misellerin kararlılığının bozulmaması için polimerik miseller tercihen vücut sıcaklığında camsı veya kristal bir çekirdeğe sahip olmalıdır ve düşük kritik misel

konsantrasyonlu kopolimerlerden oluşmalıdır [94]. Bununla birlikte ilaç taşıma uygulamalarında, misellerin bulunduğu ortam sürekli aşırı ve şiddetli değişimlere maruz kalır. Misel ortamında meydana gelecek herhangi bir değişiklik veya aşırı seyrelme sistemin kararlılığını etkileyebilir ve miseller dağılmaya başlar. Örneğin, kan bileşenlerinin varlığı çoğunlukla misellerin kararlılığını bozar ya da misel çekirdeğine yüklenen etkin maddenin erken salımına yol açar.

Misellerin kararlılığı üzerine yapılan çalışmalara birkaç örnek verilebilir. Kataoka ve arkadaşları PEG-b-PDLLA kopolimerlerinin CMC değerlerinin sıcaklığa olan bağlılığını inceledi ve Tg'nin altındaki sıcaklıklarda CMC değerinin sabit olduğunu Tg'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise büyük ölçüde arttığını gözlemledi. Bu sonuç çekirdek akışkanlığının arttığını ve misellerin kararlılığındaki azalmayı gösterir [99]. Yamamoto ve arkadaşları ise hidrofobik PDLLA'nın camsı geçiş sıcaklığının yukarısında, sistemin kinetik kararlılığını azaltan bir sıcaklıkta, PEG-b-PDLLA misellerinin CMC'sinde büyük bir artış bulmuşlardır [100].

Ayrıca, iyonik kopolimerlerden elde edilen misellerde iyonik gruplardan dolayı kararsızlık sorunlarının ortaya çıktığı Cha ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır. Anyonik metoksi poli(etilen glikol)-b-oligo(L-aspartik asit)-b-poli(ε-kaprolakton) kopolimer misellerine paklitaksel yüklemişler ve kararlılığını incelemişlerdir. Bu misellerin kararlılığını artırmak için kopolimerdeki aspartik asitin karboksil grupları ile kalsiyum katyonları arasında elektrostatik etkileşimler oluşturulmuş ve anyonik blokların yapılarında bir tabaka oluşumu sonucunda kararlılıkları arttırılmıştır. Ayrıca iyonik olarak kararlı misellerin kararlı olmayanlara göre salım özellikleri de iyileşmiş ve kararlı hale getirilen paklitaksel yüklü misellerde kararlı olmayanlara göre ciddi bir tanecik boyutu artışı gözlenmemiştir [101].

Sonuç olarak; misellerin kararlılığı çekirdeği oluşturan polimerin fiziksel durumuna (kristal veya amorf), misel çekirdeğinde hazırlama işleminden dolayı kalan organik çözücü kalıntılarına, hidrofobik bloğun uzunluğuna, kopolimerin hidrofilik/hidrofobik

blok oranına ve çekirdekte hidrofobik ilaç moleküllerinin tutulması gibi birçok faktöre bağlı olan misel çekirdeğindeki etkileşimlerin sağlamlığı ile ilgilidir [52], [75], [94].

2.2.12 Misellerin Morfolojisi

Amfifilik blok kopolimerlerden elde edilen misellerin çekirdek ve kabuk kısımları arasında net ayrım olan küresel tanecikler olduğu kabul edilmektedir. Ancak dengede, dengeye yakın veya dengede olmayan durumlarda farklı yapılar (çubuklar, çeşitli veziküller, tüp ya da ince boru, altıgen şeklinde sıkıştırılmış içi boş çemberler, büyük birleşik miseller ve lameller gibi) oluşabilir.

İlaç taşıyıcı sistemlerin şekil morfolojileri polimerik misellerden ilaç salımını etkileyen önemli parametrelerden bir tanesidir. Misellerin morfolojisi atomik kuvvet mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) veya geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenebilir. Bu tekniklerin kullanılabilirliği kolloidal sistemin yapısal özelliklerine göre değişkenlik göstermektedir. Bunların içinden yüksek çözünürlüğü ve kolay numune hazırlama avantajları nedeniyle en çok tercih edilen yöntem olan SEM analizi, görüntüleme esnasında uygulanan yüksek vakum nedeniyle gerçekleştirilen altın kaplama prosesi açısından pek çok nano boyutta taneciklere sahip sistemlerin görüntülenmesine uygun değildir. Çoğu zaman gerçekleştirilen altın kaplama işlemi misel yapısının yüzeyini örtmektedir ancak bu durum kaplama kalınlığının en az 20 nm olmasıyla aşılabilir [102].

SEM, moleküler ve kolloidal büyüklükteki taneciklerin büyüklük, şekil ve yapılarının incelenmesinde kullanılmaktadır. SEM'de elektron ışını yaklaşık 5 nm'lik bir noktanın altına odaklanır ve örnek taranır. Elektronlar oldukça küçük olduklarından ve hidrokarbon veya gaz molekülleri tarafından kolaylıkla saçılabileceklerinden vakum ortamında çalışılmalıdır. Örnek alüminyum stub üzerine yerleştirilir ve görüntüyü engelleyen elektrostatik yükün birikmesini önlemek için altın gibi iletken bir maddeyle kaplanır. Işın taranan örnek yüzeyinden düşük enerjili ikincil elektronlar üretir, bu

elektronlar toplanır ve örnek yüzeyinin üç boyutlu görüntüsünü monitör üzerinde yansıtır.

Eğer hassasiyet gerekli ise TEM, boyut analiz için tercih edilen bir yöntemdir. TEM, elektron demetinin bir örnek üzerinden geçirilerek örneğin bir görüntüsünün çıkarılmasına dayanır. Elde edilen bu görüntü büyütülerek floresan bir ekrana veya fotografik bir film üzerine yansıtılır. Burada dispersiyon örnek, ince polimer veya karbon film kaplı bir grid üzerine yerleştirilir. Grid kuruduktan sonra mikroskop kolonuna yerleştirilir. Elektron ışını floresan ekran üzerine odaklanmış bir görüntü oluşturur. Tanecik boyut analizi için güven aralığı ~10 nm ile 1 µm arasındadır. SEM'in çözünürlüğü TEM'den daha azdır ve odaklanan veya taranan noktanın büyüklüğü ile sınırlıdır [103]. AFM ise örneklerin üç boyutlu görüntüsünü ve boyutunu elde etmek için kullanılmaktadır.

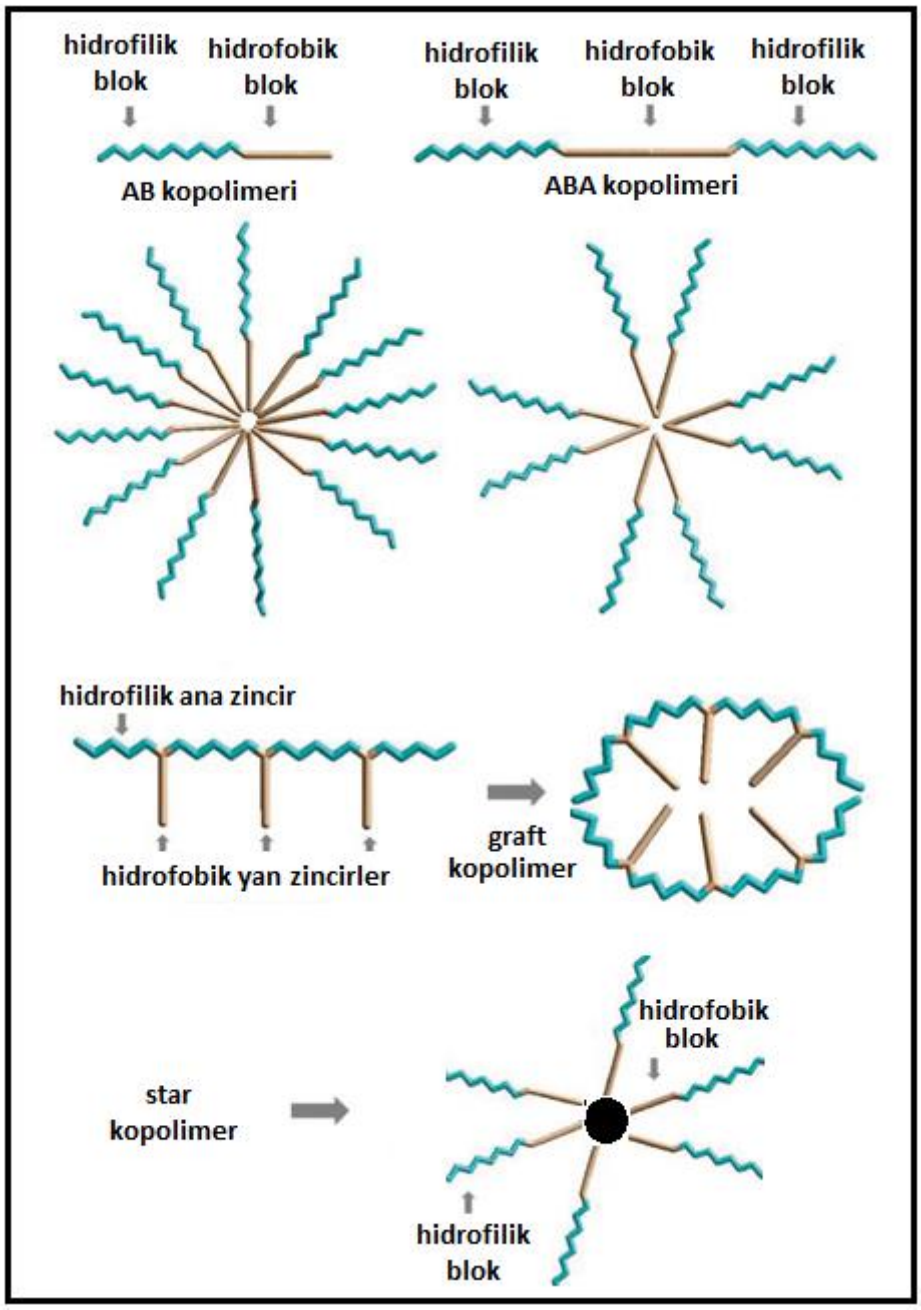
2.2.13 Polimerik Misellerin Hazırlanmasında Kullanılan Kopolimerler

Polimerik miseller; çekirdek kısmını oluşturan hidrofobik bir blok ve kabuk kısmını oluşturan hidrofilik bir blok içeren AB tipi diblok kopolimerlerden, ABA, BAB veya ABC (C: hidrofilik/hidrofobik polimer) tipi triblok kopolimerlerden, graft kopolimerlerden veya yıldız şekilli kopolimerlerden meydana gelirler (Şekil 2.12).

Amfifilik kopolimerlerin misel oluşturabilmeleri için miselin kabuğunu oluşturan hidrofilik blok ile çekirdek kısmını oluşturan hidrofobik bloklar arasında bir denge olmalıdır. Molekül ağırlığı 1-15 kDa olan PEG blokları genellikle hidrofilik bloğu oluştururken, çekirdeği oluşturan hidrofobik bloğun uzunluğu ise hidrofilik bloğun uzunluğuna yakın veya biraz daha kısa olmalıdır [57]. Şekil 2.12'de gösterilen misel oluşturabilen farmasötik diblok ve triblok kopolimerler anyonik-katyonik polimerizasyon, halka açılma polimerizasyonu, radikal polimerizasyon veya kontrollü polimerizasyon türleri kullanılarak sentezlenebilirler. Bu yöntemler hidrofilik ve hidrofobik blokların uzunluğunu kontrol ederek farklı molekül ağırlıklarında (1.000-10.000 Da) amfifilik kopolimerlerin sentezlenmesine olanak sağlar. Blokların molekül

ağırlığını ve onların kopolimerdeki molar oranlarını değiştirerek misel oluşturan polimerlerin çeşitli fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri kontrol edilebilir.

Diblok kopolimerlerde hidrofilik PEG zincirleri çeşitli hidrofobik bloklarla konjuge olmuşken triblok kopolimerlerde hidrofilik veya hidrofobik bloğun her iki ucuda üçüncü bir bileşenle bağlanabilir. Farmasötik triblok kopolimerlerin en genel örneği, hidrofilik etilen oksit birimlerinin hidrofobik propilen oksit birimleri ile oluşturduğu Pluronic olarak bilinen triblok kopolimerlerdir. Graft kopolimerlerde ise, hidrofobik ve hidrofilik yapıdaki polimer zincirleri hidrofilik veya hidrofobik birimlerden oluşan ana zincir boyunca dağılmıştır [57].



Şekil 2. 12 Farklı tip amfifilik blok kopolimerlerden hazırlanan polimerik miseller [57]

İlaç taşıma amaçlı kullanılan birçok amfifilik kopolimer hidrofobik blok olarak biyouyumlu toksik olmayan bir poliester, polieter veya poli(amino asit) türevi içerir. Poli(D,L-laktik asit) (PDLLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve poli(ε-kaprolakton) (PCL) insanlarda biyomedikal uygulamalarda kullanımı için FDA tarafından onaylanan biyouyumlu ve biyobozunur poliesterlerdir [52]. Poli(aspartik asit), poli(glutamik asit),

poli(L-lisin) ve poli(histidin) ise ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan poli(L-amino asit)lerdir. Ancak, bu polimerlerin amfifilik miselleri oluşturması için poli(amino asit) bloğunun elektrostatik olarak nötr olması veya hidrofobik kısımlara konjuge edilmesi gerekir. Amino asit bazlı blok kopolimerler, biyobozunur, biyouyumlu ve çok yönlü yapıda olduklarından dolayı ilaç taşınımında yaygın olarak çalışılmaktadır [6]. Polieterler, amfifilik miselleri hazırlamak için kullanılan diğer bir polimer sınıfıdır. Farmasötik ilgi konusu olan polieterlerin çoğu PEG-b-PPG-b-PEG kopolimeri gibi poloksamer grubuna aittir [52].

Misel oluşumunda kullanılan D,L-laktit, ε-kaprolakton ve δ-valerolakton gibi poliesterler güvenli oluşları ve çözündürme yetenekleri nedeniyle çok kullanılırlar ve bu polimerler kalay oktoat varlığında halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenirler [104]. Polimerizasyonlarda kalay oktoat dışında başka katalizörler de kullanılabilir, örneğin Piao ve arkadaşları farmasötik uygulamalarda kullanılacak kopolimerlerin hazırlanması için ε-kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonunu ksilen içerisinde toksik olmayan bir katalizör olan kalsiyum ammoniat ile yapmışlardır [105].

Poli(amino asit) ve poliesterlerin yanısıra, ilaç taşıma sistemlerinde vinilik monomerlerin kullanımı da yaygındır ancak biyobozunur olmadıklarından dolayı parenteral olarak uygulandığında sistemik olarak vücuttan atılmalarını sağlamak için molekül ağırlıkları böbrek dışkılama sınırının altında tutulmalıdır. Bazı durumlarda, kısa ancak iki tane uzun zincirli yağ açil grubundan dolayı son derece hidrofobik olan fosfolipitler ve fosfatidil etanolamin gibi lipit türevleri hidrofobik çekirdek oluşturan grup olarak kullanılabilir [106].

Polimerik misellerin, plazma proteinleri ve hücre membranları ile direk olarak etkileştikleri kabuk kısmını oluşturan hidrofilik polimer misel için etkili sterik korumayı sağlar. Bu kısım miselin hidrofilitesini, yükünü, boyutunu, hidrofilik blokların yüzey yoğunluğunu ve hedeflendirme ajanlarının yapıya eklenebileceği uygun reaktif grupları belirler. Bu özellikler farmakokinetik, biyodağılım, dolaşımda kalma süresi, biyoyüzeylere adsorpsiyon ve hedeflendirme gibi polimerik misel taşıyıcıların önemli

biyolojik özelliklerini kontrol eder [57], [58]. Hidrofilik blok olarak poliakrilamit, poli(hidroksietil metakrilat), poli(N-vinil pirolidon) (PVP), poli(vinil alkol) (PVA) gibi polimerler kullanılmasına rağmen çoğunlukla poli(etilen glikol) (PEG) kullanılır. Bu polimer iyi çözünmesi, yüksek hidrate olması ve biyolojik ortamda çeşitli mikro parçacıklar (miseller, lipozomlar, nanotanecikler ve nanokapsüller) için etkili bir sterik koruyucu olmasından dolayı diblok ve triblok kopolimerler için hidrofilik blok olarak kullanılır.

Bazı durumlarda, başlangıç kopolimeri iki hidrofilik bloktan hazırlanabilir, daha sonra bu bloklardan biri hidrofobik bir farmasötik ajan (örneğin taksol, sisplatin, antrasislin antibiyotikler, hidrofobik teşhis birimleri, vb) ile modifiye edilerek amfifilik misel oluşturan kopolimer elde edilir [107].

Polimerik miscllerin ilaç salımında kullanılmaları üzerine yapılan çalışmalara birkaç örnek verilebilir. Pluronikten elde edilen misellere eklenen Doxurobicinin, insan tümörlerinin farelerde yapılan deneysel tedavisinde kullanımı serbest ilaçla kıyaslandığında; ilacın yan etkilerinin ve toksisitesinin önemli derecede azaldığı gözlendi [108]. Kim ve arkadaşları sentezledikleri diblok kopolimerlerden hidrofobik çekirdeğini poli(ε-kaprolakton)'un hidrofilik kabuk kısmını ise poli(etilen glikol)'un oluşturduğu polimerik miselleri hazırlamış ve bu misellerden in vitro ortamda indometasin salımını incelemişlerdir [109]. Ayrıca PEO-b-PCL blok kopolimerine pH duyarlı özellik katacak poli(akrilik asit) ve poli (metakrilik asit) bağlanarak nifedipen salımındaki etkinlikleri incelenmiştir [110]. Liggins ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mPEG-b-PDLLA diblok kopolimerlerini sentezlemiş ve bu kopolimerlerden elde edilen misellere paklitaksel yüklemişlerdir. İlaç yüklü bu misellerin in vivo olarak uygulanmasının ardından en yüksek ilaç konsantrasyonunun karaciğer, böbrek, kan, dalak, akciğer ve kalpte bulunduğu tespit edilmiştir [111]. Poli(dimetilaminoetil metakrilat)-b-poli(ε-kaprolakton)-b-poli(dimetilaminoetil metakrilat) (PDMAEMA-PCL-PDMAEMA) triblok kopolimerlerinden biyobozunur katyonik miseller hazırlanmış ve kanser hücrelerine siRNA ve paklitaksel salımında kullanılmıştır [112]. Polimerik

misellere pH duyarlı özellik kazandırmak amacıyla Hwang ve arkadaşları, iyonlaşabilen amin grupları içeren PEG-poli (β-amino ester) amfifilik blok kopolimerlerini sentezlemişlerdir [113].

Amfifilik yıldız şekilli kopolimerler tek moleküllü miseller olarak davranırlar ve çok düşük kritik misel konsantrasyonlarında hazırlanabilirler. Choi ve arkdaşları L-laktit ve ε-kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonunu dört ve sekiz kollu PEO ile başlatarak yıldız poli(etilen oksit)-b-poli(L-laktik asit) (yıldız PEO-b-PLA) ve yıldız PEO-b-poli(ε-kaprolakton) (yıldız PEO-b-PCL) kopolimerlerini sentezlemişlerdir [114]. Antikanser ilaçlarının vücuda verilmesi için Dong ve arkadaşları gliserol kullanarak 3 kollu yıldız şekilli PCL-b-PEG kopolimerlerini sentezlemişlerdir. Sudaki çözünürlüğünü arttırmak için bir antikanser ilacı olan honokiol bu kopolimerlerden elde edilen misellere yüklenmiş ve in vitro ortamda salım çalışmaları yapılmıştır [115].

2.2.13.1 Poli(etilen glikol) (PEG)

Sulu ortamda, PEG miselin çekirdeğinden dışarı doğru uzanan yoğun fırça görünümlü polimer zincirleri oluşturur. Bu hidrofilik kabuk misel-misel veya misel-protein (opsonin) etkileşimlerini sınırlayan fiziksel bir kalkan olarak davranır [51].

Amfifilik misellerde kullanılan PEG'in molekül ağırlığı çekirdeği oluşturan bloğun boyundan daha uzun veya ona eşit uzunlukta bir zincir olmakla birlikte genellikle 1000 ve 12000 g/mol arasındadır. PEG biyouyumlu, düşük toksisite ve düşük immünojeniteye sahip FDA tarafından biyolojik sistemlerde kullanımı onaylı olan bir polimerdir. PEG'in sudaki çözünürlüğünün çok iyi olması, fazla hareketliliği ve büyük kaplama hacminden dolayı misel çekirdeğinin yüzeyler arası serbest enerjisini düşürerek miseller arası hidrofobik etkileşimleri engeller ve polimerik misellerin sterik kararlılığını sağlar.

In vivo olarak hidrofilik PEG bloklarının görevi, RES tarafından vücuttan atılımı ve misel yüzeyine opsoninleri içeren kan proteinlerinin adsorpsiyonunu önleyerek miselin sterik kararlılığını sağlamaktır. In vitro olarak sulu ortama maruz kalan PEG zincirleri Van der

Waals kuvvetlerinin sebep olduğu tanecikler arası çekimi engelleyerek agregasyon olayının önlenmesini sağlar. İlaç taşıyıcı polimerik misellerin yüzeylerine sadece protein adsorpsiyonunu ve RES aracılı klirensi sağlamayıp aynı zamanda biyodağılım, kararlılık, ilaç salım profili gibi önemli özellikleri de etkilediği için PEG kabuğunun koruyucu kapasitesi birincil öneme sahiptir. Miselleri koruma etkinliği PEG bloklarının yüzey yoğunluğuna ve koruyucu tabakanın kalınlığına bağlıdır.

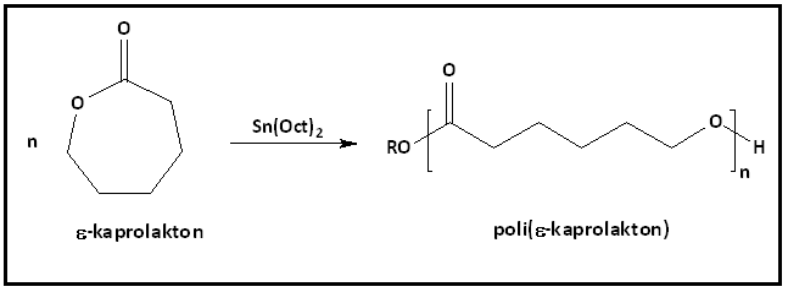
Poli(etilenimin) (PEI) gibi pozitif yük içeren çekirdeklerde, PEG kabuğunun nötral yapısı çekirdeği etkili bir şekilde korur, biyolojik çevrede negatif yüklü plazma proteinleri ile spesifik olmayan etkileşimleri önler ve böylece uzun süreli dolaşım süreleri sağlar [116]. Ayrıca, PEG zincirlerinin uzunluğu genellikle 1 ila 15 kDa arasında iken, bazı veriler zincirler uzadıkça ve fırça yoğunlaştıkça elde edilen tutma etkisi ve kanda dolaşım sürelerinin daha da büyüdüğünü gösterir.

PEG kullanımının yukarıda belirtilen belirli avantajları olmasına rağmen, özellikle klinik uygulamalarda birkaç büyük sakıncası da vardır. Sentez sırasında polimerin kendisine veya yan ürünlerine karşı immünolojik tepki oluşabilir ve PEG içeren nanotaşıyıcıların farmakokinetik profillerinde beklenmedik bir değişiklik olabilir. İlaç formülasyonlarında düşük molekül ağırlıklı PEG genel olarak çözücü olarak kullanılırken, yüksek molekül ağırlıklı PEG misel sisteminin bir bileşeni olarak kullanılır. Ancak PEG biyobozunur olmadığı için uygulamalarda düşük molekül ağırlıklı olanların kullanımı tercih edilir. Oksijene maruz kaldığında oldukça kolay bozunabilen PEG'in artan molekül ağırlığı oksidatif parçalanmayı önemli ölçüde azaltır [51].

2.2.13.2 Poli (ε-Kaprolakton) (PCL)

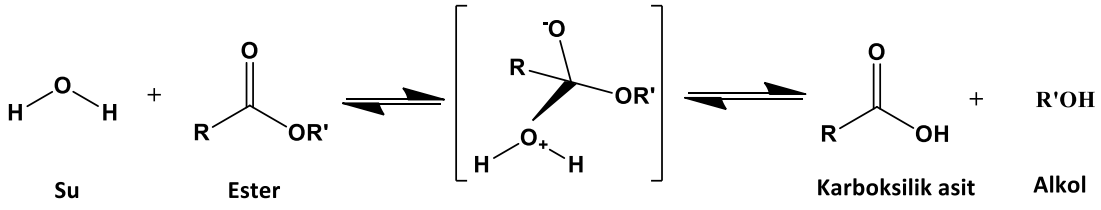
Alifatik poliester ailesinin önemli bir üyesi olan PCL yarı kristalin bir poliesterdir ve ε-kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile elde edilir (Şekil 2.13). İlaç taşıma özelliği in vitro ve in vivo olarak incelenen polimerlerden biri olan PCL biyolojik olarak uyumlu, yüksek molekül ağırlıklı ve oldukça hidrofobik bir polimerdir. PCL kolay sentezlenebilen, birçok organik çözücü içerisinde çözünebilen, düşük erime noktasına

(55-60˚C) ve camsı geçiş sıcaklığına (-60˚C) sahip vücut tarafından tamamıyla atılabilen bir polimerdir. Düşük camsı geçiş sıcaklığından dolayı PCL'nin amorf fazı vücut sıcaklığında daha yüksek moleküler hareketlilik gösterir. PCL hem *in vivo* hem de *in vitro* biyouyumluluğundan ve etkinliğinden dolayı FDA tarafından medikal kullanım için onaylanmıştır [22].



Şekil 2. 13 ε-kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonunun şematik gösterimi

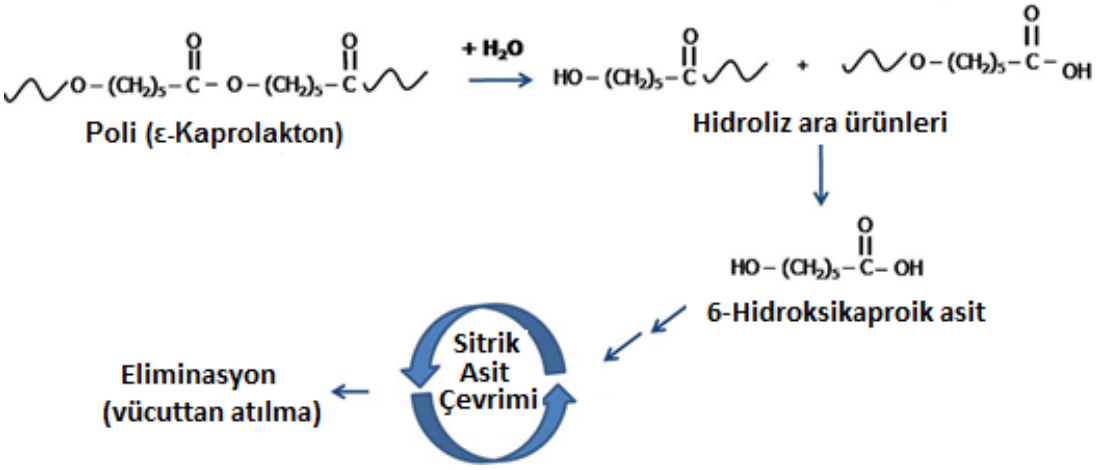
Poliesterlerin hidrolitik olarak bozunmaları sonucunda bir karboksilk asit ve bir alkol elde edilir. Bu parçalanma ürünleri genel olarak toksik değildir veya zaten vücutta var olan bir maddedirler (Şekil 2.14). PCL homopolimerinin ve kopolimerlerinin bozunma mekanizması PLA'nınkine benzer şekilde iki aşamada gerçekleşir. Önce hidrolitik ester bağları kırılır ve oligomerik türlerin difüzyonu nedeniyle de ağırlık kaybına uğrar. Daha sonra, polimer yüksek derecede kristal yapıda ve düşük molekül ağırlıklı olduğunda hücre içi bozunmaya maruz kalır. PCL'nin hidrolitik olarak bozunması sonucunda oluşan 6-Hidroksikaproik asit sitrik asit çevrimine girerek vücuttan atılır (Şekil 2.15).



Şekil 2. 14 Poliesterlerin hidrolitik olarak bozunması

Yüksek molekül ağırlıklı PCL'nin (Mn > 50000) bozulması oldukça yavaş olup dokudan tamamen ayrılması 3 yıl almaktadır. Düşük parçalanma hızı ve toksik özellikleri ile birçok ilaç için yüksek geçirgenliğe sahip olmasından dolayı kontrollü ilaç salımında

kullanımı tercih edilen PCL, ayrıca hem yumuşak doku hem de sert doku ile uyumlu olduğundan dolayı doku iskelesi olarak da kullanılabilmektedir. Yüksek kristallilik ve hidrofobikliğinden dolayı uzun olan in vivo parçalanma süresini kısaltmak için kaprolaktonun dilaktatlı, diglikolidli, -valerolaktonlu ve PEG'li kopolimerleri çalışılmış ve bunların PCL homopolimerinden daha hızlı parçalanabilen biyobozunur polimerik taşıyıcılar oldukları belirlendi [117].

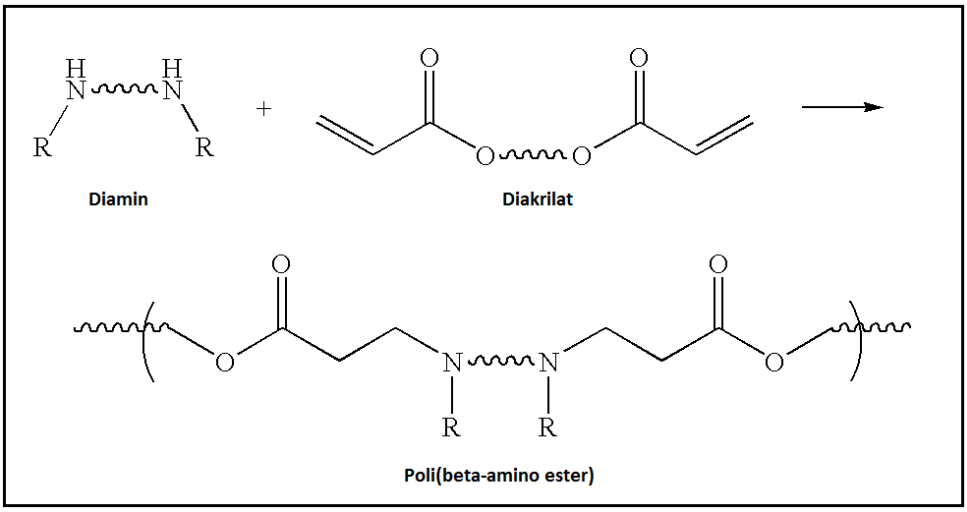


Şekil 2. 15 Poli(ε-kaprolakton)'un hidrolitik olarak bozunması

2.2.13.3 Poli (β-amino ester) (PBAE)

Poli(β-amino ester) pH duyarlı, sitotoksik olmayan ve biyobozunur bir polimerdir. Primer veya sekonder aminlerin diakrilatlarla Michael tipi katılma polimerizasyonu ile tek adımda kolaylıkla sentezlenir (Şekil 2.16). Bu polimerizasyon reaksiyonları için katalizör kullanımına gerek yoktur ve yan ürün oluşmaz, bundan dolayı saflaştırma gerektirmez [118]. Elde edilen lineer polikatyonlar polimer zincirinde ester bağlarından iki metilen birimi ile ayrılan tersiyer aminlere sahiptir. Polimer zincirinin kimyasal yapısı diakrilat ve sekonder amin monomerlerinin seçimi ile kontrol edilebilir. Primer amin monomerlerinden elde edilen polimerler asılı yan zincirlerden dolayı polimere esneklik katarlar. PBAE'nin sonundaki amin grubu diakrilatlara karşı olan reaktivite eksikliği nedeniyle, alkol, eter aromatik ve tersiyer aminlerle modifiye edilebilir. Bu, birçok

biyomedikal uygulamada kullanılabilecek yapısal olarak farklı çok sayıda polimerin üretimine olanak verir [119].



Şekil 2. 16 Michael tipi katılma polimerizasyonu ile poli(β-amino ester) sentezi

Birçok PBAE çözücü olmadan monomerlerin doğrudan karıştırılması ile elde edilir. Çünkü birçok amin ve diakrilat monomeri sıvıdır veya oda sıcaklığının biraz üzerinde erime noktasına sahip katıdır. Bununla beraber, bazı monomer birleşimleri için elde edilen polimer organik çözücülerde sınırlı çözünürlüğe sahip jele benzeyen bir malzemedir. Bu durumlarda, polimerizasyon susuz bir organik çözücünün minimum miktarı kullanılarak gerçekleştirilir. Genel olarak, reaksiyon hızı ve elde edilen polimerin polimerizasyon derecesi yüksek sıcaklıklarda reaksiyon süresi uzatılarak ve çözücü içeren reaksiyonlarda monomer konsantrasyonunu arttırılarak geliştirilir[119]. Polimerin molekül ağırlığı, monomer oranı, reaksiyon süresi ve sıcaklığı kontrol edilerek ayarlanabilir [120].

Saf halde, bu polimerlerin çoğu, birçok organik çözücüde (DMSO, CH_2Cl_2, THF, DMF, aseton, etanol) çözünen, eter ve hegzanda az çözünen ve sulu tampon çözeltiler içinde pH değerine bağımlı bir çözünürlük profiline (fizyolojik pH'ta veya daha büyük bir değerlerde çözünmeyen, asidik pH'larda ise ılımlı çözünürlüğü olan) sahip turuncu renkli viskoz sıvıdır [119].

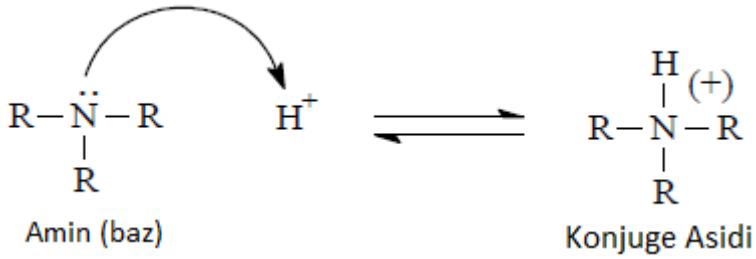
PBAE hidrolitik olarak parçalanabilen ester gruplarından dolayı biyobozunur bir polikatyondur. Fizyolojik koşullarda bozunarak toksik olmayan küçük yan ürünler, bis(β-amino asit) ve diol parçaları, meydana getirir. Titre edilebilen tersiyer amin gruplarından dolayı yüksek tamponlama kapasitesine sahiptir. pH duyarlılığı diakrilattaki alkil zincirleri değiştirilerek ayarlanabilir [121]. PBAE'nin yanıt verme süresi kısadır ve pH geçişi keskindir [122]. Bu polimerler için hidroliz hızı pH 5,1'de pH 7,4'tekinden yavaştır. pH 5,1'de hidroliz yarı ömrü yaklaşık 7-8 sattir. pH 7,4'de ise polimerin tamamının bozulması 5 saatte olur. Daha hidrofobik monomerler kullanılarak, polimerin bozunma hızı uzatılabilir ve bu diğer ester bazlı hidroliz olabilen polimerlerde de kullanılabilir [119].

Birçok katyonik polimer, polimer zincirinde primer, sekonder, tersiyer veya kuaterner amin grubu taşır. Aminin çeşidi pK_a değerini, yük yoğunluğunu ve polimerin nükleofilikliğini etkiler. Genel olarak, primer ve sekonder aminler yüksek pK_a değerlerine sahiptir ve güçlü nükleofil olarak davranırlar. Tersiyer aminler genellikle daha az nüklefiliktir ancak fizyolojik aralıkta bir pKa değerine sahiptir [119].

Pozitif yüzey yükü, nanotaşıyıcıların hücreler tarafından alımını artırabilir çünkü birçok hücrenin yüzey yükü negatiftir [123]. Diğer taraftan pozitif yüklü taşıyıcılar kan dolaşımı sırasında büyük bir sorundur. Çünkü kırmızı kan hücrelerinin yüzeyi negatif yüklüdür ve pozitif yüklü taşıyıcılar bu hücrelerle etkileşerek hemolize (alyuvarların yıkımı) neden olur. Bu yüzden, kan akımında nötr veya negatif yüklü olan ancak tümörlü dokuda taşıyıcının hücresel alımını arttırmak için pozitif yüklü hale gelen akıllı nanotaşıyıcılar geliştirilmiştir.

PBAE, tersiyer amin gruplarından dolayı bazik bir karaktere sahiptir ve bu suda çözünürlüklerini belirleyen önemli bir faktördür. Bazik yapıda olan amin bileşikleri sudaki çözünürlüklerini arttırmak için tuz şekillerine dönüştürülebilirler. pK_b değerinin altındaki pH değerlerinde protonlanarak iyonize hale geçen amin bileşikleri tuz oluştururlar ve bu durumda baz hallerinden daha yüksek çözünürlüğe sahiptirler. Amin bileşiğindeki azot protonla bağ oluşturmak için üzerindeki serbest elektron çiftini

paylaşır. Üzerinde ortaklanmamış elektron çifti taşıyan yüksüz haldeki serbest amin bileşiği bazik yapıda iken, katyonik yapıdaki protonlanmış amin bileşiği onun konjuge asididir [Şekil 2.17]. Aminin protonlanma derecesi ve bundan dolayı iyonlaşması aminin pK_b değerine ve ortamın pH değerine bağlıdır [128].



Şekil 2. 17 Amin bileşiklerinin protonlanması

PBAE bileşiklerinin pK_b değeri yaklaşık olarak 6,5'dir. Bu nedenle pH 6,5'un altında çözünürken, pH 6,5'un üzerinde çözünmez. PBAE düşük pH'ta tersiyer amin grubunun iyonizasyonundan dolayı hidrofilik bir blok olarak davranırken yüksek pH'ta tersiyer amin grubunun deiyonizasyonundan dolayı hidrofobik blok olarak davranır.

Biyouyumlu ve biyobozunur PBAE polimerleri ilk olarak Langer ve arkadaşları tarafından DNA ve gen taşınımında kullanılmak üzere geliştirildi [124]. Shen ve arkadaşları, bu şekilde pH 7,4 'de negatif yüklü olan ama düşük pH'ta (pH 6 ya da 5) yavaş yavaş pozitif yüklenen bir polimer sentezledi [125]. pH 6,0'da hücresel alımın pH 7,4'e göre daha iyi olduğunu ve pH 7,4'de kırmızı kan hücrelerine karşı pH 6,0'ya göre daha düşük toksisite gösterdiği bulundu.

PBAE, pH 6,5 tampon çözeltisinde pozitif yüklenir ve kendliğinden pozitif yüklü nanotanecikler oluşturur. PBAE'den hazırlanan mikrokürelere veya nanotaneciklere anti kanser ilacı yüklendiğinde, pH 6,5'un altında ilaç salınır ve ilaç yüklü durum pH 6,5'un üzerinde devam eder. Katyonik amino grubu taşıyan PBAE, gen veya DNA gibi karşıt yük taşıyan moleküllerle elektrostatik kompleksler oluşturabilir [126].

Bu polimerlerin umut verici yeni uygulamaları; kanser tedavisi, siRNA taşınması için altın nanotanecikler üzerine elektrostatik olarak kaplanması, biyolojik hidrojeller ve İlaç salımı için pH-duyarlı polimerik misellerin bileşeni olarak kullanılır [127].

2.2.14 Uyarı Duyarlı Polimerik Miseller

İdeal ilaç hedefleme sistemlerinde, dolaşım sırasında misellerden herhangi bir ilaç salımı olmamalıdır. Miseller hedef bölgede biriktikten sonra pH, özel enzimler gibi iç uyaranlar veya sıcaklık, ışık, ultrason ve manyetik alan gibi dış uyaranlar yoluyla ilaç salınmalıdır. Uyarıya duyarlı polimerler bulundukları ortamın koşullarında meydana gelen pH, sıcaklık, iyonik güç, elektrik veya manyetik alan, ışık şiddeti, radyasyon, gibi değişimler karşısında hızlı ve tersinir olarak, fiziksel özelliklerindeki değişiklikler ile cevap veren polimerlerdir.

Fiziksel cevap; çökme, çözünme, yüzey özelliklerinde değişiklikler, boyut değiştirme (şişme veya büzülme) şeklinde ortaya çıkar.

Bu polimer sistemlerinin uyarıya cevap olarak keskin ve bazen de sürekli olmayan geçişler göstermesine neden olabilen, bir seri moleküler mekanizma vardır. İyonlar arası etkileşimler, iyon alışverişi, iyonlaşma veya nötralleşme, su moleküllerinin hidrofobik olarak bağlanması/ayrılması, zincir hareketliliğinin artması/azalması, kristalleşme/erime, hidrofobik ve hidrofilik formlar arasındaki izomerleşme, elektronların transfer olduğu redoks reaksiyonları gibi mekanizmalar doğal ve sentetik polimerlerde uyarıya karşı cevap verme özelliğine neden olan mekanizmalardan bazılarıdır. Mekanizmaların çoğunda, suyun yer aldığı not edilmelidir. Moleküler etkileşimler uyarı duyarlı polimerlerin makroskopik boyutunu ve şeklini belirlemektedir.

2.2.14.1 pH Duyarlı Polimerik Miseller

İyonize olabilen fonksiyonel gruplar içeren ve ortamdaki pH değişiklilerine tepki verebilen polimerlere pH duyarlı polimerler denir. Bu tür polimerler iyonize olabilen

asidik veya bazik özellikteki gruplar içerdiğinden, polielektrolit yapısında olup, ortam pH'ına bağlı olarak tersinir iyonlaşma özelliği gösterirler. İyonlaşma, polimerin polaritesini ve fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimleri değiştirir, dolayısıyla polimer özellikleri değişir. Bu özellikler arasında, çözelti viskozitesi, çözünürlük, polimerik membranın şişme ve geçirgenlik özellikleri sayılabilir [60].

pH'ya duyarlı tüm polimerler asidik (karboksilik ve sülfonik asit) veya bazik (amonyum tuzları) gruplar içerirler. Bunlar iyonlaşabilen gruplar olup ortam pH'ında meydana gelen değişiklikler karşısında ya ortamdan proton alırlar ya da ortama proton verirler [129]. Zayıf iyonize grupları taşıyan bir polimerde iyonlaşma derecesi, pK_b denilen spesifik bir pH'a gelindiğinde belirgin olarak değişir. Ana zincirdeki grupların net yükündeki bu hızlı değişim polimer zincirlerin hidrodinamik hacimlerinde de bir değişime sebep olur. Protonlanabilen grubun pKa değerinin üzerinde hidrofobik bloğun yüksüz olduğu pH'da polimerik miseller oluşturulur. pH, pK_b değerinin altına düştükçe, polimerin iyonizasyonu hidrofilikliğin artmasına ve polimerlerin elektrostatik itmesine neden olur. Bu da misellerin kararsızlığını önleyerek kontrollü ilaç salımını tetikler [130].

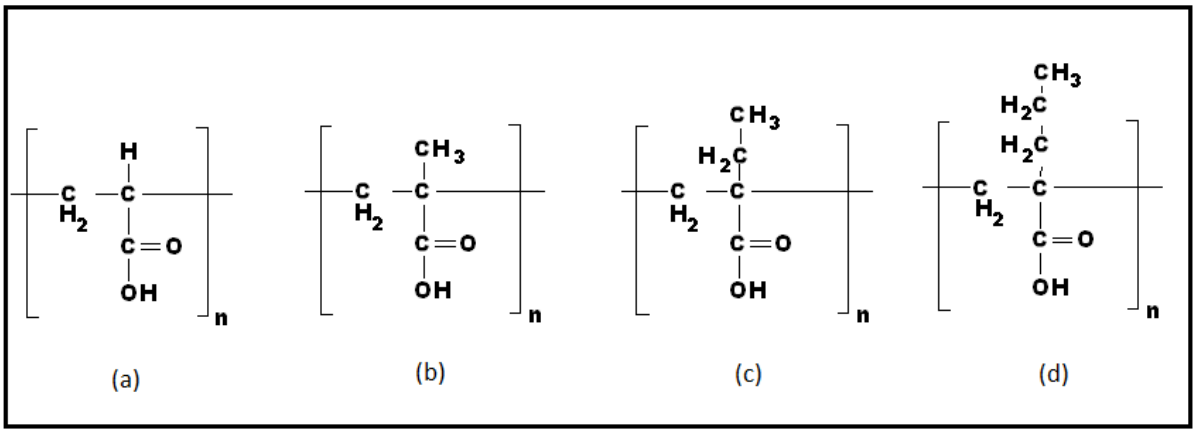
pH'ya duyarlı polielektrolitler bazik ortamlarda şişebilen zayıf poliasitler ve asidik ortamlarda şişebilen zayıf polibazlar olmak üzere iki çeşittir.

2.2.14.1.1 Zayıf Poliasitler

Zayıf poliasitlerin asidik özellik taşıyan grupları karboksilli asitlerdir. PAA gibi zayıf poliasitler düşük pH değerlerinde protonlanarak yüksüz hale gelirken, yüksek ve nötral pH'larda ortama proton vererek negatif yüklü hale gelirler (57). pH 4,0 ile 8,0 arasında iyonlaşma veya iyonlaşmama gösteren zayıf poliasitlerden pH'ya duyarlı polimerler olarak yararlanılır. En çok kullanılan zayıf poliasitler, pKa degeri 5,0-6,0 arasında olan karboksilik asit gruplarını taşıyan poliasitlerdir [131].

pH'ya en duyarlı poliasitler arasında en çok PAA ve poli(metakrilik asit) (PMAA) rapor edilmektedir (Sekil 2.18). Bunların karboksilik yan grupları yüksek pH'larda protonlarını

verirken düsük pH'larda proton alırlar. Bundan dolayı yüksek pH değerlerinde molekül zincirleri arasındaki elektrostatik itme kuvvetleri ile polielektrolite dönüşürler.



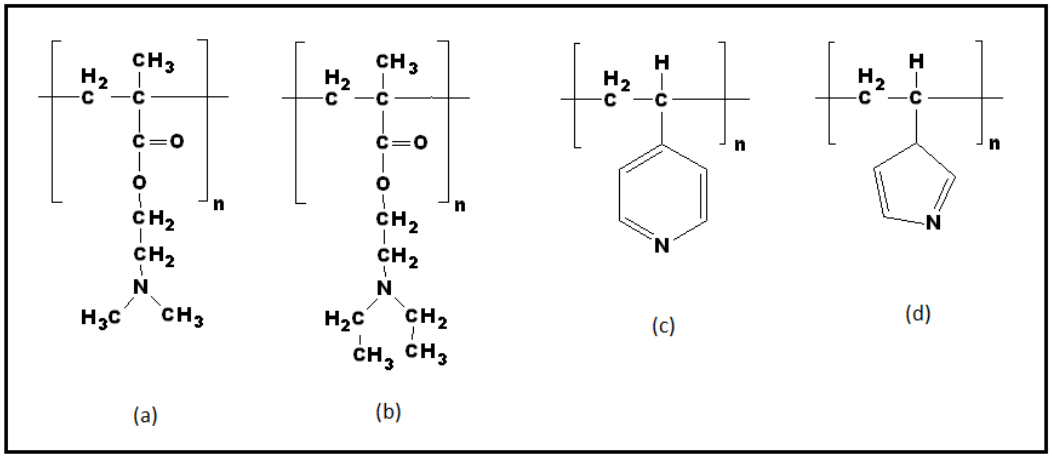
Şekil 2. 18 Çeşitli pH duyarlı poliasitler (a) PAA, (b) PMAA, (c) poli(2-etil akrilik asit) (PEAA) ve (d) poli(2-propil akrilik asit) (PPAA)

2.2.14.1.2 Zayıf Polibazlar

Polibazlar yüksek pH değerlerinde protonlanırlar, nötral ve düşük pH'larda pozitif olarak iyonlaşırlar (100). PVP, poli (N,N'-dimetilaminoetilmetakrilat) (PDMAEMA) ve poli (N,N'-dietilaminoetilmetakrilat) (PDEAEMA) pH'ya duyarlı polibazlara örneklerdir. Bunlar yan zincirlerinde amin gruplarını taşırlar. Amin grupları asidik koşullarda protonlanarak hidrofilik hale gelirken, bazik koşullarda protonlarını salarak hidrofobik olur [132]. pH duyarlı polibazlara bazı örnekler Sekil 2.19'da verilmiştir.

Polimerik miselleri oluşturmak için pH-duyarlı blok kopolimerlerin kullanımı, farklı pH ortamlarında misellerin kararlılık profilini değiştirebilir ve suda az çözünen ilaçların biyolojik olarak kullanılabilirliğini artırır. Vücudun içinde normal ve patofizyolojik durumlarda var olan farklı pH değerleri gözlenir. Örneğin, kan ve normal dokuların pH'ı 7,4 iken yüksek oranda aerobik ve anaerobik glikoliz olayından dolayı tümörlü ve iltihaplı dokularda hücre dışı pH değeri 6,8-7,0 arasında olan daha düşük değerler gözlenir. Miseller endositoz ile hücre içine alınabilir ve aynı zamanda endozom ve lizozom gibi hücre organellerine girebilir. Bu organellerin içerisindeki pH yaklaşık 5,0-

6,0'dır. Bundan dolayı antikanser ilaçlarının uygulamaları için çok sayıda pH duyarlı polimerik misel sistemleri kullanılmıştır [133].



Şekil 2. 19 Çeşitli pH duyarlı polibazlar (a) poli (N,N'-dimetilaminoetilmetakrilat) (PDMAEMA), (b) poli (N,N'-dietilaminoetilmetakrilat) PDEAEMA, (c) Poli (vinil prolidon) (PVP) ve (d) Poli(vinil imidazol) (PVI)

Normal doku ile tümör dokusu arasındaki pH farkı, pH'ya duyarlı salım yapan nanotaneciklerin, bu dokularda yüksek oranda birikmelerini ve daha fazla salım yapabilmelerini sağlar. Tedavi edilecek dokuya hedeflendirilen bir antikanser ilacı böylelikle başarılı bir şekilde normal dokulara zarar vermeksizin tedavi etkisi gösterir. pH duyarlı blok kopolimer miseller pH değerinin düşmesine yanıt olarak ayrışma yeteneğine sahip yapısına aldığı ilacı tümör sahasında ve/veya sitoplazma içine girişte serbest bırakmak üzere tasarlanmışlardır. Son zamanlarda, PEG-b-PDMAEMA-b-PDEAEMA triblok kopolimerleri fizyolojik pH'ta (7,1-7,3) kendiliğinden misel yapısı oluşturur ve hirofobik ilaç dipridamolü etkili bir şekilde çözünür hale getirir. Sulu ortamın asitlendirilmesi tersiyer amingrupları içeren DEAEMA birimlerinin protonlanmasına yol açar ve ardından pH 3,0'te ilacın hızlı in vitro salımı ile misel sisteminin ayrıştığı gözlenir [134].

Mide bağırsak sisteminde de pH değeri değişkenlik gösterir. Midedeki yüksek asidik pH'tan (1,0-2,5), ince bağırsaktaki nötr veya zayıf bazik pH (5,1-7,8) arasında değişir. Mide bağırsak sistemi boyunca görülen bu pH değişimi oral yoldan alınan ilaçların

kontrollü salımı için kullanılmıştır [135]. İlacın mide bağırsak sisteminde bozulmasını önlemek ya da bağırsakta emilmesini teşvik etmek için bu pH değişiminden yararlanılarak geliştirilen sistemler umut verici görünmektedir.

Çevresel uyarıcılara duyarlı polimerik miseller hidrofobik ilaç moleküllerinin ağız yoluyla verilmesi için umut verici bir yaklaşım olabilir. Jones ve arkadaşları pH duyarlı hidrofilik PEG-metakrilat birimlerine sahip hidrofobik EMA ve MAA'dan oluşan polimerik miseller hazırladı [136]. pH 7,0'de yapıdaki karboksilik asit gruplarının % 40'dan daha fazlası iyonlanmış haldeyken asidik pH'ta bu gruplar tamamen protonlanmış haldedir ve bu da çekirdeğin polaritesinde değişikliğe neden olur. Bu artan polarite, hidrofobik bir hormon olan progesteronun misel sisteminin dışına difüzyonunu destekler.

Son yıllarda, pH duyarlı polimerler, gen terapisindeki uygulamalarında önem kazanmışlardır. DNA' nın hücre içine alımı, sahip olduğu negatif yük ve fizyolojik koşullarda boyutunun büyük olmasından ötürü oldukça zordur. Bu nedenle, pozitif yüklü polimerler, yükün dengelenmesi ve DNA' nın yaklaşık 100 nm'lik nanotanecik boyutuna indirmek için kullanılırlar. Poli(L-lisin), poli(etilenimin) ve amino grubu içeren dendrimerlerin bu amaç için kullanımları incelenmiştir [137].

2.2.14.2 Sıcaklık Duyarlı Polimerik Miseller

Sıcaklığa duyarlı miseller ortamın sıcaklık artışına cevap olarak yapısal bir değişikliğe uğrar ve ilacın bırakılması ve hücreler tarafından daha kolay ilaç emilimi ile sonuçlanır.

Sıcaklık duyarlı polimerler, düşük sıcaklıklarda sulu çözeltilerde yüksek çözünürlüğe sahiptirler ancak belirli bir sıcaklığın üzerinde faz oluşturup çözeltiden ayrılırlar. Sulu polimer çözeltisinde faz ayrılmasının gözlenmeye başlandığı sıcaklık değeri, "düşük kritik çözünme sıcaklığı" (Lower Critical Solution Temperature, LCST) olarak adlandırılır. Sıcaklık duyarlı hedefleme açısından LCST en önemli parametredir ve birçok polimer, sulu çözeltilerinde LCST göstermektedir. LCST değerinin altında polimer çözünür haldedir fakat LCST'nin üzerindeki sıcaklıklarda polimer çöker. Polimerik misellerin çapı

LCST'nin üzerindeki sıcaklıklarda misellerin agregasyonuna neden olan hidrofobik etkileşimlerden dolayı hızla artar.

Polimerlerin sıcaklık duyarlılıkları ve dolayısıyla LCST davranışlarının mekanizması şu şekilde açıklanabilir. Düşük sıcaklıklarda, polimerdeki hidrofilik gruplar ile su molekülleri arasında oluşmuş kuvvetli hidrojen bağları, hidrofobik grupların su molekülleri ile etkileşmesine bağlı olan istenmeyen serbest enerjiye üstün gelerek, polimerin suda çok iyi çözünmesini sağlar. Sıcaklığın artmasıyla birlikte, hidrofobik yan gruplar arasındaki hidrofobik etkileşimler artarken hidrojen bağları zayıflar. LCST'nin üzerindeki sıcaklıklarda, hidrofobik gruplar arasındaki etkileşmeler baskın gelir ve polimer zincirlerinde entropinin neden olduğu çökme ve faz ayrılması gözlenir. Polimer zincirlerinin hareketlerinde azalma, polimerin hidrofobik grupları etrafında yüksek bir düzen içinde yapılanmış su moleküllerinin yerlerinden ayrılması sonucu meydana gelen entropideki artış ile karşılanır. Sıcaklık duyarlı çözünür bir polimerin, belirli bir sıcaklığın üzerinde çökmesinin veya katı bir yüzey üzerine fiziksel adsorpsiyonun nedeni budur [138].

Sıcaklık duyarlı polimerlerde ortak olan özellik, polimer yan gruplarında hidrofilik ve hidrofobik grupların bir denge içinde olmasıdır. Sıcaklığın neden olduğu faz ayrılmasına, hidrofobik olarak bağlanmış suyun yapıdan ayrılması yol açmaktadır. Eğer sıcaklık duyarlı polimerin hidrofilik içeriği artırılır veya azaltılırsa, polimer çözeltisinin LCST değeri de artar veya azalır. Yapıya hidrofobik komonomerlerin katılmasıyla LCST'nin düştüğü, hidrofilik monomerlerin katılmasıyla da LCST'nin arttığı izlenmiştir [139].

Sıcaklık değişimleri iltihaplanma sırasındaki hipertermi gibi içsel olabileceği gibi harici de olabilir. Isı, hedef dokuda biriken manyetik duyarlı misellerin salımına neden olan bölgesel olarak uygulanan yüksek frekans veya ultrason ile hedef dokular içinde üretilebilir. Liu ve arkadaşları poli(N-isopropil akrilamit-co-akrialmit)-b-poli(D, L-laktit) kopolimeri ile bir anti kanser ilacı olan dokatakselin tümör dokuya hedeflendirilmesini inceledi. Bulunan sonuçlar, hiperterminin ilaç yüklü misellerin hedeflenme etkinliğini büyük ölçüde geliştirdiğini ve ilacın toksisitesini azalttığını gösterdi [140].

2.2.14.3 Diğer Uyaranlara Duyarlı Polimerik Miseller

Elektriğe, manyetik alana ve ışığa duyarlı polimerler, daha çok dış alandan gelen uyarılara cevap verebilen polimerlerden üretilirler ve mikro sistemlerde, doku mühendisliğinde ve tıpta görüntüleme amacıyla kullanılmak üzere araştırılmaktadırlar. Elektrik veya manyetik alana duyarlılık, ilaç salım sistemleri ve yapay kas gibi biyolojik alanla ilgili uygulamalar için önemlidir.

Elektrik akımına duyarlı olan polimerik miseller genellikle polielektrolitlerden yapılırlar ki bunlar genellikle pH'a duyarlı olarak bilinirler. Manyetik alana duyarlı polimerlerde, ferromanyetik taneciklerin yapıya eklenmesi ile hazırlanan malzemeler vücut içine yerleştirilmekte ve manyetik alan sağlamak için kullanılan bir cihaz aracılığı ile manyetik alan harekete geçmekte ve jel içindeki ilaç salınmaktadır [141]. Bu polimerler vücut içerisine yerleştirilebilen ilaç salım sistemlerinde ve yapay kas uygulamalarında kullanılır.

Işığa duyarlı polimerler ışık uyarıcısına karsı anında cevap verebildiklerinden çok küçük miktarlarda olan salımı yüksek doğruluk ve hassasiyette gerçekleştirebilirler. Işığa duyarlı polimerler UV ışığa duyarlı ve görünür ışığa duyarlı olarak ikiye ayrılabilirler. Işığa duyarlı polimerlerin optik anahtarlar, görüntü birimleri ve gözle ilgili ilaç salım sistemlerinde potansiyel uygulamaları vardır. Tümörlerin normal dokulardan değişik bir ışık kırma indeksi olduğu göz önüne alındığında, ışığa duyarlı polimerler tümörlerin görüntülenmesinde kullanılabilir [142].

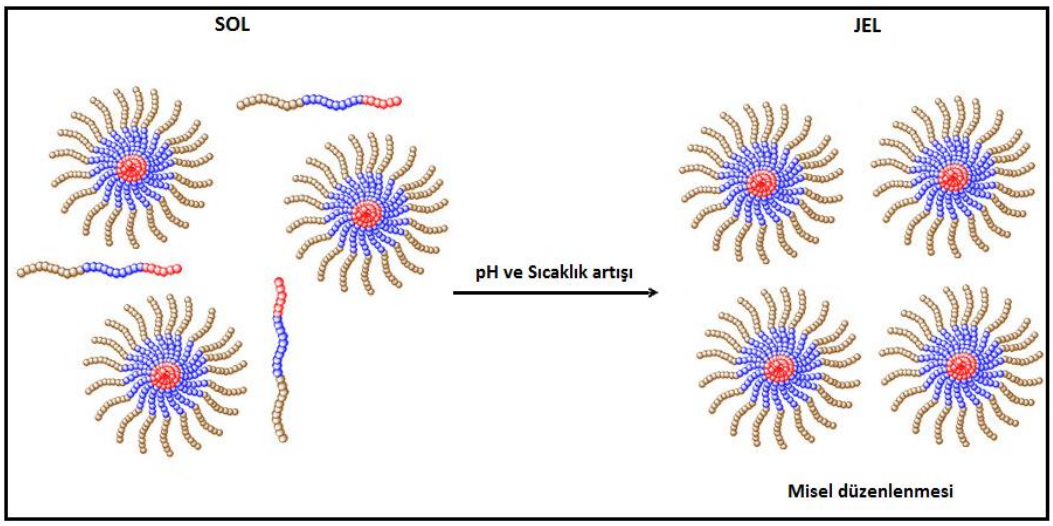
2.3 Sol-Jel Faz Geçişi

İlaç salım sistemleri sıvı, katı ve yarı katı olmak üzere üçe ayrılmaktadırlar. Enjekte edilebilir, sol-jel faz geçiş özelliğine sahip sistemlerde ana hedef polimerik yapının oda sıcaklığında çözelti yani sıvı halde bulunması, vücuda enjekte edildiğinde ise çok kısa sürede yarı katı jel haline dönüşmesidir. Uyarı duyarlı malzemeler arasında sıcaklık ve pH değişimi ile sol-jel faz geçişi gösterenler enjekte edilebilir ilaç taşıma sitemlerinde kullanılırlar [143].

Blok kopolimerlerin su içindeki çözeltileri düşük konsantrasyonlarda misel oluştururken, konsantre çözeltileri dış faktörlerin (sıcaklık, pH, iyonik güç) etkisi ile sol halden jel hale geçiş gösterirler. Çözünen kopolimer konsantrasyonu arttıkça miseller arasındaki güçlü etkileşim koagülasyonun ortaya çıkmasına ve jelleşmeye yol açar. Ancak kopolimerin molekül ağırlığının ve biyobozunur hidrofobik blok zincirlerinin uzunluğunun artması, sol jel geçişinin daha düşük konsantrasyonlarda meydana gelmesine neden olur. Uygun değişikliklere uğrayarak jeli oluşturacak polimer zincirleri, sol durumunda iken çözeltide misel halinde bulunurlar. Jelleşme sırasında miseller ilk önce küçük kümeler halinde bir araya gelirler daha sonra birbirlerine bağlanarak büyük kümeler ve en sonunda üç boyutlu bir ağ yapı oluştururlar (Şekil 2.20). Jel noktasına ulaşıldığında bu kümelerin boyutu artar [143].

Bu fiziksel jellerin tersinir sol-jel faz geçişleri, genellikle sıcaklık ve pH etkisiyle, zayıf fiziksel etkileşmelerin (Hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri veya iyonik etkileşmelerin neden olduğu hidrofobik etkileşimler) bozulması ya da yeniden oluşumu ile mümkün olmaktadır. Fiziksel jelleşme fizyolojik koşullarda herhangi bir reaktif monomer, katalizör veya organik çözücüye ihtiyaç olmadan kendiliğinden olur.

Sıcaklık duyarlı Pluronik (PEO-PPO-PEO) ve Poloksamerlerin sulu çözeltileri polimer konsantrasyonu kritik bir değerin üzerinde olduğunda düzenli bir sıcaklık artışı ile düşük sıcaklıkta sol-jel faz geçişi ve yüksek sıcaklıkta jel-sol faz geçişi gösterir. Sıcaklığın daha da arttırılması polimerin çökmesine neden olur [144]. Sol-jel geçişlerinde iki kritik sıcaklık vardır: sol-jel geçişinin gözlendiği düşük sıcaklık ve jel-sol geçişinin gözlendiği yüksek sıcaklık. Polimer çözeltilerinin yüksek sıcaklık sınırının üstünde sürekli ısıtılması çözeltiyi, opak hale getirir. Polimer bileşimi ve konsantrasyonu ile değişen iki kritik geçiş sıcaklığı arasında polimer sadece jel halinde bulunur.



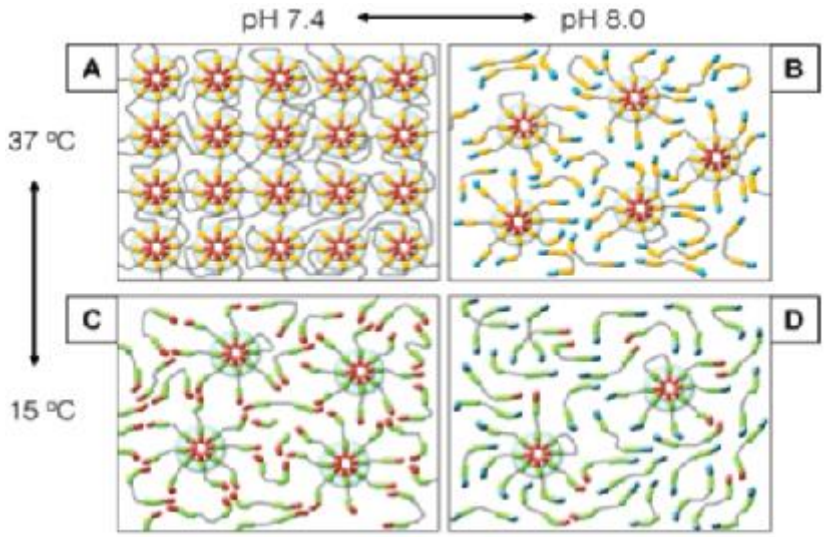
Şekil 2. 20 Misellerin jel oluşturmak üzere düzenlenmesi [16]

PPO'nun sıcaklığa bağlı olarak çözünürlüğünden dolayı triblok kopolimerler düşük sıcaklıklarda suda çözünür. Bununla birlikte, sıcaklık arttıkça denge unimerden küresel misel oluşumuna doğru kayar ve çözelti içerisinde bağlanmamış unimer sayısını azaltarak misel hacminde bir artışa yol açar. Bu misellerin paketlenmesi ve jelleşme ile sonuçlanır. Bununla birlikte, yüksek sıcaklıklarda jel-sol geçiş mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır. Bu geçiş, sıcaklığın PEO zincirleri ile PPO çekirdeğinin etkileşimi ve PEO çözünürlüğüne etkisine bağlı olarak misellerin PEO kabuğunun büzülmesi ile ilgilidir [144].

Sadece sıcaklığa bağlı olarak jelleşen polimer çözeltileri vücuda verilirken ani sıcaklık artışından dolayı polimer iğnenin ucunda jelleşir ve tıkanma sorunu ortaya çıkar. Ayrıca enjekte edilebilir bu sistemlerde karşılaşılan en büyük zorluk, tedavilerde ilaç yeterli düzeyde salınmadan veya hedef bölgeye ulaşamadan polimerin vücut içerisinde modifikasyona uğraması veya hızlı biyobozunma sürecine girmesidir. Ancak, pH ve sıcaklık duyarlı polimerler kullanıldığında enjeksiyon sırasında iğnenin tıkanma problemi olmaz. Ayrıca, ilaç polimer çözeltisine basitçe yüklenebilir, ilaç salınırken ani salım olmaz ve uzun süreli salım sağlanır [145].

pH duyarlı kopolimer hazırlanırken ilaç veya protein ile güçlü tersinir bir bağlantı yapabilecek ve ilacın yüklenme ve salım özelliğini geliştirecek fonksiyonel bir grup

kullanılır. Kopolimerdeki pH duyarlı kısmın iyonlaşması veya iyonlaşmaması sol-jel geçişi üzerinde önemli etkiye sahiptir.



Şekil 2. 21 pH ve sıcaklık duyarlı blok kopolimer çözeltilerinin sol-jel mekanizması [146]

Örneğin, Shim ve arkadaşlarının sentezledikleri OSM-PCLA-PEG-PCLA-OSM blok kopolimerlerinin fosfat tampon çözeltisi içerisinde kendiliğinden oluşturdukları molekül yapısı Şekil 2.21'de görülmektedir [146]. pH 8,0'de sülfonamid grupları iyonize haldedir ve PCLA-OSM grupları arasındaki hidrofobik etkileşimler engellendiğinden dolayı kopolimer jel oluşturamaz. Ancak pH düştüğünde OSM blokları deiyonize hale gelir ve sıcaklık artışıyla jel oluşumu gözlenir. "A" durumunda güçlü hidrofobik etkileşimlerden dolayı 37°C'de, pH 7,4' de misel jelleşmesi görülür. Blok kopolimer çözeltisi, "B", "C" ve "D" durumlarında viskozite değişimi ile birlikte sol haldedir.

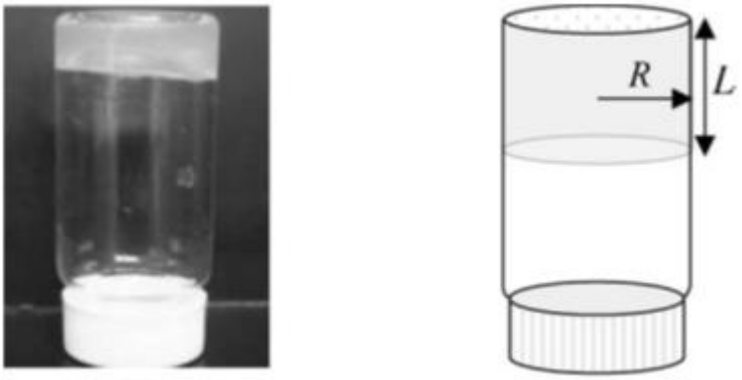
Terapötik ilaç, hücre ya da protein gibi malzemeler bu hidrojellere polimer çözücüsü dışında başka bir çözücüye ihtiyaç duymadan oda sıcaklığında sol halde basit bir fiziksel karıştırmayla yüklenir ve kopolimer çözeltisi hasta bölgeye veya deri altına şırınga ile enjekte edilebilir. Çözelti deri altı ya da kas içine enjeksiyon ile, vücut sıcaklığına maruz kaldığında ilacı yapısında hapsederek, in situ bir jel oluşturur. Bu sistemlerde vücut içerisinde herhangi bir yan maddeye gerek duyulmaz. Bu tür enjeksiyon uygulaması cerrahi müdahaleye göre daha avantajlı bir seçenektir. Tutulan ilaç molekülleri daha

sonra difüzyon ile ya da seyrelmenin ardından jel yüzeyinde meydana gelen erozyonla birlikte polimer ağlarının ayrışması ya da bozunması ile salınır. İlaç salım oranını polimerin bozunma hızı belirler [144].

2.3.1 Sol-Jel Faz Geçişinin Saptanması

Jel oluşumunun başladığı noktayı belirlemek için kullanılan çözeltinin reolojik özelliklerindeki değişimlere dayanan iki yöntem vardır. Bunlar; tüp ters çevirme yöntemi (tube inversion method) ve düşen bilye yöntemi (falling sphere)dir [147].

Tüp ters çevirme yöntemi, jelleşmenin tespiti için en çok kullanılan yöntemdir. Polimer çözeltisini içeren bir test tüpünün belirli koşullarda bekletildikten sonra ters çevrilerek içerisindeki akışkanın sadece kendi ağırlığının etkisiyle akıp akmadığının gözlenmesine dayanır (Şekil 2.22). Bu yöntem uygulanırken dikkatlı olunmalıdır, çünkü viskoz bir sıvı jel olarak algılanabilir ya da düşük akma gerilimine sahip bir jel sıvı olarak düşünülebilir.



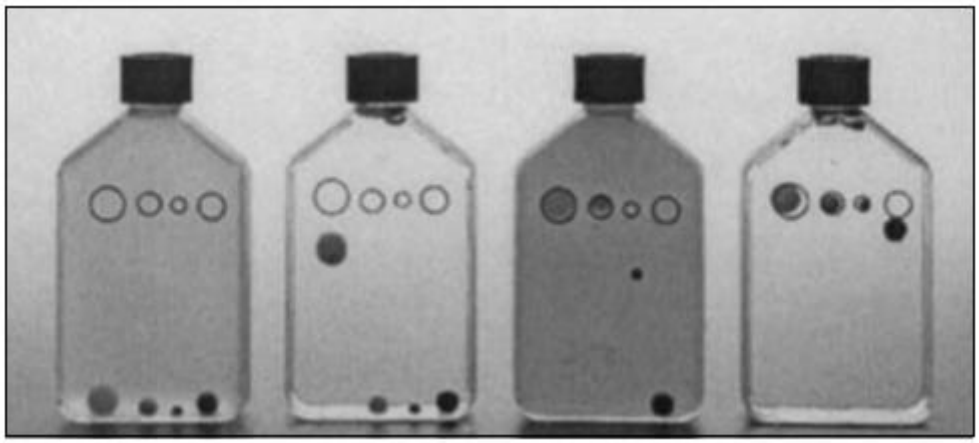
Şekil 2. 22 Tüp ters çevirme yönteminin şematik gösterimi [147]

Akma gerilimi σ_y olan bir polimer çözeltisi yarıçapı R, uzunluğu L olan silindirik bir tüpe konulduğunda, örneğin kütlesi $\pi 2RL$ olur. d, örneğin yoğunluğunu ve g de yerçekimi ivmesini göstermek üzere Von Mises'in akma kriterinden, statik denge durumunda, akma gerilmesi ile yerçekimi geriliminin birbirine eşit olması gerekir [148].

$$\sigma_y = d.g.\ L \qquad (2.2)$$

Yukarıdaki eşitlik bu yöntemin hem örneğin kütlesine hem de tüpün boyutuna bağlı olduğunu gösterir. Tüpün uzunluğu, L örneğin kütlesi ve yoğunluğu ile orantıldır. Bu nedenle sol jel faz geçiş davranışının belirlenmesi için bu test kullanılırken, her zaman aynı miktarda örnek ve aynı şişe tipi (geometri, boyut) kullanmak çok önemlidir.

Düşen Bilye Yöntemi, örnek içerisinde dağıtılan küçük küresel parçacıkların hareketini inceleyerek jelleşme başlangıcını belirleyen ikinci bir yöntemdir (Şekil 2.23). Moleküler jelleri karakterize etmek için bu yöntem kullanırken bilyenin jel fazında hareketsiz kalması ancak sol fazında hızla dibe çökmesi istenir. Bunun için, çelik gibi oldukça ağır bir metalden yapılmış ve yeterince büyük bilyelerin kullanımı tercih edilir.



Şekil 2. 23 Viskoelastik sıvı ve jellerde düşen bilye test yönteminin şematik gösterimi [147].

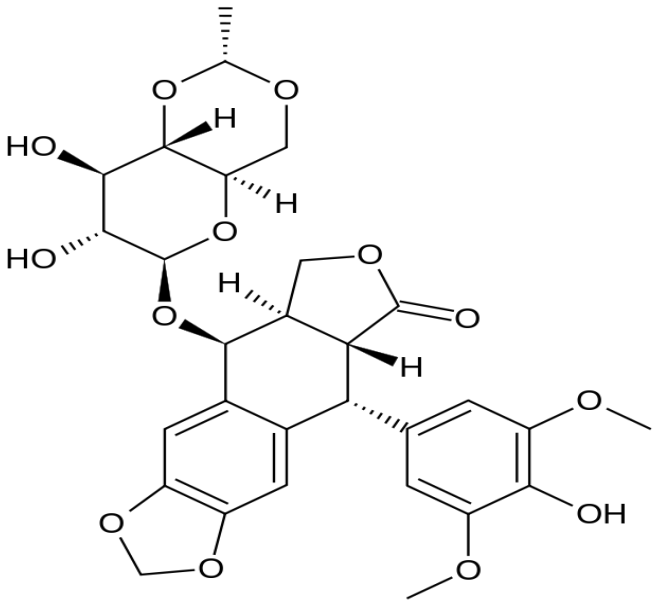
Jel içerisinde her bir bilyenin ilk konumu test tüpünün çeperine işaretlenip jel, oda sıcaklığında bir ay boyunca depolanmıştır. Her bir şişe içinde farklı boyutlara ve yoğunluklara sahip dört bilye vardır. Soldaki bilye düşük yoğunluklu plastikten en sağdaki bilye ise yüksek yoğunluklu çelikten yapılmıştır. Eğer bir ayın sonunda hiçbir bilye hareketi yoksa bu bilyelerin dağılmış halde jel fazında kaldığını gösterir. Jel oluşumunun verimi hiçbir hareketin gözlenmediği en büyük ve en yoğun bilye ile belirlenir. Bu test yönteminde, çözeltinin konulacağı tüp test bilyelerinden çok daha büyük olmalıdır çünkü çok küçük tüplerde bilye aşağıya doğru hareket ederken tüpün çeperlerine çarpabilir ve bu da bilyenin hareketini etkileyebilir [147].

2.4 Etoposid

2.4.1 Fizikokimyasal Özellikleri

Etoposid podofilotoksin türevi bir antineoplastiktir. Kemoterapötik bir ilaç olarak beyin, testis ve mide tümörleri, küçük hücreli akciğer kanseri ve lösemi gibi kötü huylu hastalıkların tedavisinde kullanılabilir [149]. Genellikle diğer ilaçlarla birlikte verilmektedir. Ayrıca, bazen kemik iliği veya kan kök hücresi naklinden önce hazırlık evresinde kullanılmaktadır [150].

Etoposid beyaz renkli, kokusuz bir tozdur. Kapalı formülü $C_{29}H_{32}O_{13}$ olan etoposidin molekül ağırlığı 588,56 g/mol'dür. Erime noktası 236-251°C'dir. Molekül formülü 4'-Dimethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-ethylidene-β-D-glucopyranoside) olan etoposidin kimyasal yapısı Şekil 2.24'de gösterildi [150].



Şekil 2. 24 Etoposidin kimyasal yapısı

Etoposid, suda pratik olarak çözünmez ancak etanol, metanol ve DMSO gibi organik çözücülerde değişik oranlarda çözünebilir. 25˚C'de sudaki çözünürlüğü 0.1 mg/mL'den düşük iken DMSO içerisindeki çözünürlüğü 30 mg/mL'dir. DMSO'daki 50 mM'lık çözeltisi stok çözeltisi olarak hazırlanabilir. Etoposid küçük hacimdeki DMSO içerisinde

çözülür ve % 0.9'luk sodyum klorür çözeltisi ile DMSO son hacmi % 1 aşmayacak şekilde seyreltilir. Sulu çözeltileri pH 4,0 ile 5,0 aralığında kararlıdır.

Katı haldeki liyofilize oda sıcaklığında saklanırken, DMSO içerisindeki çözeltisi 4˚C'de saklanmalıdır. Ancak hazırlanan çözeltileri uzun süreli saklanacaksa -20˚C'de depolanmalıdır. Liyofilize halde 4 ay kararlılığını korurken, çözelti halinde etkinliğini kaybetmemesi için 3 ay içerisinde kullanılmalıdır.

Etoposid yaygın olarak kullanılan bir anti kanser ilacıdır ancak güçlü lipofilik olduğu için ve kimyasal olarak kararsız olduğundan uygulanması sınırlıdır [151]. Ayrıca hematolojik toksisiteye neden olduğu için ve ciddi yan etkilere sahip olduğundan uygulamada doz sınırlanmasına neden olur. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, biyolojik olarak bozunabilen polimerlerden hazırlanan nanotaneciklere yüklenmesi ideal bir uygulama şekli olabilir.

Etki mekanizmasının DNA zincirinde, doğrudan etkili olmadan, dolaylı yolla kopmalara yol açmak şeklinde olduğu düşünülmektedir. Etoposid DNA ve topoizomeraz II enzimi ile üçlü bir kompleks oluşturur ki bu DNA'nın çözülmesine yardımcı olur, DNA iplikçiklerinin yeniden bağlanmasını önler ve böylece DNA zincirinin kırılmasına neden olur. Kanser hücreleri daha hızlı bölündüklerinden dolayı bu enzimi sağlıklı hücrelerden daha fazla kullanırlar. Bu, DNA sentezinde hatalara yol açar ve kanser hücrelerinin ölmesine neden olur [152].

Etoposid kapsül halinde oral yoldan ya da çözelti halinde damar içine enjeksiyon ile vücuda verilir. Eğer damar içine verilecekse enjeksiyon 30-60 dakikalık bir süreçte yavaş yavaş yapılmalıdır çünkü uygulanırken kan basıncını düşürebilir. İlaç vücuda verilirken kan basıncı sık sık kontrol edilir ve uygulama hızı buna göre ayarlanır. Damar içine uygulamada etoposidin dağılım yarılanması 1,5 saatte olurken eliminasyon yarı ömrü 4-11 saat arası değişmektedir.

Vücutta işlevini gören etoposid ilk olarak hidroksi asid oluşturarak metabolize olur, bu metabolit inaktiftir. Diğer metabolitler glukuronit ve sülfat konjugatlarını içerir ve in

vitro olarak sitostatik etkileri çok azdır. Etoposid renal veya renal olmayan (safra ve metabolizma) yollardan vücuttan atılır.

Çözünürlüğünün zayıf olduğu gerekçesinden yola çıkılarak çözünme hızını artırmak için prodrugları veya kontrollü salım sağlayabilecek kompleksleri veya yardımcı çözücü kullanılmakta; nanotanecik formları ve polimer matris sistemleri geliştirilmektedir. Etoposid, hücre kültürü çalışmalarında veya hayvanlarda kullanılabilmesi için Tween 80 veya poli(etilen glikol) 300, etanol ve Tween 80 karışımında çözülüp su veya dengeli tuz çözeltileri ile seyreltilebilir.

2.4.2 Miktar Tayini Yöntemleri

Etoposid, ilaç şekilleri ve biyolojik sıvılardan değişik yöntemlerle analizi yapılabilen bir maddedir. Etoposidin, UV spektrumu 284 nm dalga boyunda maksimum absorbans vermektedir. Etoposidin in vitro ve in vivo miktar tayinine yönelik olarak literatürde yer alan taşıyıcı sistemlerden çözünmesi ile ilgili çalışmalarda UV spektrofotometresi, IR spektrofotometrisi, kütle spektrofotometrisi, gaz kromatografisi ve sıvı kromatografisi yöntemlerinden yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC) veya ters faz yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (RP-HPLC) ile analiz yapılmaktadır.

Saadati ve arkadaşları tarafından etoposidin PLGA-PEG nanotaneciklerinden salımı üzerine yapılan bir çalışmada, UV dedektörlü HPLC kullanılmıştır. Bu çalşmada, asetonitril:su (28:72, v/v) mobil faz karışımında RP-18 kolon kullanılarak ayırım sağlanmış ve λ=364 nm'de miktar tayini gerçekleştirilmiştir [152].

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1'de gösterildi.

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Firma Katalog No	Uygulanan İşlem
ε-Kaprolakton (ε-CL)	Sigma-Aldrich 704067	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Metoksi poli(etilen glikol) (mPEG) Mn 2000	Sigma-Aldrich 202509	Toluen ile kurutuldu.
Metoksi poli(etilen glikol) (mPEG) Mn 5000	Sigma-Aldrich 81323	Toluen ile kurutuldu.
1,4-Diazasikloheptan (DACH)	Sigma-Aldrich H16604	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
N,N-dimetiletilendiamin (DMEDA)	Sigma-Aldrich D157805	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
2-(2-Aminoetoksi)etanol (AEE)	Sigma-Aldrich A54059	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
3-Amino-1,2-propandiol (APD)	Sigma-Aldrich A76001	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (devam)

Kimyasal Madde	Firma Katalog No	Uygulanan İşlem
1,6-Hekzandiol diakrilat (HDA)	Sigma-Aldrich 246816	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
1,6-Hekzandiol etoksilat diakrilat (HDEDA)	Sigma-Aldrich 497134	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Di(etilen glikol) diakrilat (DEGDA)	Sigma-Aldrich 437433	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Poli(etilen glikol) diakrilat (PEGDA) (Mn 700)	Sigma-Aldrich 455008	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Süksinik anhidrit	Sigma-Aldrich 239690	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
N,N'-Disiklohegzilkarbodiimid (DCC)	Sigma-Aldrich D80002	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
4-(Dimetilamino)piridin (DMAP)	Fluka 29224	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Kalay oktoat ($Sn(Oct)_2$)	Ege Kimya	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Trietilamin (TEA)	Sigma-Aldrich T0886	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Akriloil klorür (AC)	Sigma-Aldrich 549797	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Pentaritritol (PTOL)	Sigma-Aldrich P4755	Metanolden kristallendirilerek saflaştırıldı.
Pluronik F 108 (PEG-PPG-PEG)	Sigma-Aldrich 542342	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Etoposid	Sigma-Aldrich E1383	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Piren	Sigma-Aldrich 82648	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Sodyum sülfat (Na_2SO_4)	Merck 106639	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (devam)

Kimyasal Madde	Firma Katalog No	Uygulanan işlem
Fosfat tampon Çözeltisi (PBS)	Sigma-Aldrich P4417	Suda çözülerek çözeltisi hazırlandı.
Dietil eter	Merck 100921	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Diklorometan (DCM)	Merck 106050	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Kloroform	Merck 107024	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
1,4-Dioksan	Sigma-Aldrich 296309	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Toluen	Merck 107019	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Tetrahidrofuran (THF)	Merck 108101	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Etanol	Merck 100983	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Metanol	Merck 106002	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Aseton	Merck 100014	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Dimetilformamid (DMF)	Merck 103053	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Fluka S5881	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Hidroklorik asit (HCl) %37	Merck 109063	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich 244155	Herhangi bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan distile su eldesi için: GFL 2001/4 destile su cihazı, hazırlanan tampon ve polimer çözeltilerinin pH kontrolü için; Eutech PC 510 marka pH metre, santrifüj için: SIGMA 3-18K soğutmalı santrifüj ve diyaliz için Spectra Milipore diyaliz membranı (MWCO 3500-4000 ve MWCO 6000-8000) kullanıldı. Tüm tartımlar 0.1 mg hassasiyetle çalışan GEC AVERY marka elektronik terazi ile kurutma işlemi ise Elektro.mag marka M 420 P model vakum etüvünde yapıldı. Bunların dışında analizler için kullanılan cihazlar aşağıda maddeler halinde verildi.

3.1.2.1 Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FTIR)

Sentezlenen kopolimerlerin 4000-650 cm^{-1} aralığında ölçüm yapan Perkin Elmer Spectrum One marka FTIR spektrometre ile ATR aparatı kullanılarak FTIR spektrumları alındı.

3.1.2.2 Ultraviyole -Görünür Bölge Spektrometresi

Sentezlenen polimerlerin UV spektrumları Agilent marka 8453 UV–Visible spektrofotometre (UV-vis) kullanılarak alındı.

3.1.2.3 Jel Geçirgenlik Kromotogrofisi (GPC)

Sentezlenen kopolimerlerin ve hidrolitik bozunmaya uğrayan polimerlerin molekül ağırlığı GPC analizi ile belirlendi. GPC ölçümleri 0,3 mL/dk akış hızında elüent olarak THF ile birlikte üç adet yüksek çözünürlüklü kolon (60S, 300S ve 1000S) kullanılarak, bir pompa (Agilent 1100) ve refraktif indeks dedektörü (Agilent 1100s) varlığında yapıldı. Molekül ağırlıklarının belirlenmesi için polistiren standartları kullanıldı.

3.1.2.4 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi

Sentezlenen kopolimerlerin ^{1}H-NMR ölçümleri, Bruker Avance III 500 MHz NMR spektrometre cihazı ile çözücü olarak dötöro DMSO (dimetil sülfoksit) kullanılarak yapıldı.

3.1.2.5 Floresans spektrometre

Sentezlenen kopolimerlerin kritik misel konsantrasyonlarının belirlenmesi için Jobin Yvon-Horiba Fluoromax-P marka floresans spektrometresi kullanıldı.

3.1.2.6 Tanecik Büyüklüğü Ölçer (Particle Sizer)

Elde edilen polimerik misellerin tanecik boyutu ve tanecik boyut dağılımlarının belirlenmesinde, DLS yöntemi ile ölçüm yapan, Brookhaven 90 Plus/BI-MAS model Particle Size Analyzer cihazı kullanıldı.

3.1.2.7 Zeta Potansiyel Ölçer (Zeta Sizer)

Kopolimerin zeta potansiyel ölçümleri Brookhaven marka 90 Plus/BI-MAS model Zeta Analyzer cihazı ile 25˚C' de gerçekleştirildi. Zeta potansiyeli değerleri, Smoluchowski modeline göre hesaplanıp cihazın yaptığı 10 okumanın ortalaması alınarak elde edildi.

3.1.2.8 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)

Sentezlenen kopolimerlerin yüzey özelliklerinin belirlenmesi için FEI Philips XL30 ESEM-FEG cihazı kullanıldı.

3.1.2.9 X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Yüzeyi PEO ile kaplanan yıldız kopolimerlerin yüzey bileşimleri Thermo Scientific K-Alpha XPS cihazı kullanılarak belirlendi.

3.2 Deneysel Yöntemler

3.2.1 UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Etoposid Standart Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması

Çalışmada antikanser ilacı olarak kullanılan etoposidin in vitro salım çalışmalarından önce fosfat tampon çözeltisi içerisinde değişik konsantrasyonlarda bir seri çözeltisi hazırlandı ve UV spektrumları alınarak standart kalibrasyon doğrusu hazırlandı. Etoposidin standart doğru denkleminin belirlenmesinde; az miktarda metanol içerisinde çözülen ilacın pH'sı 7,4 olan fosfat tampon çözeltisi ile 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltiden aynı fosfat tamponuyla uygun seyreltmeler yapılarak 0,002 mg/mL ile 0,024 mg/mL konsantrasyon aralığında bir seri çözelti hazırlandı. 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilen çözeltiler UV spektrumları alınmadan önce 0,45 µm'lik filtreden süzüldü. Etoposid stok çözeltisinin 200-400 nm arasında UV spektrumu alınarak maksimum absorbans verdiği dalgaboyu (λmax) belirlendi. Hazırlanan diğer çözeltilerin de UV spektrumları alınarak belirlenen λmax dalgaboyunda verdikleri absorbans değerleri ölçüldü.

3.2.2 Kopolimerlerin Sentezi

3.2.2.1 Amfifilik Trilok Kopolimerlerin Sentezi

3.2.2.1.1 mPEG-b-PCL Sentezi

Başlatıcı olarak mPEG ve katalizör olarak $Sn(Oct)_2$ kullanılarak ε-CL'ın halka açılması polimerizasyonu ile mPEG-b-PCL diblok kopolimeri sentezlendi. Bu diblok kopolimerleri farklı molekül ağırlıklarında sentezlemek için değişik mPEG:ε-CL oranları kullanıldı. Reaksiyonda iki farklı molekül ağırlığına sahip mPEG (2000 ve 5000) kullanıldı ve yapısında bulunan suyun uzaklaştırılması için reaksiyondan önce aşırı miktardaki toluenle azeotropik destilasyonu yapıldı. Bu amaçla, 5 g mPEG ve 50 mL toluen 170°C'de destillendi ve 40 mL destilat toplandı. Çözelti oda sıcaklığına gelince 7,6 g ε-CL

monomeri ve 0,01g $Sn(Oct)_2$'ın toluendeki çözeltisi eklenerek balona vakum uygulandı ve balondan 1 saat argon gazı geçirildi. Reaksiyon argon atmosferi altında 120˚C'de 24 saatte gerçekleştirildi. Reaksiyona girmeyen ε-CL monomerini uzaklaştırmak için karışım DCM'da çözülerek soğuk dietil eter içerisinde çöktürüldü ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Elde edilen beyaz renkli polimer oda sıcaklığında vakum etüvünde (200 mmHg vakumda) 24 saat kurutuldu.

3.2.2.1.2 mPEG-b-PCL-AC Sentezi

Diklorometanda çözülen mPEG-b-PCL kopolimerinin (0,10 mol) üzerine trietilamin (0,20 mol) eklenerek balon 0˚C'ye soğutuldu. Reaksiyon ortamına DCM'da çözülmüş akriloil klorür (0,15 mol) bir saat boyunca damla damla ilave edildi. Reaksiyon 2 saat 0˚C'de, 24 saat oda sıcaklığında devam etti. Reaksiyon tamamlanınca ortama bir miktar DCM ilave edildi ve reaksiyon sırasında oluşan trietilamin.hidroklorür (TEA.HCl) tuzlarını uzaklaştırmak için reaksiyon karışımı mikrofiltreden süzüldü. TEA, reaksiyonun yan ürünü olan HCl'i ortamdan uzaklaştırmak için kullanılır. Reaksiyon ortamında kalması muhtemel TEA'yı uzaklaştırmak için filtrat % 3'lük NaOH çözeltisi ile 3 kez, NaCl çözeltisi ve distile su ile bir kez ekstrakte edildi. Reaksiyon karışımı ortamda kalması muhtemel suyu uzaklaştırmak için susuz Na_2SO_4 üzerinden kurutuldu. Soğuk dietil eterde çöktürülerek elde edilen beyaz renkli polimer oda sıcaklığında vakum etüvünde 24 saat kurutuldu.

3.2.2.1.3 mPEG-b-PCL-b-PBAE Sentezi

PBAE içeren triblok kopolimerler, monoakrillenmiş mPEG-b-PCL-AC polimerinin sonundaki vinil grupları ile HDD ve HDEDA bileşiklerinin sonundaki vinil gruplarının DACH ve DMEDA bileşiklerinin amin gruplarındaki azotları arasında meydana gelen Michael tipi katılma polimerizasyonu ile sentezlendi.

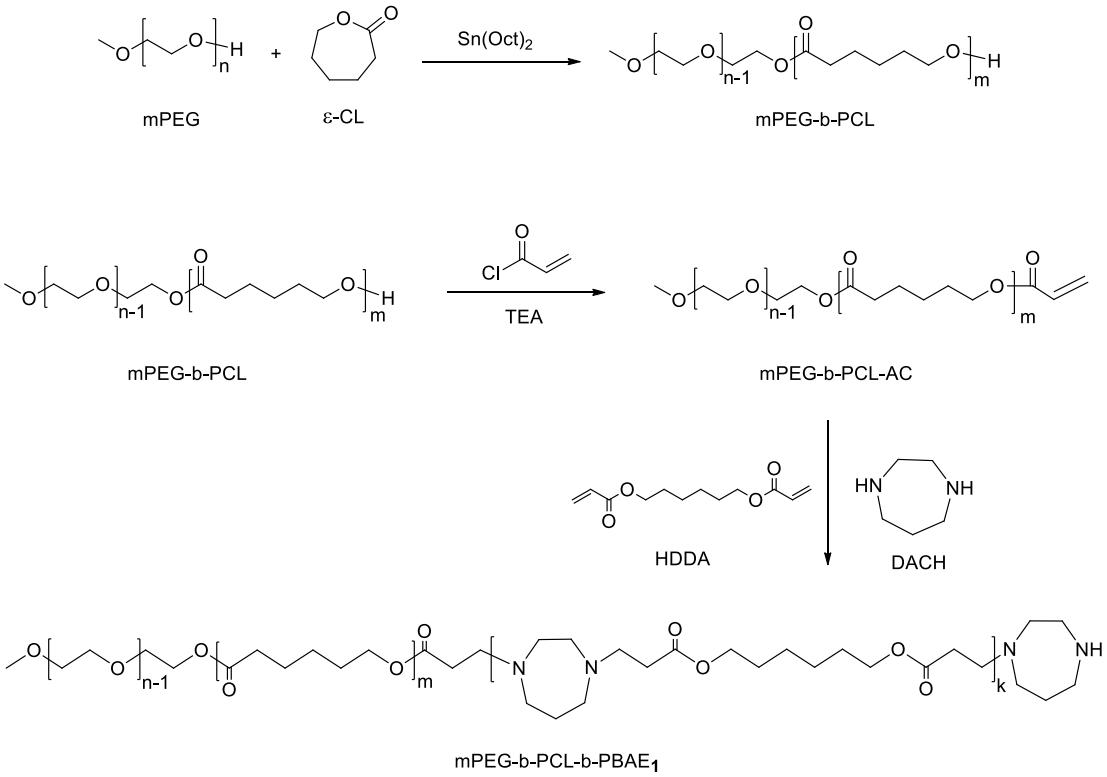
mPEG-b-PCL-b-PBAE1 triblok kopolimerinin sentezi için, 0,01 mol mPEG-b-PCL-AC, 0,15 mol 1,6-hegzandiol diakrilat (HDDA) ve 0,15 mol 1,4-Diazasikloheptan (DACH) bileşiği

susuz kloroform içerisinde ayrı ayrı çözüldü. Reaksiyon argon atmosferi altında 60˚C'de 3 günde gerçekleştirildi. Triblok kopolimer yanında oluşması muhtemel PBAE homopolimerini ortamdan uzaklaştırmak için reaksiyon ortamındaki kloroform evapore edilerek uzaklaştırıldı ve elde edilen kuru örnek THF içerisinde çözülerek filtre kağıdından süzüldü. THF 50˚C'de vakum altında ortamdan tamamen uzaklaştırıldı ve kuru polimer DCM da çözülerek dietil eterde 3 kez çöktürüldü. Polimer vakum etüvünde 48 saat kurutuldu.

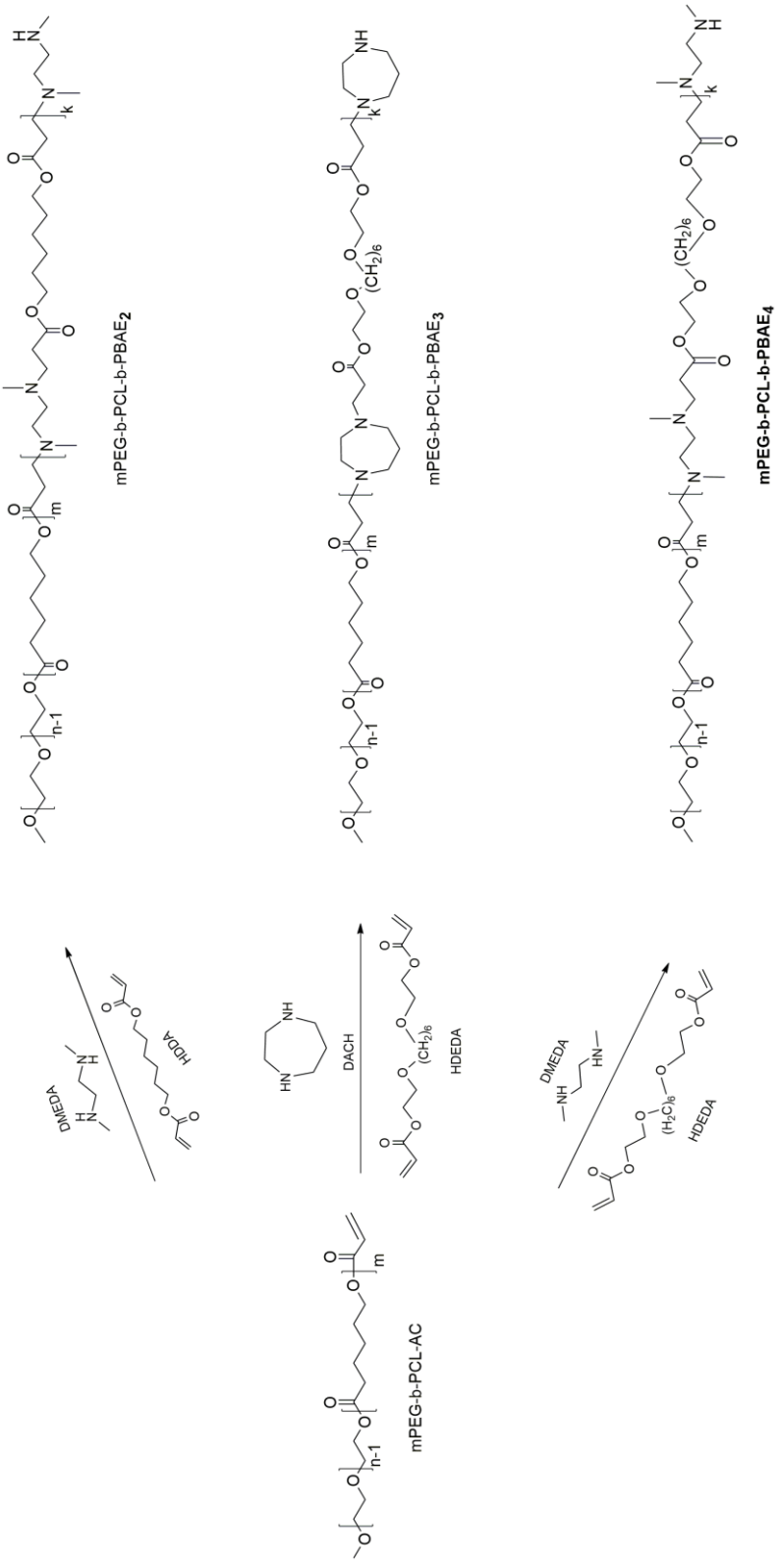
mPEG-b-PCL-b-PBAE2 triblok kopolimerleri, 0,01 mol mPEG-b-PCL-AC, 0,15 mol 1,6-hegzandiol diakrilat (HDDA) ve 0,15 mol N,N-dimetiletilendiamin (DMEDA) bileşikleri,

mPEG-b-PCL-b-PBAE3 triblok kopolimerleri, 0,01 mol mPEG-b-PCL-AC, 0,15 mol 1,6-hegzandiol etoksilat diakrilat (HDEDA) ve 0,15 mol 1,4-Diazasikloheptan (DACH) bileşikleri,

mPEG-b-PCL-b-PBAE4 triblok kopolimerleri, 0,01 mol mPEG-b-PCL-AC, 0,15 mol 1,6-hegzandiol etoksilat diakrilat (HDEDA) ve 0,15 mol N,N-dimetiletilendiamin (DMEDA) bileşikleri kullanılarak yukarıda anlatılan yöntemle sentezlendi.



Şekil 3. 1 mPEG-b-PCL-b-PBAE1 amfifilik triblok kopolimerinin sentezi

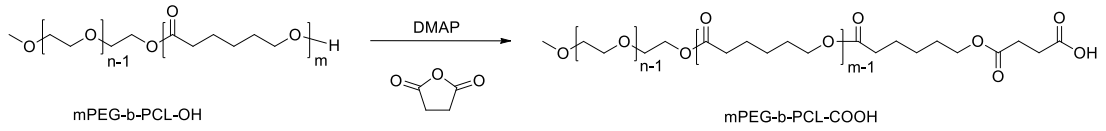


Şekil 3. 2 Farklı mPEG-b-PCL-b-PBAE kopolimerlerinin sentezi

3.2.2.2 Graft Kopolimerlerin Sentezi

3.2.2.2.1 mPEG-b-PCL-COOH Sentezi

mPEG-b-PCL kopolimerleri ε-kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonu ile Bölüm 3.2.2.1.1'de belirtildiği şekilde sentezlendi. Katalizör olarak DMAP kullanılarak mPEG-b-PCL diblok kopolimerinin sonundaki hidroksil grubu ile süksinik anhidrit arasında meydana gelen reaksiyon sonucu mPEG-b-PCL polimerine karboksil grubu takıldı. Bu amaçla diblok kopolimer (0,1 mol), süksinik anhidrit (0,2 mol) ve DMAP (0,1 mol) 10 katı 1,4-dioksan içerisinde çözüldü. Reaksiyon argon atmosferi altında oda sıcaklığında karanlıkta 24 saatte tamamlandı. Dietil eterde 3 kez çöktürülerek elde edilen beyaz polimer vakum etüvünde oda sıcaklığında 48 saat kurutuldu.



Şekil 3. 3 mPEG-b-PCL-COOH kopolimerinin sentezi

3.2.2.2.2 OH Sonlu PBAE Sentezi

Yapısında uç hidroksil grubu içeren PBAE polimerleri diakrilat grubunun sonundaki vinil grupları ile amin grubundaki aktif hidrojenler arasında Michael tipi katılma polimerizasyonu ile sentezlendi. Diakrilat/amin mol oranı 1:1 olarak alındı. pH duyarlı *PBAE1 bloğunun sentezi için*, 0,15 mol 2,2-(Amino etoksi) etanol (AEE) ve 0,15 mol dietilen glikol diakrilat (DEGDA) bileşikleri,

PBAE2 bloğunun sentezi için 0,15 mol AEE ve 0,15 mol PEGDA,

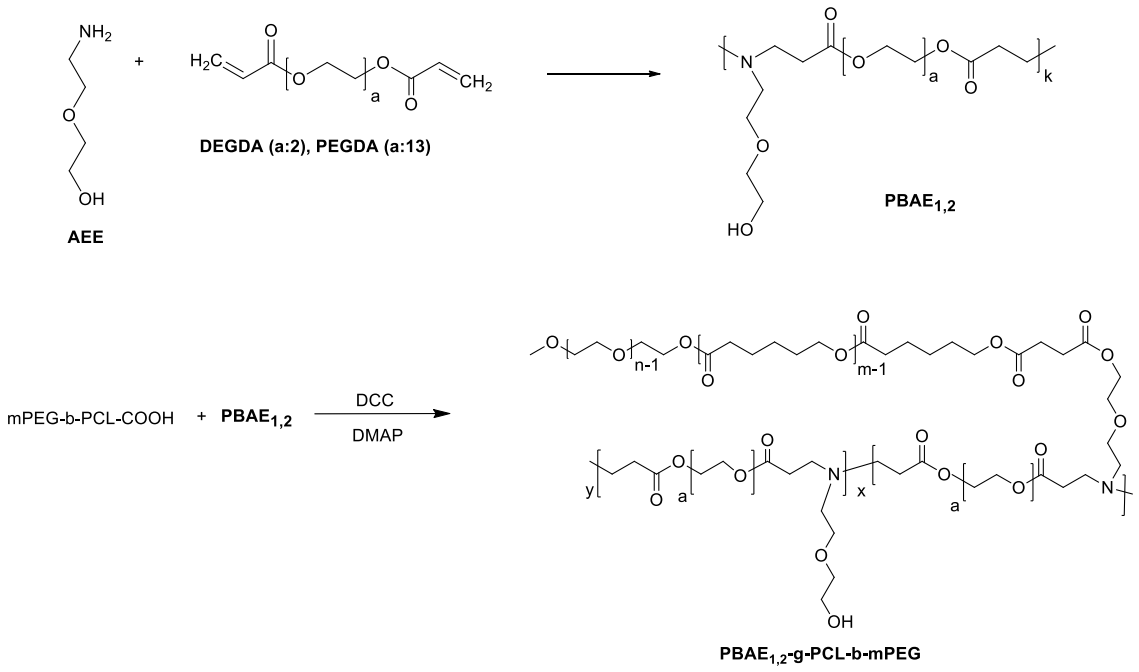
PBAE3 bloğunun sentezi için 0,15 mol APD ve 0,15 mol DEGDA,

PBAE4 bloğunun sentezi için ise 0,15 mol APD ve 0,15 mol PEGDA bileşikleri kullanıldı. Hidroksil grubu içeren amin ve diakrilat monomerleri balona konularak argon gazı ortamında 60˚C'de 72 saatlik bir sürede kütle fazında polimerizasyon gerçekleştirildi.

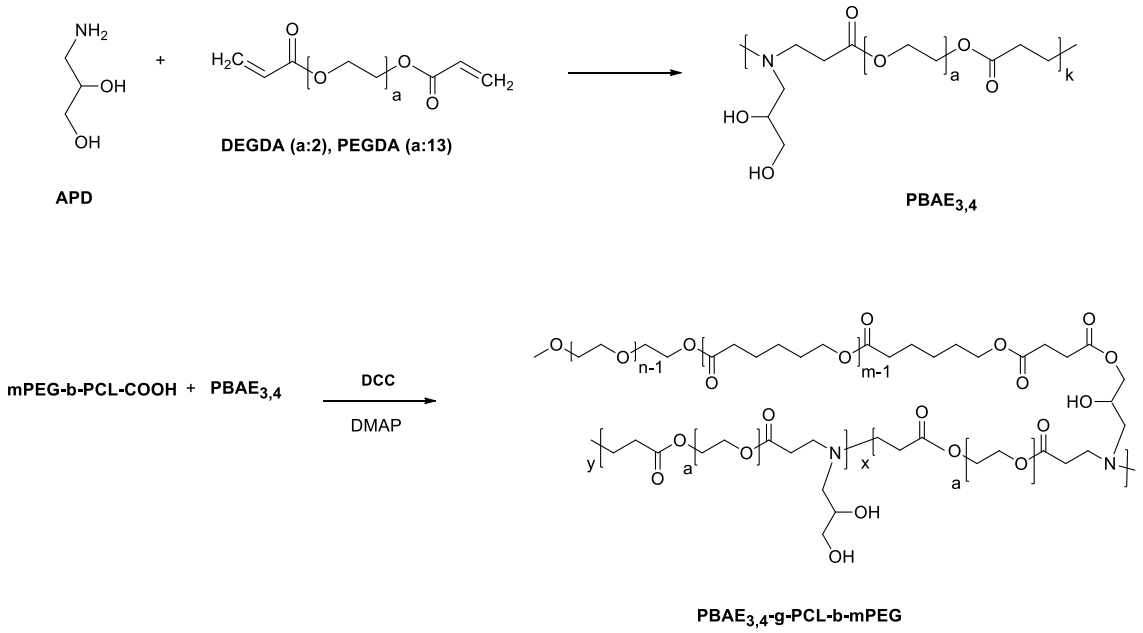
Oda sıcaklığına soğutularak elde edilen viskoz sıvı DCM'da çözülerek soğuk dietil eterde çöktürüldü ve oda sıcaklığında vakum etüvünde 48 saat kurutuldu.

3.2.2.2.3 PBAE-g-PCL-b-mPEG Sentezi

Poli(β-aminoester) zincirindeki hidroksil grupları ile mPEG-b-PCL-COOH kopolimerinin karboksil grupları arasındaki reaksiyon ile ana zinciri PBAE, yan zincirleri mPEG-b-PCL olan graft kopolimer elde edildi. Bağlayıcı ajan olarak DCC ve katalizör olarak DMAP kullanıldı. 1 g OH sonlu PBAE, 1 g mPEG-b-PCL-COOH ve 0,1 g DMAP 25 mL DCM'da çözülerek 0˚C'ye soğutuldu. 0,3 g DCC'nin 5 mL DCM'daki çözeltisi reaksiyon ortamına damlalar halinde eklendi. Karanlık ortamda 0˚C'de 1 saat ve oda sıcaklığında 24 saat reaksiyon sürdürüldü. Reaksiyon sırasında oluşan disiklohegzilüre yan ürününü uzaklaştırmak için reaksiyon karışımı mikrofiltreden süzüldü. İçerdiği DCM evaporatörde uçurularak konsantre hale getirilen süzüntü soğuk dietil eterde çöktürülerek elde edilen beyaz katı polimer oda sıcaklığında vakum etüvünde 48 saat kurutuldu. Sentezlenen farklı yapılardaki PBAE-g-PCL-b-mPEG kopolimerlerinin sentez şeması Şekil 3.4'de verildi.



Şekil 3. 4 Farklı PBAE-g-PCL-b-mPEG graft kopolimerinin sentezi



Şekil 3. 5 Farklı PBAE-g-PCL-b-mPEG graft kopolimerinin sentezi

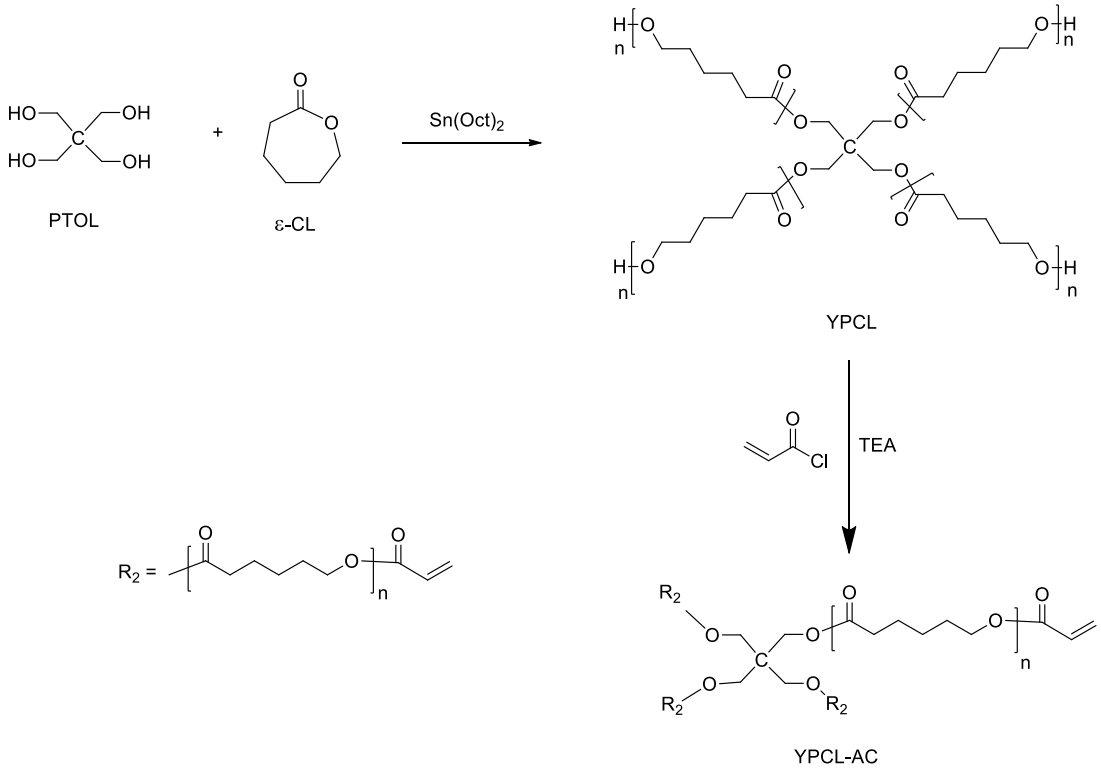
3.2.2.3 4 Kollu Yıldız PEO Kaplı YPCL-b-PBAE Kopolimerlerinin Sentezi

3.2.2.3.1 4 kollu Yıldız YPCL-b-PBAE Kopolimerlerinin Sentezi

4 kollu yıldız şekilli YPCL polimeri, pentaeritritol ve $Sn(Oct)_2$ kullanılarak ε-kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonu ile sentezlendi. 0,1 g pentaeritritol, 5,7 g ε-CL ve 0,01 g $Sn(Oct)_2$ bir balona konuldu ve ortamdan 2 saat argon gazı geçirildi. 120˚C'de 24 saat sürdürülen reaksiyon tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımı DCM'da çözülerek soğuk dietil eter içerisinde çöktürüldü. Bu işlem 3 kez tekrarlandı ve elde edilen beyaz renkli polimer vakum etüvünde 48 saat kurutuldu.

Elde edilen 4 kollu YPCL polimerinin akrillenmesi TEA varlığında akriloil klorür kullanılarak Bölüm 3.2.2.1.2'de belirtildiği şekilde yapıldı. YPCL-b-PBAE blok kopolimeri, akrillenmiş polimerin ve diakrilat bileşiğinin (HDDA ve PEGDA) sonundaki vinil grupları ile amin bileşiğindeki (DMEDA ve DACH) azotlar arasında meydana gelen Michael tipi katılma polimerizasyonu ile Bölüm 3.2.2.1.3'de belirtildiği şekilde sentezlendi (Şekil 3.6). Çeşitli molekül ağırlıklarında elde edilen polimerler oda sıcaklığında vakum

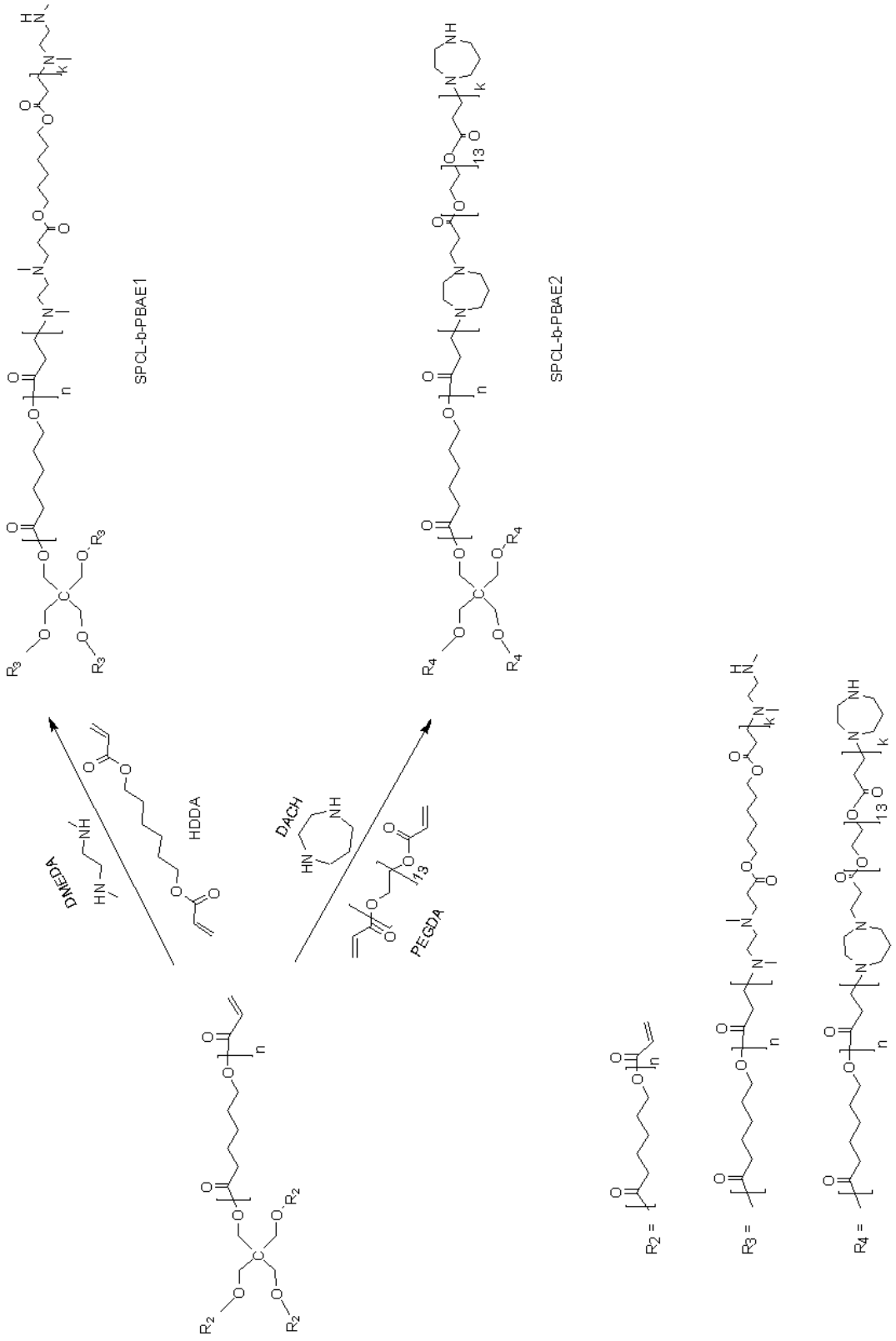
etüvünde 48 saat kurutuldu. Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de yıldız şekilli blok kopolimerin sentez aşamaları verildi.



Şekil 3. 6 4 kollu yıldız şekilli YPCL polimerinin sentezi ve akrillenmesi

3.2.2.3.2 4 kollu Yıldız YPCL-b-PBAE Kopolimerlerinin PEO ile Kaplanması

Sentezlenen 4 kollu yıldız şekilli YPCL-b-PBAE polimeri nanotaneciklerin hazırlanması sırasında PEO ile kaplandı. Nanotanecikler bir etanol-su sistemi kullanılarak kontrollü bir şekilde çözücü yer değiştirme yöntemi ile hazırlandı. Bu amaçla, 125 mg kopolimer 7,5 mL etanol içerisinde homojen bir çözelti elde edilene kadar karıştırılarak çözüldü. Elde edilen polimer çözeltisi 100 mg Pluronic F-108 içeren 42,5 mL bidistile su içerisine damlalar halinde eklendi ve oda sıcaklığında 4 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Polimer nanotaneciklerini içeren süspansiyon çözeltideki adsorplanmamış Pluronik'in fazlasını uzaklaştırmak amacıyla 13500 devir/dakika hızla 1 saat santrifüj edildi. Dibe çöken nanotanecikler bidistile su ile yıkanarak tekrar santrifüj edildi ve dondurarak kurutuldu.



Şekil 3. 7 4 kollu yıldız şekilli YPCL-b-PBAE kopolimerlerinin sentezi

3.2.3 Polimerik Misellerin Hazırlanması

Polimerik misellerin hazırlanması için diyaliz yöntemi kullanıldı. Bu yöntem yarı geçirgen membranlardan hidrostatik basınç uygulanması ile konsantrasyon değişimi yönünde seçilen membranın gözenek boyutuna bağlı olarak moleküllerin uzaklaştırılması prensibine dayanır. Çalışmada Spectra/Por marka rejenere selüloz diyaliz membranı kullanıldı. Membrandan geçemeyen globüler molekül kütlelerini tanımlayan "Molecular Weight Cut-Off (MWCO)'' değeri 3500 (genişliği 23 mm, çapı 14,6 mm) ve 6000-8000 (genişliği 18 mm, çapı 11,5 mm) olan diyaliz membranları kullanıldı.

Çekirdek kabuk yapısındaki polimerik miseller farklı yapılarda ve farklı molekül ağırlıklarında sentezlenen triblok ve graft kopolimerlerden diyaliz yöntemi kullanılarak elde edildi. Bu amaçla 40 mg kopolimer 40 mL DMF'te çözüldü ve kuvvetli bir şekilde karıştırılan bu çözeltiye 2 mL bidistile su damlalar halinde eklendi. Kopolimer çözeltisi içerdiği koruyucu gliserini uzaklaştırmak amacıyla alt ucu kapatılarak 30 dk. bidistile suda bekletilen diyaliz membranına konuldu ve 1 L bidistile suya karşı diyaliz edildi. Oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak diyaliz işlemi uygulandı ve bidistile su ilk 12 saatte her 2 saatte bir sonra her 6 saatte bir değiştirildi. 48 saat sonunda diyaliz işlemi tamamlanmış olan çözelti liyofilize edildi ve miseller toz halinde elde edildi.

3.2.4 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Karakterizasyonu

3.2.4.1 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin pH Duyarlılıkları

Elde ettiğimiz polimerik miselleri karakterize etmeden önce, kopolimerlerin yapısında bulunanan PBAE grubunun pH duyarlılığı asit baz titrasyonu yöntemi ile test edildi. Bunun için, 20 mg kopolimer 20 mL bidistile su içerisinde dispers edildi ve 1 M HCl kullanılarak çözeltinin pH'ı 3,0 olarak ayarlandı. Bu çözeltiye 0,1 mL 0,1 M'lık NaOH

çözeltisi ilave edilerek her bir adımda çözeltinin pH'ında meydana gelen değişim pH-metre ile ölçüldü.

3.2.4.2 Polimerik Misellerin Kritik Misel Konsantrasyonları

CMC değerleri floresan özellik gösteren piren kullanılarak floresans spektroskopisi ile fosfat tampon çözeltisi içinde pH 7,4'de belirlendi. Bu amaçla, kopolimer örnekleri az miktar asetonda çözüldü ve fosfat tampon çözeltisi ile kopolimer çözeltisinin konsantrasyonu 0,1 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. 24 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak aseton uçurulduktan sonra polimer çözeltisi 0,0001 mg/mL ile 0,1 mg/mL arasında değişen bir seri konsantrasyona fosfat tampon çözeltisi ile seyreltildi ve 2 saat daha karıştırıldı. Pirenin asetondaki $12x10^{-5}$M'lık çözeltisi hazırlandı ve viallere bu çözeltiden 0,1 mL konularak viallerin dibinde ince bir film oluşturmak üzere aseton uçuruldu. Farklı konsantrasyonlardaki polimer çözeltileri herbirinde pirenin son konsantrasyonu $6x10^{-7}$ M olacak şekilde viallere eklendi. Piren ve kopolimeri içeren çözelti 1 saat ultrasonik banyoda tutulduktan sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında dengeye gelmesi için 24 saat bekletildi.

Polimer/piren çözeltilerinin eksitasyon spektrumları bir floresan spektrofotometre kullanılarak oda sıcaklığında 392 nm emisyon dalga boyu ve 0,2 nm bant genişliği ile 300-350 nm aralığında tarandı.

3.2.4.3 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Boyutu ve Boyut Dağılımı Analizi

Polimerik misellerin ve nanotaneciklerin boyutunu ve boyut dağılımını belirlemek için, kopolimerlerin fosfat tamponu ile çözeltileri hazırlandı. 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri kullanılarak pH değerleri ayarlanan çözeltiler 0,45 µm'lik filtreden geçirildi ve 25˚C'de hidrodinamik yarıçapları ölçüldü. Ölçümler sırasında dispersiyonun homojen ve berrak olmasına ve hava kabarcığı olmamasına dikkat edildi. Polimerik misellerin ve nanotaneciklerin tanecik büyüklüğü ve dağılımı ilaç içeren ve içermeyen örnekler olmak üzere her iki sistemde de çalışıldı.

3.2.4.4 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Yük Tayini

Polimerik misellerin ve nanotaneciklerin yüklerinin tayin edilebilmesi için, misellerin fosfat tamponu ile çözeltileri hazırlandı. Bu misel çözeltilerinin zeta potansiyelleri 25˚C'de ölçüldü ve okunan 3 ölçümün ortalaması misel yükü olarak alındı.

3.2.4.5 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Morfolojilerinin Tayini

Polimerik misellerin ve yıldız kopolimerlerden elde edilen nanotaneciklerin morfolojik yapıları SEM ile karakterize edildi. SEM ölçümlerinde dondurularak kurutulan misel örnekleri ve nanotanecikler karbon kaplı bakır gridlerin üzerine konularak ölçümden önce altınla kaplandı.

3.2.5 Amfifilik Kopolimerlerin Hidrolitik Olarak Biyobozunma Özelliği

Kopolimerlerin biyobozunurluk çalışmaları fosfat tampon çözeltisi ile pH 7,4'te 37˚C'de yapıldı. 20 mL tampon çözelti içerisine konulan 20 mg kopolimer örneği 1 saat orbital çalkalayıcıda tutulduktan sonra 37˚C sabit sıcaklıkta karıştırılarak bekletildi. Çözeltiden belirli aralıklarla alınan örnekler kurutularak THF içerisinde tekrar çözüldü. Bu örneklerin molekül ağırlığı değişimleri GPC kullanılarak belirlendi.

3.2.6 Kopolimerlerin Sol-Jel Faz Geçiş Özellikleri

Kopolimerlerin sulu çözeltilerinin sol-jel faz geçiş özelliklerini belirlemek için tüp ters çevirme yöntemi kullanıldı. Fosfat tampon çözeltisi içerisinde farklı konsantrasyonlarda (% 10, %15, %20, %25 ve % 30) hazırlanan kopolimer çözeltilerinin pH'sı 5 M NaOH ve 5 M HCl çözeltileri kullanılarak istenilen değere (pH 5,0 ile 7,4 arasında 0,5'lik artışlarla) ayarlandı. 5 mL'lik şişelere konulan çözeltiler 4°C'de 24 saat bekletildi. Farklı pH değerlerindeki kopolimer çözeltilerini içeren şişeler su banyosuna konularak banyonun sıcaklığı 0°C ile 50°C arasında kademeli olarak değiştirildi. 2°C aralıklarla örneklerin dengeye gelmesi için 10 dakika beklendikten sonra herhangi bir değişim olup olmadığı gözlendi. Şişeler yatay olarak eğildiğinde ya da ters çevrildiğinde 30 saniye boyunca

akış gözlenmezse çözeltinin jel haline geçtiği akış gözlenirse sol halinde olduğu söylenebilir.

3.2.7 Polimerik Misellere, Nanotaneciklere ve Jellere Etoposid Yüklenmesi

Blok ve graft kopolimerler kullanılarak etoposid yüklü polimerik miseller Bölüm 3.2.3'de belirtilen diyaliz yöntemi kullanılarak hazırlandı. Farklı miktarlardaki etoposid (5, 10, 15 ve 20 mg) ve 40 mg blok kopolimer 40 mL DMF içinde çözülerek diyaliz edildi. Diyalizden sonra, çözelti liyofilize edildi ve elde edilen misel tanecikleri -15°C'de depolandı.

Etoposid yüklü yıldız kopolimerleri elde etmek için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ilaç çözeltileri, kopolimerin etanoldeki çözeltisine ilave edildi. Etoposidin kopolimer çözeltisi içerisinde homojen dağılması için 2 saat süre ile karıştırılan çözelti PEO içeren bidistile suya damlalar halinde eklendi. Bölüm 3.2.2.3.2'de belirtilen yöntemle etoposid yüklü nanotanecikler elde edildi.

Polimerik jellere etoposid yüklemek amacıyla fosfat tampon çözeltisi içerisinde % 25 konsantrasyonda hazırlanan kopolimer çözeltileri 4˚C'de 24 saat bekletildi. Az miktar metanolde çözülen farklı miktarlardaki etoposid (5, 10, 15 ve 20 mg) bu çözeltilere eklenerek 6 saat karıştırıldı. pH'sı 7,4'e ayarlanan çözeltiler 37˚C'de bekletilerek jel haline dönüşmeleri sağlandı.

3.2.8 Polimerik Misellere ve Nanotaneciklere Etoposid Yüklenme Kapasitesi Tayini

Hazırlanan etoposid yüklü misel ve nanotanecik örneklerinin bulunduğu çözeltiden 0,5 mL alınıp fosfat tampon çözeltisi ile 10 mL'ye seyreltildi. 0,45 µm'lik rejenere selüloz filtreden süzülan bu örneklerin UV spektrofotometre ile 283 nm dalga boyunda verdiği absorbans değerleri tespit edildi. Bölüm 3.1.3.1'de anlatılan şekilde hazırlanan kalibrasyon doğrusu yardımı ile misellere yüklenen etoposid miktarı hesaplandı. Aşağıda verilen denklemler yardımı ile % enkapsülasyon etkinliği (entrapment efficiency, EE) ve % yükleme kapasitesi (loading content, YK) hesaplandı [153].

% Enkapsülasyon etkinliği (EE) = (A/B) x 100 (3.1)

% Yükleme kapasitesi (YK) = (A/(B+C)) x 100 (3.2)

A: Misellere yüklenen ilaç miktarı (g)

B: Misel hazırlama aşamasında kullanılan ilaç miktarı (g)

C: Misel hazırlama aşamasında kullanılan kopolimer miktarı (g)

3.2.9 Polimerik Misel, Nanotanecik ve Jellerden İn vitro Etoposid Salımı

Etoposidin misellerden ve nanotaneciklerden in vitro salım çalışmaları bir diyaliz membranı (MWCO 3500 Da) kullanılarak 37°C'de yapıldı. Farklı oranlarda etoposid yüklü liyofilize edilmiş misel örnekleri 10 mL fosfat tampon çözeltisinde disperse edilerek 30 dk stabilize edildi ve diyaliz membranına konuldu. Diyaliz membranı bir beherdeki farklı pH'lardaki (pH 5,0, 6,5 ve 7,4) 40 mL fosfat tampon çözeltisine daldırıldı. 37°C'deki su banyosuna yerleştirilen beher orbital çalkalayıcıda 50 rpm'de karıştırıldı ve belirli aralıklarda (1., 6., 24., 48., 72., 96. ve 120. saatlerde) örnekler alındı.

Etoposidin jellerden in vitro salım çalışmaları orbital çalkalayıcıda 50 rpm hızda ve 37˚C sabit sıcaklık ortamında yürütüldü. Hazırlanan ilaç yüklü jellerin üzerine etoposidin salınacağı ortamı oluşturmak üzere 37˚C'de 25 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) ilave edildi ve belirli zaman aralıklarında salım ortamından 5 mL örnek alındı. Alınan örneklerin yerine 5 mL taze fosfat tampon çözeltisi ilave edilerek etoposid yüklü örnekle salım ortamı arasındaki konsantrasyon farkı sabit tutuldu.

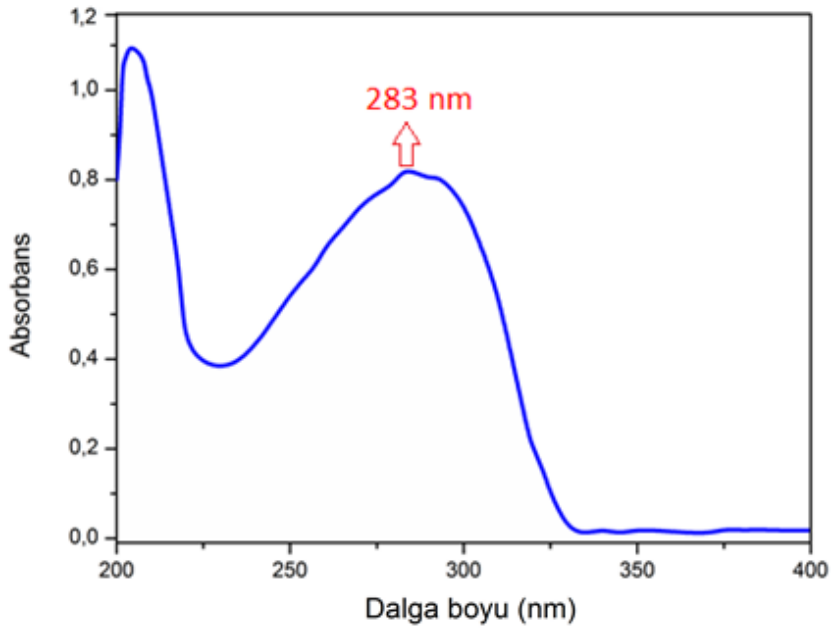
Alınan örnekler membran filtreden (0,45 µm) süzülerek 283 nm dalga boyunda UV spektrumları alındı ve kalibrasyon grafiği kullanılarak kümülatif salım değerleri hesaplandı. In vitro ilaç salım deneyleri, her pH değerinde üç kez gerçekleştirildi ve bu değerlerin ortalaması alınarak % salım oranları hesaplandı.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

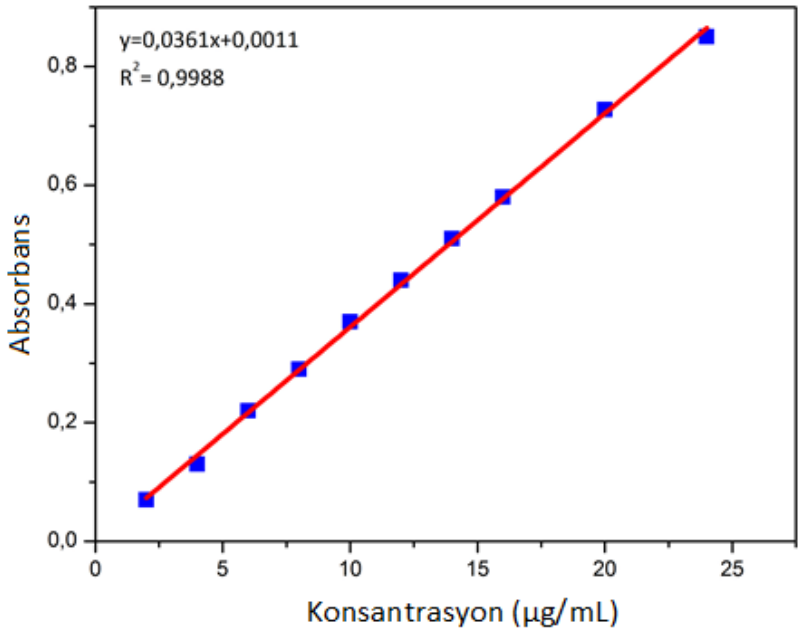
4.1 UV Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Etoposidin Standart Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması

Etoposidin metanol içerisinde hazırlanan stok çözeltisi 200-400 nm aralığında taranarak maksimum absorbans verdiği dalga boyu 283 nm olarak bulundu (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 Etoposidin metanol içerisindeki UV absorpsiyon spektrumu

Kalibrasyon doğrusunu oluşturmak amacıyla, etoposid stok çözeltisi farklı oranlarda seyreltildi ve bu örneklerin absorbans değerleri 283 nm dalga boyunda ölçüldü. Bu dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.2'de görülen etoposidin kalibrasyon doğrusu elde edildi. Bu kalibrasyon doğrusu polimerik misellerin ve jellerin ilaç salım özelliklerinin belirlenmesinde kullanıldı. Bu amaçla salım ortamından alınan örneklerin 283 nm'de ölçülen absorbansları ile salınan etoposid miktarı mg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 4. 2 Etoposidin kalibrasyon doğrusu

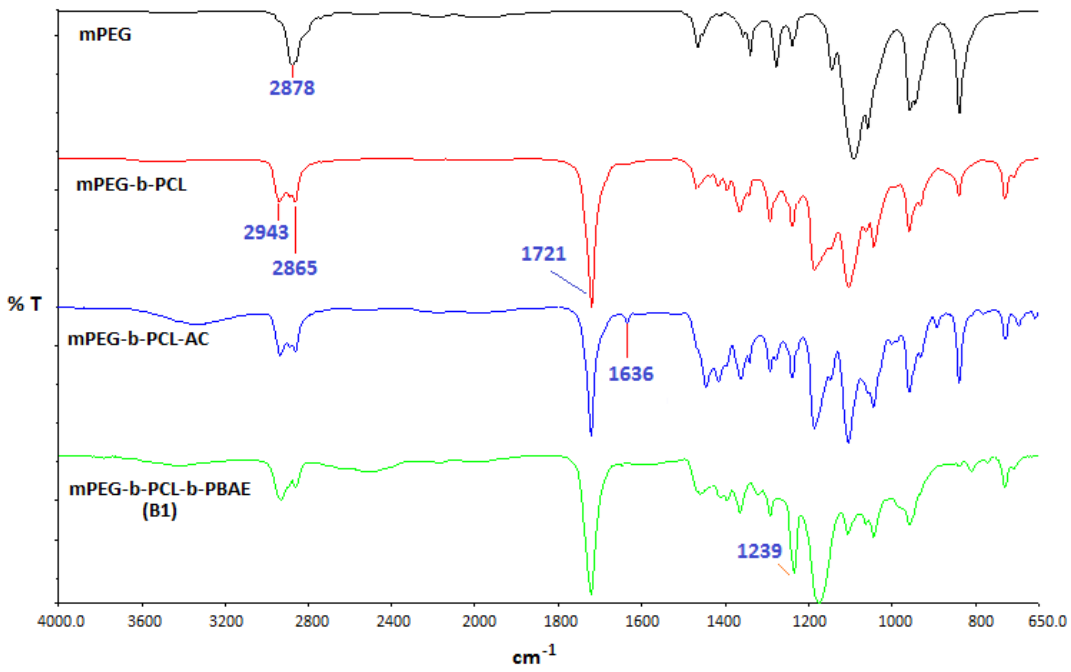
4.2 Kopolimerlerin Karakterizasyonu

4.2.1 Amfifilik Triblok Kopolimerlerin Karakterizasyonu

Sentezlenen mPEG-b-PCL, mPEG-b-PCL-AC ve mPEG-b-PCL-b-PBAE kopolimerlerinin kimyasal yapıları FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumları alınarak açıklandı.

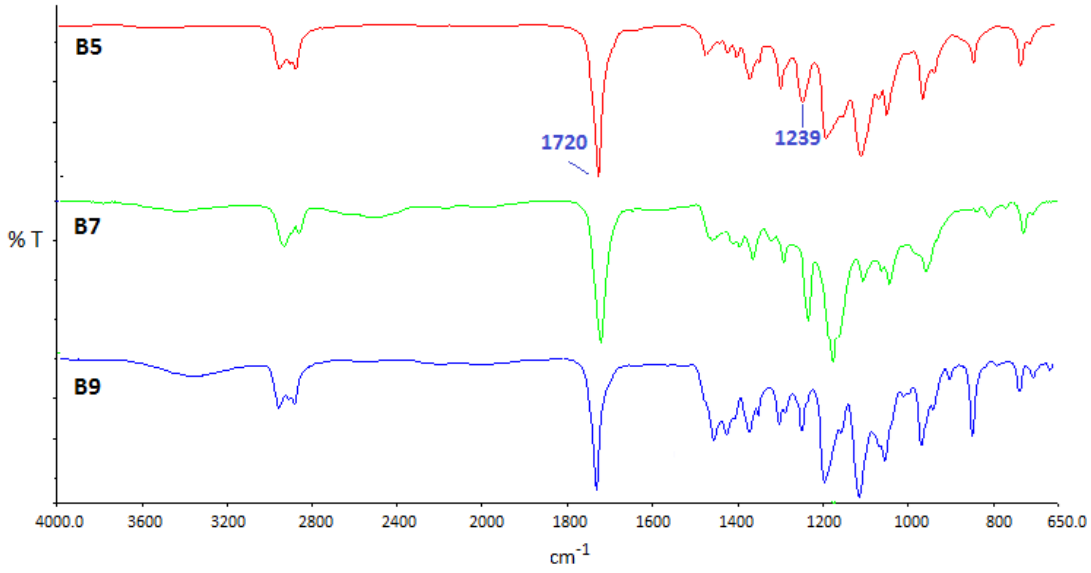
Şekil 4.3'deki mPEG-b-PCL, mPEG-b-PCL-AC ve mPEG-b-PCL-b-PBAE'ye ait olan FTIR spektrumları incelendiğinde; tüm spektrumlarda kopolimer yapıyı oluşturan iki ana bileşen mPEG ve ε-CL'nun karakteristik bandlarının baskın olarak ortaya çıktığı

saptandı. mPEG'in FTIR spektrumu bir polieterin tipik spektral piklerini göstermektedir. Metilen gruplarına ait C-H gerilmesi 2878 cm^{-1}'de gözlenirken, C-H bağının eğilme titreşimleri 1457 cm^{-1}'de görüldü. Bu spektrumun en şiddetli bandı C-O-C eter fonksiyonluluğuna ait gerilme titreşimine bağlı olarak 1111 cm^{-1}'de gözlendi. PCL ana zincirindeki -CH_2- grubuna ait bandlar; C-H gerilmesi çift bant şeklinde 2943 ve 2865 cm^{-1}'de, C-H düzlem içi asimetrik eğilmesi 1462 cm^{-1}'de ve C-H düzlem dışı eğilmesi 727 cm^{-1}'de belirlendi. mPEG bileşiğinin FTIR spektrumunda görülmeyen ancak diblok kopolimere ait spektrumda 1721 cm^{-1}'de görülen şiddetli pik kaprolakton bloğunun ester karbonil grubunun (C=O) gerilme titreşimine aittir. Bu pik ε-CL monomerinin mPEG bileşiğine bağlandığını ve mPEG-b-PCL diblok kopolimerinin elde edildiğini gösterir. mPEg-b-PCL'nin FTIR spektrumunda, mPEG'den gelen eter ve PCL'den gelen ester gruplarının katkısının spektrumun 1335 cm^{-1} ve 985 cm^{-1} bölgesinde bir genişlemeye neden olduğu ve mPEG ve PCL bloklarından oluşan yeni bir kopolimerin oluştuğu görüldü. Bu çalışmada sentezlenen tüm mPEG-b-PCL kopolimerlerinde benzer spektral sonuçlar gözlendi.



Şekil 4. 3 mPEG-b-PCL-b-PBAE'nin FTIR-ATR spektrumu

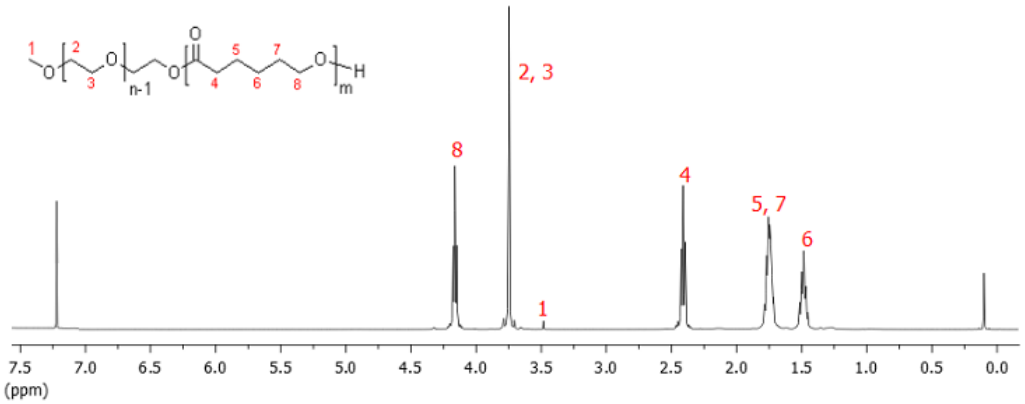
Diblok kopolimerin akrillenmesi ile elde edilen bileşiğe ve triblok kopolimere ait olan spektrumlarda da 1721 cm^{-1} civarında görülen pikler kaprolakton bloğundaki ve diakrilat bileşiğindeki karbonil gruplarına aittir. Dört yapıda da görülen 1223 cm^{-1}'deki orta şiddetli bandın eter gruplarını yani C-O-C asimetrik gerilme titreşimini, 1120 ve 1072 cm^{-1}'deki bandların ise C-O-C simetrik gerilme titreşimlerini karakterize ettiği belirlendi. mPEG-b-PCL kopolimerinin akrillenmesi ile elde edilen bileşiğin spektrumunda 1636 cm^{-1}'de görülen pik akrillenmiş blok kopolimerin C=C gerilmesine ait karakteristik absorpsiyon pikine aittir ve diblok kopolimerinin sonundaki hidroksil gruplarının akrilat gruplarına dönüştüğünü gösterir. mPEG-b-PCL-AC ile mPEG-b-PCL-b-PBAE'nin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında C=C bağına ait absorpsiyon pikinin kaybolması, ana zinciri oluşturmak için zincir sonundaki çifte bağların tamamının C-C tek bağlarına dönüştüğünü gösterir. Ayrıca, 1239 cm^{-1}'de görülen diamin bileşiğindeki C-N bağına ait gerilme piki poli(β-aminoester) bloğunun yapıya bağlandığını destekler.



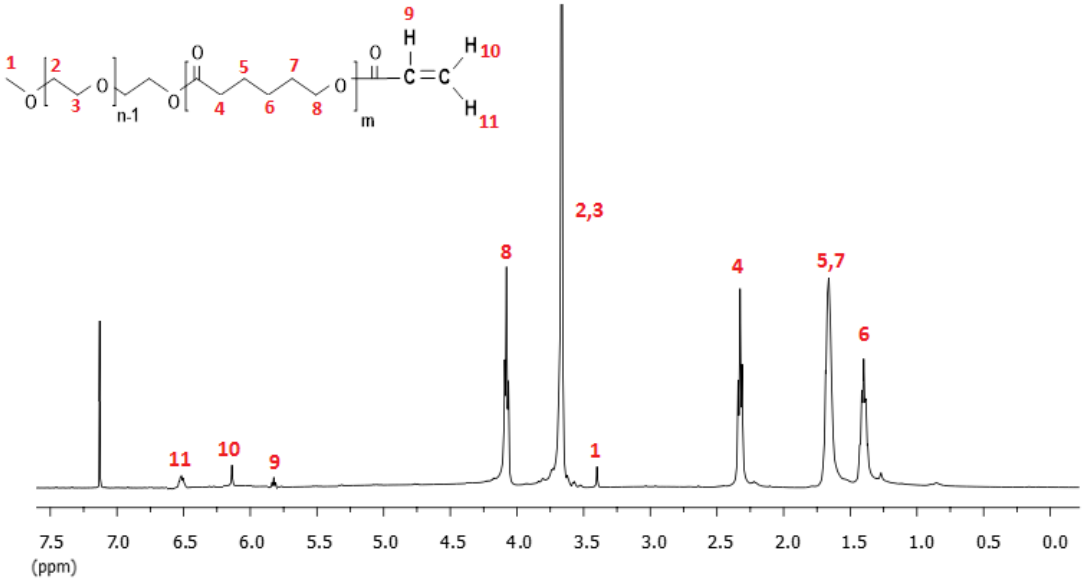
Şekil 4. 4 Farklı PBAE bloğu içeren triblok kopolimerlere ait FTIR-ATR spektrumları

Şekil 4.4'de farklı diamin ve diakrilat bileşikleri kullanılarak sentezlenen triblok kopolimerlere (B5, B7 ve B9) ait FTIR spektrumları verilmektedir. Yukarıda B1 kopolimerini karakterize etmek için açıklanan tüm piklerin bu kopolimerlerin spektrumlarında da görülmesi bu yapıların başarılı bir şekilde sentezlendiğini gösterir.

Ayrıca verilen spektrumlar incelendiğinde farklı triblok kopolimerler oluşturmak üzere yapıya katılan PBAE gruplarının bu kopolimerlerin FTIR spektrumları üzerinde belirgin bir değişiklik meydana getirmediği gözlendi. Bunun sebebi farklı kopolimer yapıları oluşturan amin ve diakrilat bileşiklerinin genellikle aynı gruplara sahip olmasıdır.

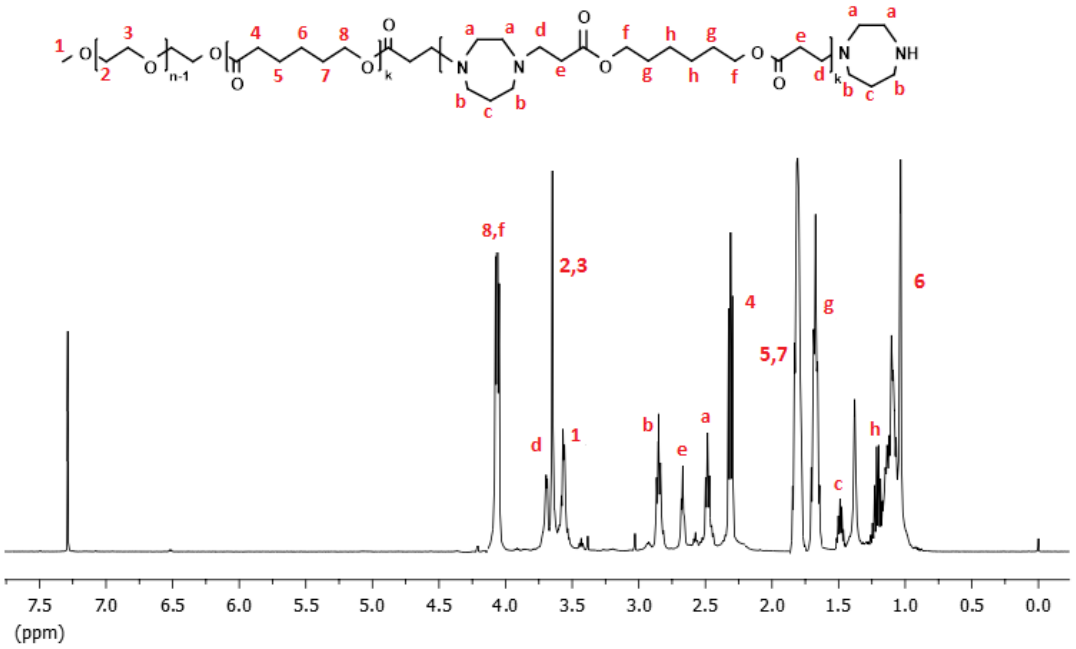


(a)



(b)

Şekil 4. 5 a) mPEG-b-PCL, b) mPEG-b-PCL-AC ve c) mPEG-b-PCL-b-PBAE (B1) kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları



(c)

Şekil 4. 5 a) mPEG-b-PCL, b) mPEG-b-PCL-AC ve c) mPEG-b-PCL-b-PBAE (B1) kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları (devam)

Şekil 4.5 sentezlenen triblok kopolimerlerin kloroform ($CDCl_3$) içerisinde alınmış ^{1}H-NMR spektrumlarını göstermektedir. Tüm spektrumlarda δ~7-7.5 ppm civarında görülen pik çözücü molekülüne aittir.

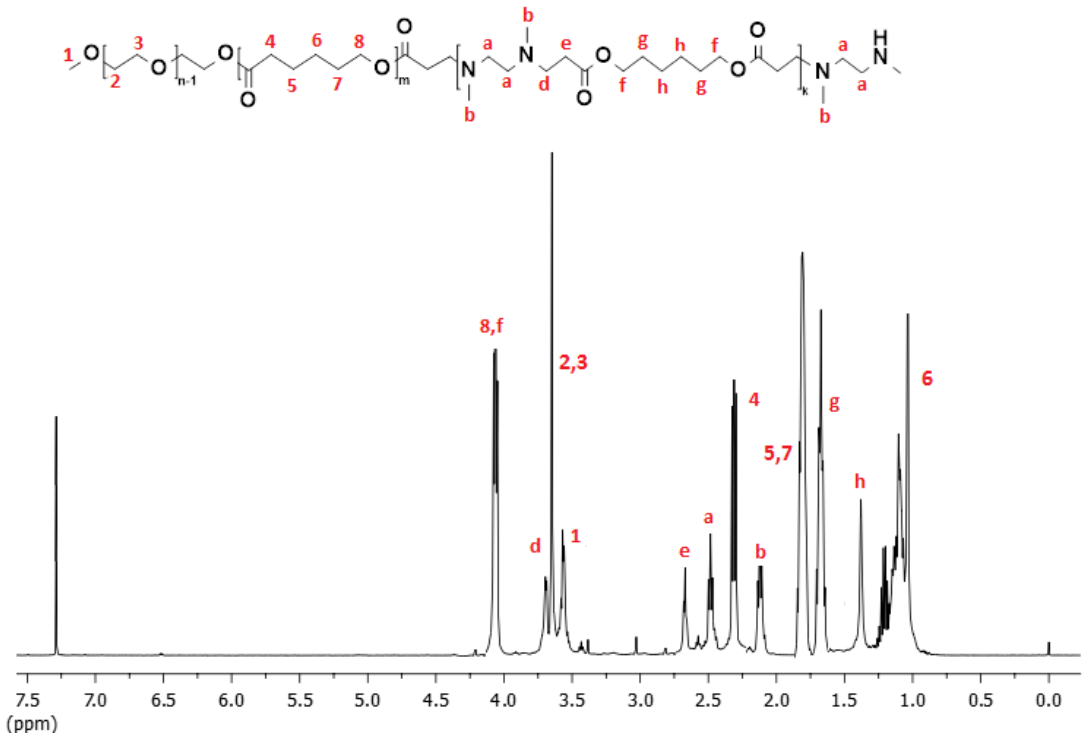
Başlangıçtaki monomer miktarları değiştirilerek ε-CL/mPEG oranı ayarlanan diblok kopolimerin Şekil 4.5.a'da verilen spektrumunda, δ~3,51 ppm'deki 1 nolu küçük pik ve δ~3,75 ppm'deki 2 ve 3 nolu keskin singlet metoksi poli(etilen glikol) bloğunun CH_3O- ve -CH_2CH_2O- protonlarına aittir. Poli(ε-kaprolakton) bloğundaki -CH_2-protonlarına ait olan pikler δ~1,47 ppm (6 nolu pik), 1,72 ppm (5 ve 7 nolu pikler), 2,40 ppm (4 nolu pik) ve 4.18 ppm (8 nolu pik)'de gösterildi. Diblok kopolimerin akrillenmesi ile elde edilen mPEG-b-PCL-AC bileşiğinin sonundaki akriloil grubunun vinil protonlarına ait olan ve 5,82 (9), 6,15 (10) ve 6,52 (11) ppm'de ortaya çıkan pikler akrilleme işleminin başarılı bir şekilde yapıldığını gösterdi (Şekil 4.5.b).

Yapıya diakrilat ve diamin monomerlerinin katılması ile elde edilen triblok kopolimerlere ait spektrum incelendiğinde, mPEG ve PCL gruplarına ait olan ve

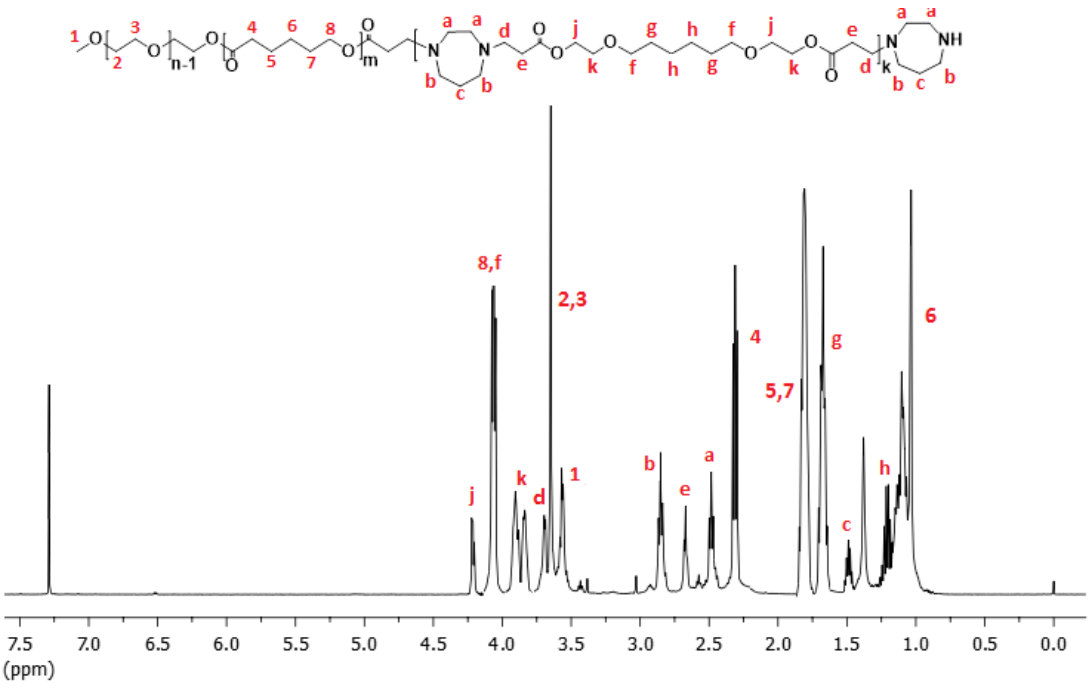
yukarıda açıklanan karakteristik pikler gözlendi. PBAE bloğundaki 1,4-Diazasikloheptanın 7'li halkasındaki –C**H**$_2$- protonlarına ait olan pikler 2,46 ppm (a), 2,89 ppm (b) ve 1,52 ppm (c)'de görüldü. Hekzandiol diakrilat grubunun –C**H**$_2$-protonlarına ait olan 4,13 ppm (f), 1,62 ppm (g) ve 1,17 ppm (h) civarındaki pikler ve akrilat protonlarına ait 3,68 ppm (d) ve 2,61 ppm (e)'deki pikler triblok yapının elde edildiğini kanıtladı. Ayrıca spektrumda 5,82–6,52 ppm arasında gözlenen vinil protonlarına ait olan piklerin kaybolması da zincir sonundaki çifte bağların tamamının reaksiyona girdiğini, dolayısıyla kopolimerleşmenin gerçekleştiğini gösterir.

Şekil 4.6'da verilen farklı diamin ve diakrilat bileşikleri kullanılarak sentezlenen B5, B7 ve B9 triblok kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları incelendiğinde, mPEG ve PCL gruplarına ait olan (1-8 nolu pikler) ve yukarıda ayrıntılı olarak açıklanan karakteristik pikler gözlendi. Ayrıca genel olarak bakıldığında dört farklı triblok kopolimer yapısınında hemen hemen aynı grupları içermesinden dolayı benzer spektrumlar verdikleri görüldü. PBAE bloğunun sentezinde siklo yapılı bir diamin bileşiği yerine alifatik bir diamin bileşiği kullanılarak elde edilen B5 triblok kopolimerinin spektrumuna (Şekil 4.6.a) bakıldığında diamin bileşiğindeki -NC**H**$_3$ protonlarına ait olan pik 2,13 ppm (b)'de, –NC**H**$_2$C**H**$_2$N-protonlarına ait olan sinyal ise 2,51 ppm (a)'de görüldü. mPEG, PCL ve akrilat bileşiğine ait olan diğer ortak pikler B1 kopolimerinin spektrumunda açıklandı.

1,6-Hekzandiol etoksilat diakrilat ve siklo yapılı bir diamin bileşiği kullanılarak sentezlenen B7 kopolimerinin şekil 4.6.b'de verilen spektrumunun B1 kopolimerinden elde edilen spektrumla ortak olan piklerinin yanı sıra 3,86 ppm (k) ve 4,31 ppm (j)'de görülen pikler diakrilatın etoksilat grubundaki –OC**H**$_2$C**H**$_2$- protonlarına aittir. N'-Dimetiletilendiamin ve 1,6-hekzandioletoksilat diakrilat bileşiği kullanılarak sentezlenen B9 triblok kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumunda ise yukarıda ayrıntılı olarak açıklanan mPEG, PCL, diakrilat ve amin bileşiklerinin protonlarına ait pikler görüldü (Şekil 4.6.c).

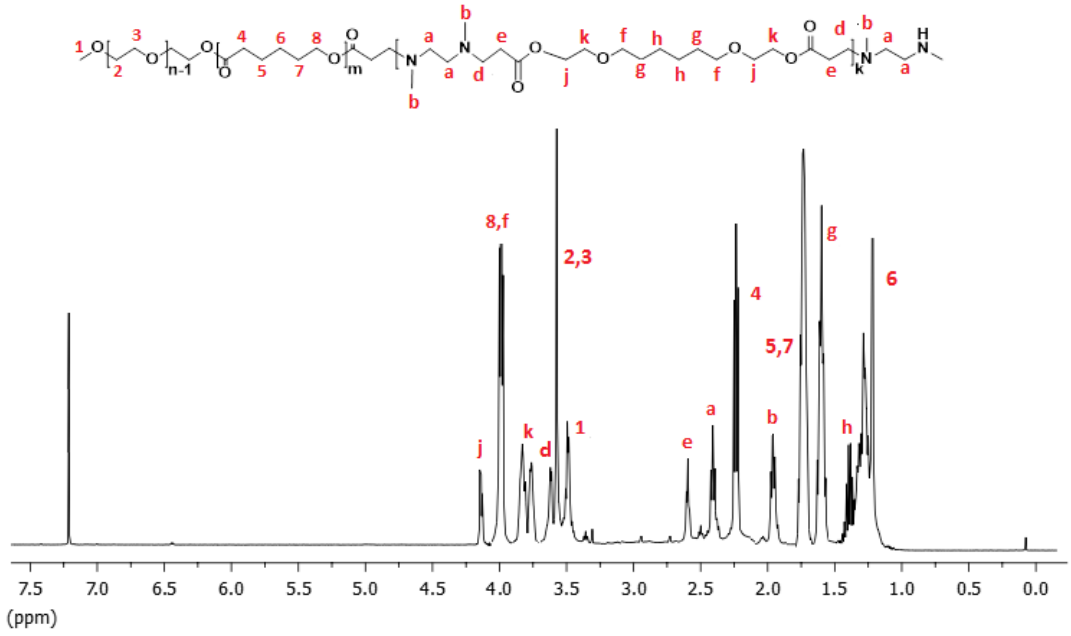


(a)



(b)

Şekil 4. 6 a) B5, b) B7 ve c) B9 triblok kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları



(c)

Şekil 4. 6 a) B5, b) B7 ve c) B9 triblok kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları (devam)

Çizelge 4.1'de sentezlenen triblok kopolimerlerin GPC ve ^{1}H-NMR spektrumlarından elde edilen molekül ağırlıkları ve polidispersite değerleri verildi. Çizelgeden de görüldüğü gibi triblok kopolimerlerin GPC analizinden elde edilen Mn değerleri ^{1}H-NMR spektrumundan hesaplanandan daha büyüktür. Çünkü, GPC ile molekül ağırlığı tayini bağıl bir yöntem olup dar molekül ağırlığı dağılımına sahip polistiren standartlar ile kalibre edilmiştir. Bundan dolayı GPC ile belirlenen molekül ağırlıkları bağıl değerlerdir ve numunenin polistiren eşdeğeri molekül ağırlıkları olarak tanımlanır. Numune ve polistiren standartlar arasındaki yapısal ve kimyasal farklılıklara bağlı olarak, GPC ile mutlak değerden daha büyük veya daha küçük molekül ağırlığı değerleri elde edilir.

mPEG-b-PCL diblok kopolimerinin molekül ağırlığı ^{1}H-NMR spektrumundan mPEG grubunun 3,51 ppm'deki CH_3O- (3H, 1) protonlarına ait pik ile PCL grubunun 2,40 ppm'deki -CH_2- (2H, 4) pikinin integralleri oranlanarak hesaplandı. PCL grubunun polimerizasyon derecesi (<DP>) 25 ve 44 olarak bulundu. mPEG'in <DP> değeri ise bilinen molekül ağırlığı kullanılarak 45 ($\bar{M}_n$: 2000 için) ve 113 ($\bar{M}_n$: 5000 için) olarak belirlendi. Triblok kopolimerlerin $\bar{M}$n değerlerinin hesaplanmasında kopolimerdeki

mPEG'in CH_3O- (3H, 1) ve PBAE'nin -CH_2- (2H, e) proton sinyalleri kullanıldı. Farklı PBAE grupları için hesaplanan polimerizasyon derecesi değerleri Çizelge 4.1'de verildi.

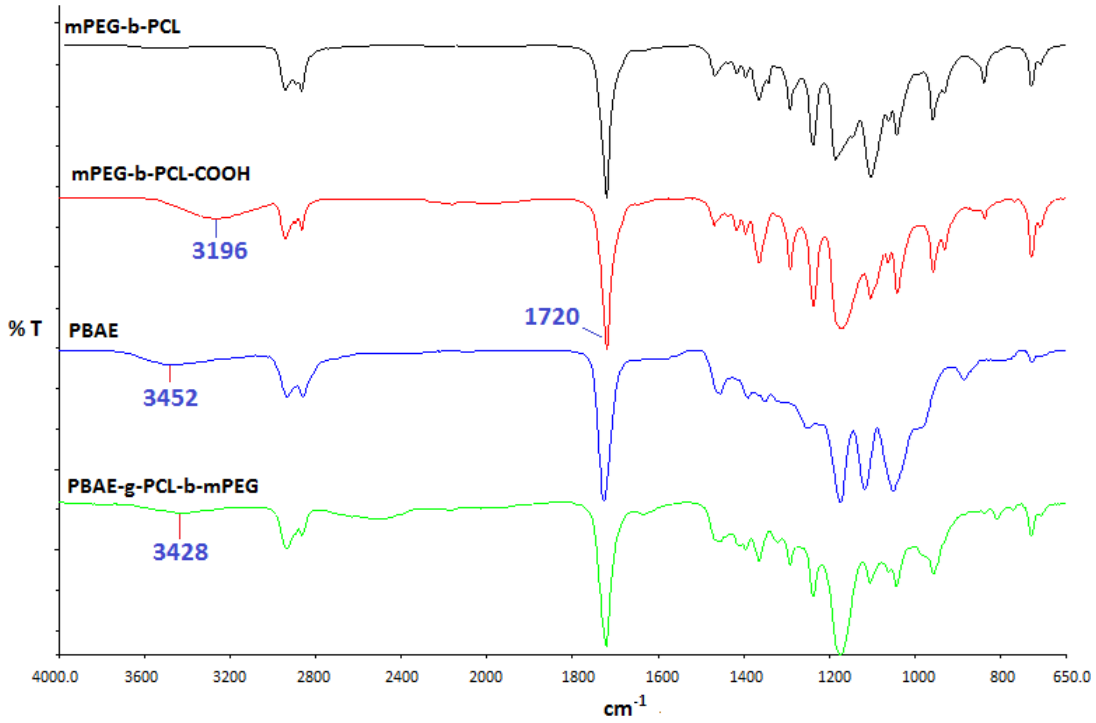
Çizelge 4. 1 Amfifilik triblok kopolimerlerin molekül ağırlıkları ve polidispersiteleri

Polimer	ε-CL: mPEG (mol)	Amin/Diakrilat	$\bar{M}_n$ [b] (PCL)	$\bar{M}_n$ [b]	$\bar{M}_n$ [a]	PDI[a]
B1 ($mPEG_{45}$-b-PCL_{25}-b-$PBAE_{12}$)	25:1	DACH/HDDA	2854	8760	9410	1,14
B2 ($mPEG_{45}$-b-PCL_{44}-b-$PBAE_{12}$)	50:1	″	5010	10915	10743	1,22
B3 ($mPEG_{113}$-b-PCL_{25}-b-$PBAE_{12}$)	25:1	″	2854	11760	12013	1,15
B4 ($mPEG_{113}$-b-PCL_{44}-b-$PBAE_{12}$)	50:1	″	5010	13914	14487	1,31
B5 ($mPEG_{45}$-b-PCL_{25}-b-$PBAE_{15}$)	25:1	DMEDA/HDDA	2854	9550	10125	1,15
B6 ($mPEG_{113}$-b-PCL_{44}-b-$PBAE_{15}$)	50:1	″	5010	14715	15954	1,32
B7 ($mPEG_{45}$-b-PCL_{25}-b-$PBAE_{12}$)	25:1	DACH/HDEDA	2854	9815	10546	1,45
B8 ($mPEG_{113}$-b-PCL_{44}b-$PBAE_{12}$)	50:1	″	5010	14970	16125	1,57
B9 ($mPEG_{45}$-b-PCL_{25}-b-$PBAE_{14}$)	25:1	DMEDA/HDEDA	2854	10480	11340	1,46
B10 ($mPEG_{113}$-b-PCL_{44}b-$PBAE_{14}$)	50:1	″	5010	15630	16478	1,60

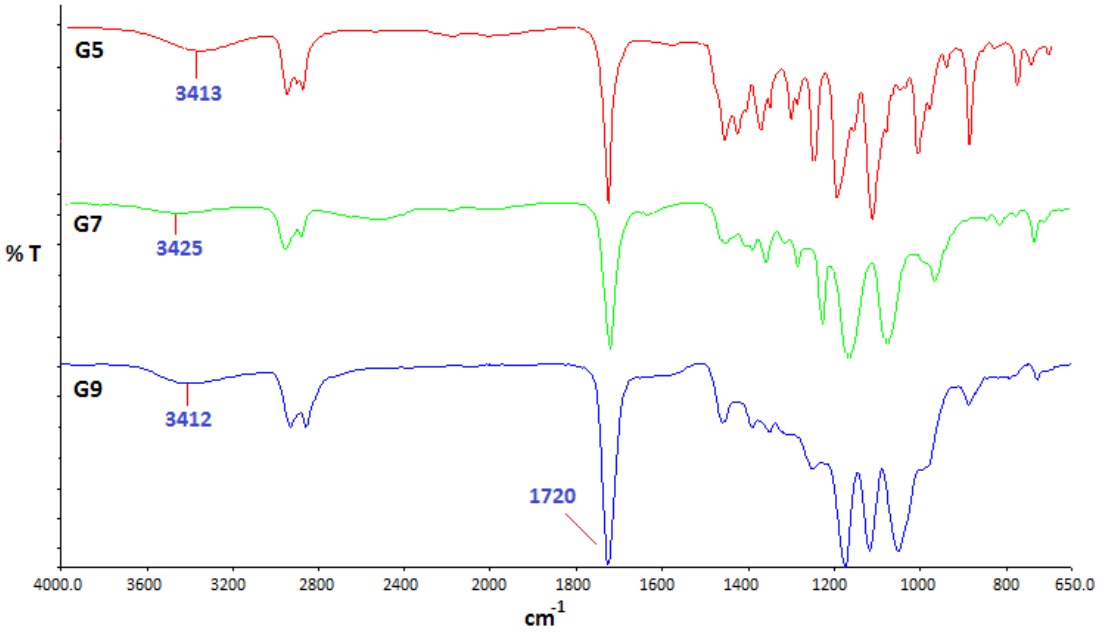
[a]: GPC'den elde edilen sonuçlar
[b]: ^{1}H NMR'dan hesaplanan sonuçlar

4.2.2 Graft Kopolimerlerin Karakterizasyonu

mPEG-b-PCL, mPEG-b-PCL-COOH, PBAE ve PBAE-g-PCL-b-mPEG bileşiklerinin Şekil 4.7'de gösterilen FTIR spektrumlarında, diblok kopolimer yapıyı oluşturan mPEG ve PCL gruplarına ait Bölüm 4.2.1'de ayrıntılı olarak verilen karakteristik bandların baskın olarak ortaya çıktığı saptandı. mPEG-b-PCL grubuna karboksilik asit takılması ile zincir sonundaki -OH grubuna ait pik 3196 cm^{-1}'de görüldü. Hidroksil grubu içeren AEE bileşiği ile DEGDA bileşiği kullanılarak sentezlenen PBAE homopolimerinin spektrumunda 3452 cm^{-1}'de amin bileşiğine ait -OH grubunun gerilme bandı görüldü. PBAE bloğunun diblok kopolimere graft edilmesi ile elde edilen G1 kopolimerindeki -OH grubuna ait bandın 3428 cm^{-1}'e kaydığı belirlendi.



Şekil 4. 7 PBAE-g-PCL-b-mPEG (G1) graft kopolimerinin FTIR-ATR spektrumları



Şekil 4. 8 Farklı PBAE gruplarına sahip graft kopolimerlere ait FTIR-ATR spektrumları

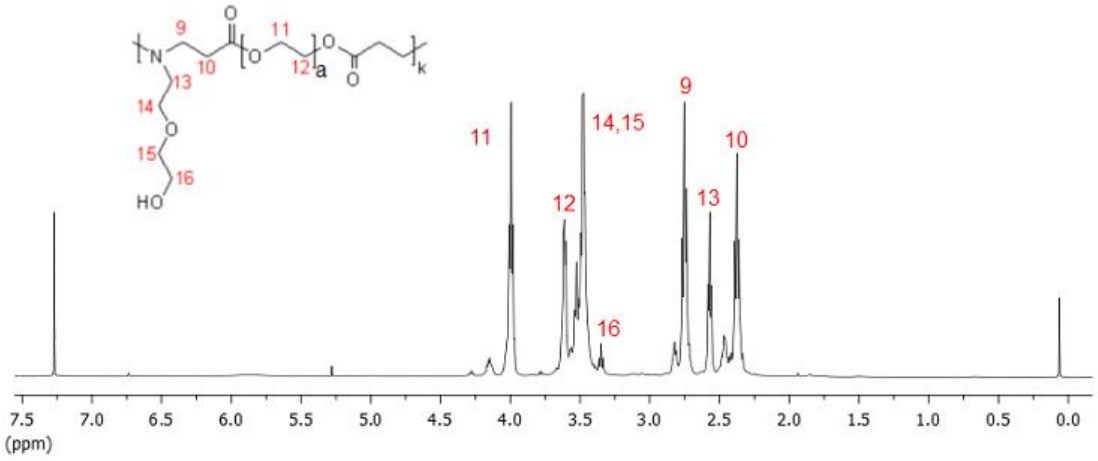
İki farklı amin ve diakrilat bileşiği kullanılarak sentezlenen graft kopolimerlerin Şekil 4.8'de verilen FTIR spektrumları incelendiğinde, genel olarak kullanılan amin ve diakrilat bileşiklerindeki grupların birbirine benzer olmasından dolayı bu grupların değişiminin kopolimerlerin spektrumları üzerinde belirgin bir fark yaratmadığı görüldü.

Elde edilen PBAE-g-PCL-b-mPEG graft kopolimerlerinin oluşumu ^{1}H-NMR spektrumları ile doğrulandı. Graft kopolimer sentezi için mPEG-b-PCL diblok kopolimerinin sonuna süksinik anhidrit kullanılarak bir karbosilik asit grubu takıldı. Şekil 4.9.a'daki spektrumda görüleceği gibi mPEG-b-PCL-COOH kopolimerinin spektrumu her iki segmente (mPEG ve PCL) ait karakteristik sinyalleri içermektedir. Ayrıca 2,75 ppm'de (9) süksinik anhidritteki –C**H**$_2$C**H**$_2$- protonlarına ait olan yeni bir pikin görülmesi mPEG-b-PCL-COOH'ın başarılı bir şekilde elde edildiğini doğruladı.

Şekil 4.9.b'de 2-(2-Aminoetoksi)etanol ve DEGDA (veya PEGDA) bileşikleri kullanılarak sentezlenen pH duyarlı PBAE grubunun ^{1}H-NMR spektrumu gösterildi. Spektrumda; δ (ppm) = 3,94 (11 nolu pik) ve 3,67 (12 nolu pik) (DEGDA veya PEGDA bileşiğinin etoksi protonları, -OC**H**$_2$C**H**$_2$O-); 2,70 (9 nolu pik) ve 2,32 (10 nolu pik) (DEGDA veya PEGDA bileşiğinin akrilat protonları, -NC**H**$_2$C**H**$_2$-) değerlerinde karakteristik sinyaller elde edildi. AEE grubundaki -NC**H**$_2$C**H**$_2$OC**H**$_2$C**H**$_2$O- protonlarına ait olan sinyaller sırasıyla 13 (2.51 ppm), 14, 15 (3.60 ppm) ve 16 (3.34 ppm) nolu piklerle verildi. PBAE, mPEG ve PCL gruplarına ait tüm karakteristik proton sinyallerini içeren ^{1}H-NMR spektrumu (Şekil 4.9.c) sentezlenen PBAE-g-PCL-b-mPEG graft kopolimerinin kimyasal yapısını destekledi.

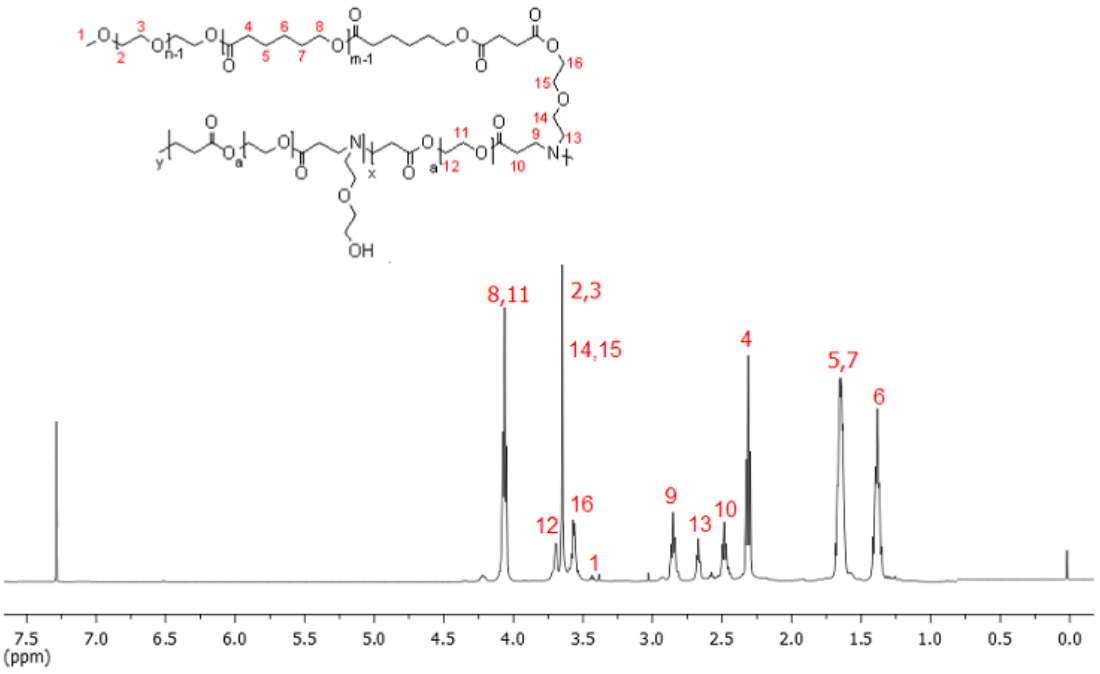


(a)



(b)

Şekil 4. 9 a) mPEG-b-PCL-COOH, b) PBAE, c) PBAE-g-PCL-b-mPEG (G1 veya G5) graft kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları

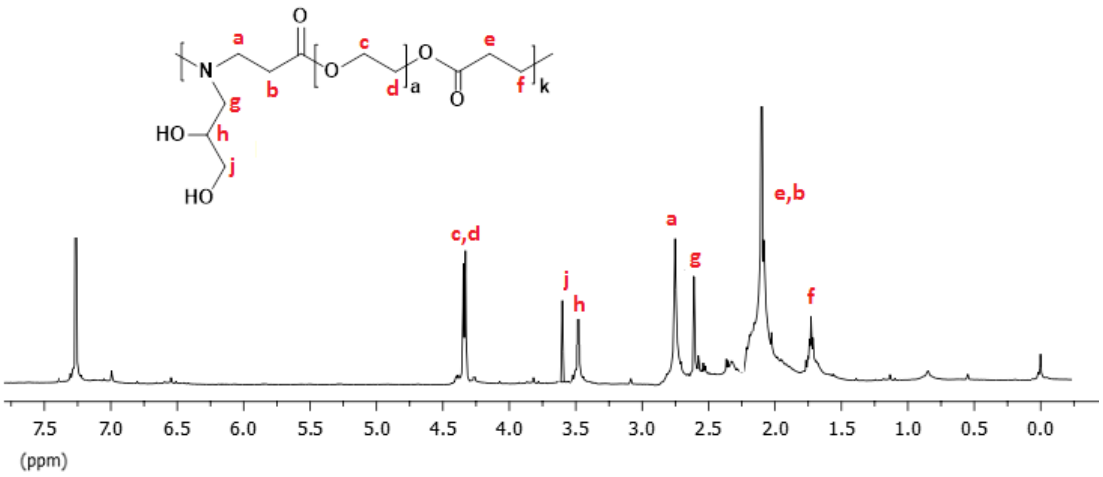


(c)

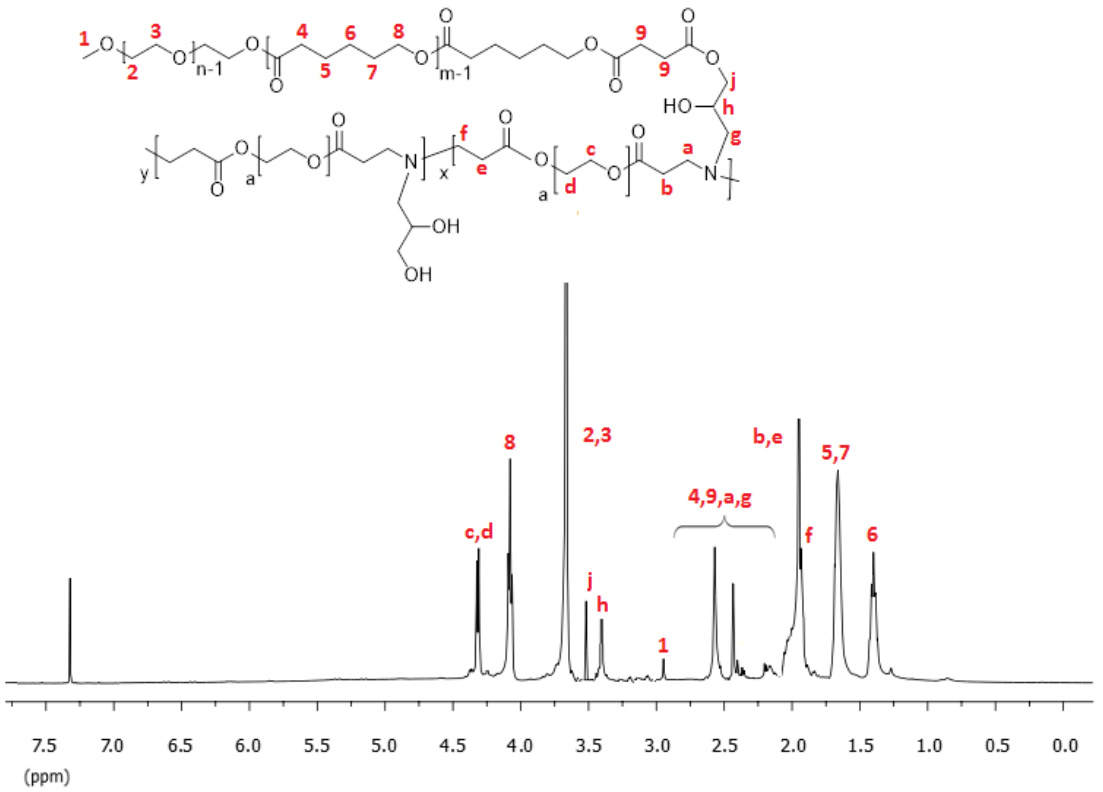
Şekil 4. 9 a) mPEG-b-PCL-COOH, b) PBAE, c) PBAE-g-PCL-b-mPEG (G1 veya G5) graft kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları (devam)

Şekil 4.10, 3-Amino-1,2-propandiol ve DEGDA (veya PEGDA) bileşikleri kullanılarak sentezlenen PBAE grubuna ve bu grup kullanılarak elde edilen G7 (veya G9) graft kopolimerine ait ^{1}H-NMR spektrumunu göstermektedir. Şekil 4.10.a'da gösterilen PBAE'nin ^{1}H-NMR spektrumunda; DEGDA (veya PEGDA) bileşiğinin akrilat ucundaki proton sinyalleri; -C**H**$_2$C(=O)- 2,17 ppm (e,b), -C**H**$_2$CH$_2$C(=O)-1,62 ppm (f) ve -NC**H**$_2$-(a) protonları 2,69 ppm'de görülürken etoksi protonları ise 4,32 ppm'de (c,d) tek pik olarak gözlendi. Ayrıca spektrumda, -NC**H**$_2$C**H**C**H**$_2$- grubunun protonları sırasıyla 2,54 ppm (g), 3,46 ppm (h) ve 3,52 ppm (j)'deki piklerle verildi.

G7 (veya G9) graft kopolimerine ait olan spektrum (Şekil 4.10.b) incelendiğinde yapıdaki mPEG, PCL ve PBAE gruplarındaki tüm protonlara ait rezonanas pikleri görülmektedir. Bundan dolayı graft kopolimer yapının başarılı bir şekilde sentezlendiği söylenebilir.



(a)



(b)

Şekil 4. 10 a) PBAE ve b) PBAE-g-PCL-b-mPEG (G7 veya G9) graft kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları

Çizelge 4.2'de sentezlenen graft kopolimerlerin GPC ve ^{1}H-NMR spektrumlarından elde edilen molekül ağırlıkları ve polidispersite değerleri verildi. mPEG, PCL ve PBAE bloklarının molekül ağırlıkları ve DP değerleri Bölüm 4.2.1'de anlatıldığı şekilde ^{1}H-NMR spektrumlarındaki ilgili piklerin integralleri kullanılarak hesaplandı. PBAE ana zincirine mPEG-b-PCL gruplarının aşılanma oranı ^{1}H-NMR'dan elde edilen M̄n değerleri kullanılarak hesaplandı. PBAE1 homopolimerinin M̄n değeri 3820 g/mol'dur ve tekrarlanan biriminin ağırlığı 319 g/mol olduğundan polimerizasyon derecesi 12 olarak hesaplandı. G1 polimerinin M̄n değeri 18542 g/mol olduğundan 3 adet mPEG-b-PCL zincirinin PBAE grubuna konjuge olduğu görüldü ve graftlaşma oranı % 25 olarak hesaplandı. Benzer şekilde aynı PBAE grubunu içeren G2 kopolimerine 3 adet mPEG-b-PCL bloğu takılmıştır ve graftlaşma oranı % 25'dir. G3 ve G4 kopolimerlerine ise 2 adet mPEG-b-PCL bloğu bağlanmıştır ve graftlaşma oranı % 16,7'dir.

PBAE2 homopolimerinin M̄n değeri 6434 g/mol'dur ve tekrarlanan biriminin ağırlığı 805 g/mol olduğundan polimerizasyon derecesi 8 olarak hesaplandı. 4 adet mEG-b-PCL bloğu takılan G5 kopolimerinin graftlaşma oranı % 50 iken 2 adet mPEG-b-PCL bloğu takılan G6 kopolimerinin graftlaşma oranı % 25'dir.

PBAE3 homopolimerinin M̄n değeri 3654 g/mol'dur ve tekrarlanan biriminin ağırlığı 305 g/mol olduğundan polimerizasyon derecesi 12 olarak hesaplandı. G7 kopolimerine 3 adet mPEG-b-PCL zinciri konjuge olmuştur ve ve graftlaşma oranı % 25'tir. G8 kopolimerine ise 2 adet mPEG-b-PCL zinciri takılmıştır ve graftlaşma oranı % 16,7'dir.

PBAE4 homopolimerinin M̄n değeri 6325 g/mol'dur ve tekrarlanan biriminin ağırlığı 791 g/mol olduğundan polimerizasyon derecesi 8 olarak hesaplandı. 3 adet mEG-b-PCL bloğu takılan G9 kopolimerinin graftlaşma oranı % 37,5 iken 2 adet mPEG-b-PCL bloğu takılan G10 kopolimerinin graftlaşma oranı % 25'dir.

Ayrıca graft kopolimerler PBAE grubunun ana zinciri üzerinde kalan serbest hidroksil gruplarından dolayı farklı uygulamalar için fonksiyonlandırılabilme potansiyeline sahiptir. Farklı yapılardaki PBAE-g-PCL-b-mPEG kopolimerlerinin polidispersite değerleri

incelendiğinde elde edilen küçük değerler kopolimerlerin genellikle dar molekül ağırlığı dağılımına sahip olduğunu gösterdi.

Çizelge 4. 2 Amfifilik graft kopolimerlerin molekül ağırlıkları ve polidispersiteleri

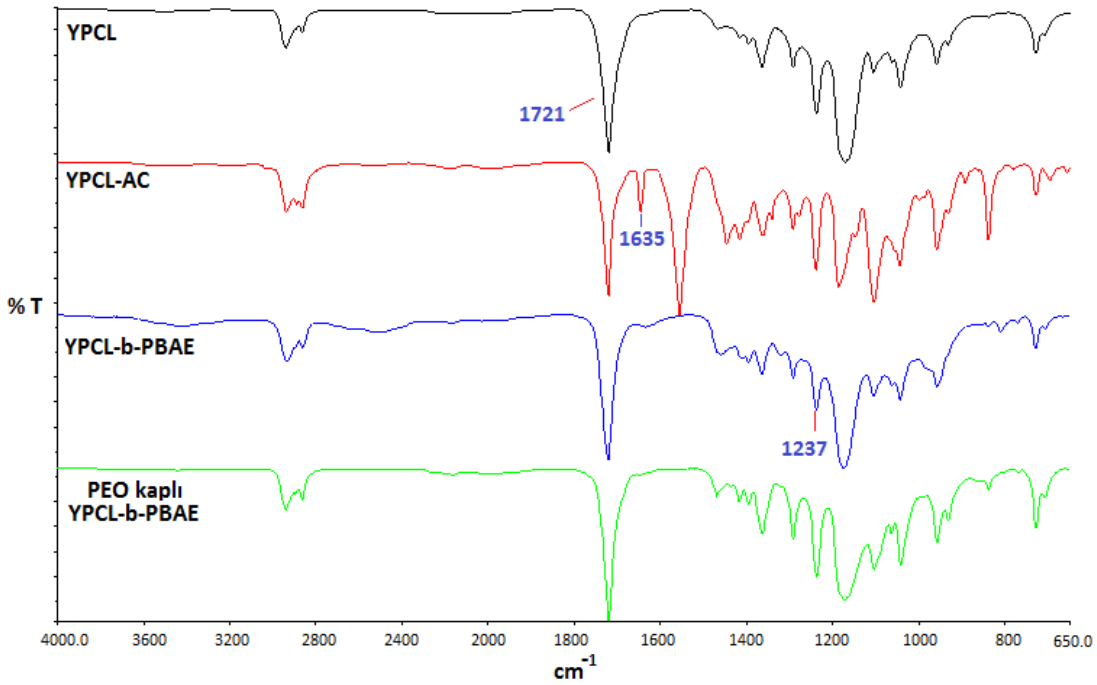
Polimer	ε-CL: mPEG (mol)	Amin/Diakrilat	$\bar{M}_n$ [b] (PCL)	$\bar{M}_n$ [b]	$\bar{M}_n$ [a]	PDI[a]
PBAE1 ($PBAE_{12}$)	-	AEE/DEGDA	-	3820	3852	1,11
PBAE2 ($PBAE_{8}$)	-	AEE/PEGDA	-	6434	6820	1,24
PBAE3 ($PBAE_{12}$)	-	APD/DEGDA	-	3654	3471	1,17
PBAE4 ($PBAE_{8}$)		APD/PEGDA	-	6325	6536	1,21
G1 ($PBAE_{12}$-g-PCL_{25}-b-$mPEG_{45}$)	25:1	AEE/DEGDA	2854	18542	19610	1,32
G2 ($PBAE_{12}$-g-PCL_{44}-b-$mPEG_{45}$)	50:1	″	5010	24840	26625	1,37
G3 ($PBAE_{12}$-g-PCL_{25}-b-$mPEG_{113}$)	25:1	″	2854	19546	20862	1,29
G4 ($PBAE_{12}$-g-PCL_{44}-b-$mPEG_{113}$)	50:1	″	5010	23832	24987	1,41
G5 ($PBAE_{8}$-g-PCL_{25}-b-$mPEG_{45}$)	25:1	AEE/PEGDA	2854	25835	26052	1,28
G6 ($PBAE_{8}$-g-PCL_{44}-b-$mPEG_{113}$)	50:1	″	5010	26450	26984	1,47
G7 ($PBAE_{12}$-g-PCL_{25}-b-$mPEG_{45}$)	25:1	APD/DEGDA	2854	18210	18697	1,26
G8 ($PBAE_{12}$-g-PCL_{44}-b-$mPEG_{113}$)	50:1	″	5010	23667	24492	1,37
G9 ($PBAE_{8}$-g-PCL_{25}-b-$mPEG_{45}$)	25:1	APD/PEGDA	2854	20875	21723	1,19
G10($PBAE_{8}$-g-PCL_{44}b-$mPEG_{113}$)	50:1	″	5010	26340	26987	1,32

[a]: GPC'den elde edilen sonuçlar
[b]: ^{1}H NMR'dan elde edilen sonuçlar

4.2.3 Yıldız Kopolimerlerin Karakterizasyonu

ε-CL'nun başlangıçtaki mol miktarı ile çok fonksiyonlu çekirdeğin (pentaeritritol) hidroksil gruplarının mol oranı ([CL]/[OH] : 5, 10 ve 15) değiştirilerek, sentezlenen 4 kollu yıldız PCL polimerlerinin kollarının uzunluğu ayarlandı. Farklı PCL blok uzunluğuna ve PBAE grubuna sahip olan kopolimerlerin bileşimi, yapısı ve molekül ağırlığının belirlenmesi için FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumları ve GPC analizi kullanıldı.

4 kollu YPCL, YPCL-AC, YPCL-b-PBAE ve PEO kaplı YPCL-b-PBAE polimerlerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.11'de verildi. YPCL polimerine ait olan karakteristik pikler pentaeritritol varlığında 4 kollu YPCL polimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini gösterdi. FTIR spektrumlarında, PCL bloğundan kaynaklanan karbonil grubunun şiddetli gerilme bandı 1721 cm^{-1}'de; PCL'nin metilen gruplarının C-H gerilmesi çift bant şeklinde 2946 ve 2868 cm^{-1}'de ve C-H düzlem içi asimetrik eğilmesi 1462 cm^{-1}'de görüldü. 1240-1174 cm^{-1}'de görülen bantların C-O-C asimetrik gerilme titreşimlerini ve 1127 cm^{-1}'deki bandların ise C-O-C simetrik gerilme titreşimlerini karakterize ettiği belirlendi. Bu çalışmada sentezlenen tüm YPCL polimerlerinde benzer spektral sonuçlar gözlendi.



Şekil 4. 11 PEO kaplı YPCL-b-PBAE (Y1) yıldız kopolimerlerine ait FTIR-ATR spektrumları

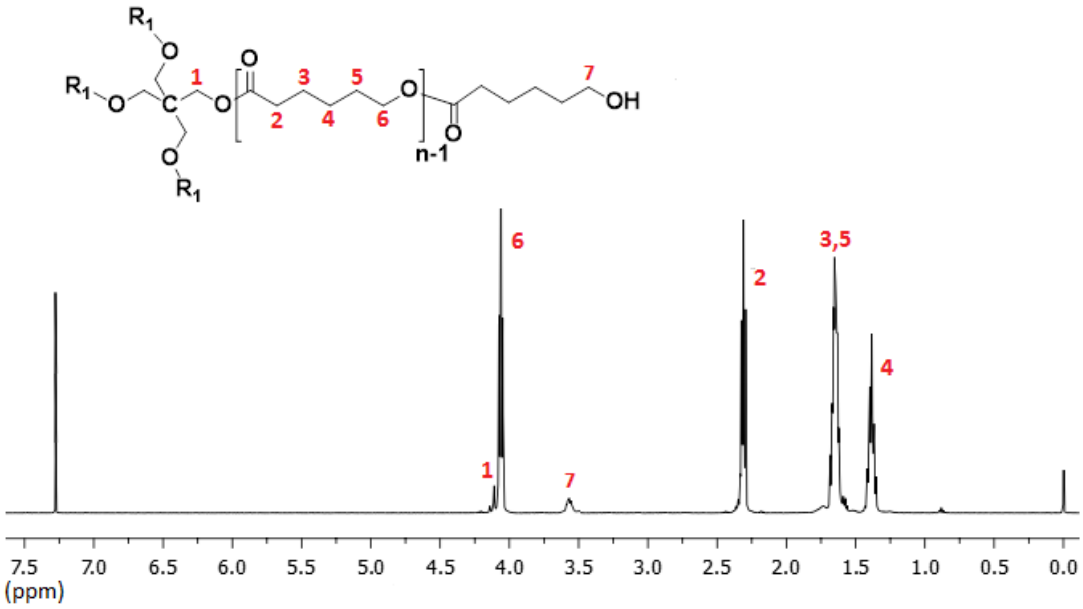
4 kollu YPCL kopolimerinin akrillenmesi ile elde edilen bileşiğe ait FTIR spektrumunda 1635 cm^{-1}'de görülen C=C gerilmesine ait karakteristik absorpsiyon piki yapıya akriloil klorür grubunun başarılı bir şekilde takıldığını kanıtladı. YPCL-b-PBAE blok kopolimerinin FTIR spektrumunda bu pikin kaybolması ana zinciri oluşturmak üzere zincir sonundaki çifte bağların C-C tek bağlarına dönüştüğünü gösterdi. Ayrıca, 1237 cm^{-1}'de görülen amin bileşiğindeki C-N bağına ait gerilme piki PBAE bloğunun yapıya

bağlandığını destekledi. YPCL-b-PBAE blok kopolimerinin PEO ile modifiye edilmiş halinin spektrumunda, yapıda zaten CH_2 ve C-O-C gruplarına ait pikler bulunduğundan dolayı ayırt edici bir fark gözlenmedi.

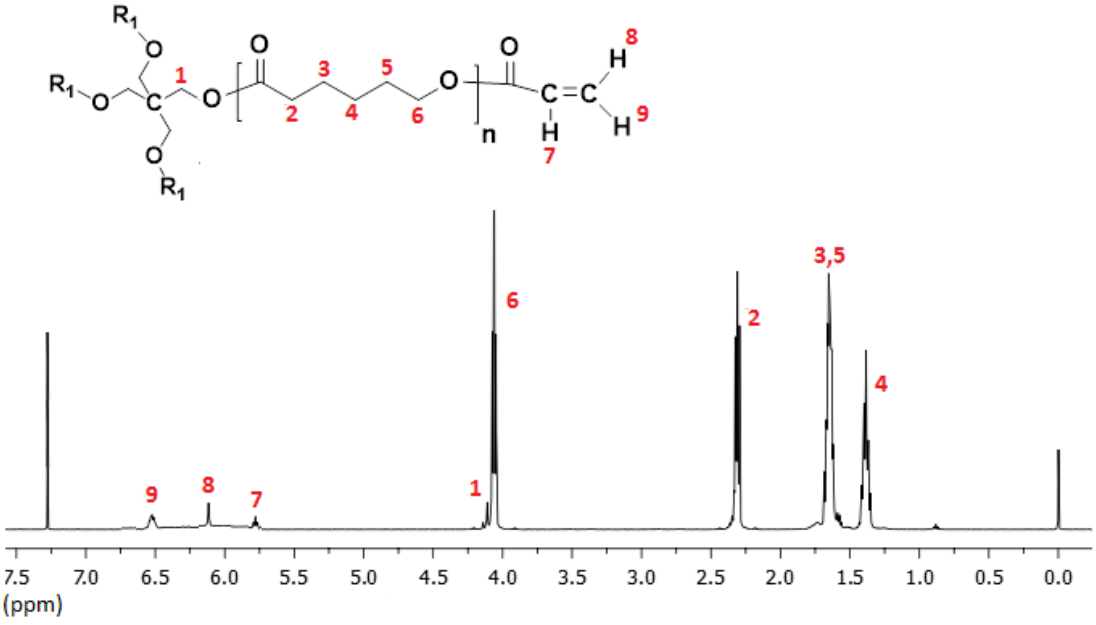
Şekil 4.12.a'da verilen ^{1}H-NMR spektrumundan, ε-CL'nun kalay oktoat katalizörlü halka açılma polimerizasyonunun 4 kollu YPCL polimerlerini sentezlemekte başarılı olduğu görüldü. 1,41 ppm'deki (4) multiplet PCL'nin ortadaki metilen protonlarına (-C**H**$_2$-), 1,52 ppm'de görülen multiplet ise bu metilen grubuna bağlı 3 ve 5 nolu -C**H**$_2$- gruplarına aittir. Ester grubundaki karbonil karbonuna bağlı -(C=O)C**H**$_2$- protonları 2,32 ppm'de (2) triplet olarak rezonans olurken zincir sonundaki oksijene bağlı metilen protonları ise, –C**H**$_2$O-(C=O)-, 4,10 ppm'de (6) triplet olarak görüldü. Uzun PCL zincirinin sonundaki hidroksil grubuna komşu karbona bağlı protonların, -C**H**$_2$OH, 3,65 ppm'de küçük bir pik (7) verdikleri görüldü. PTOL'un metilenoksi grubunun piki yaklaşık olarak 4,12 ppm'de (1 nolu pik) gözlenir ancak bazı spektrumlarda bu pikin 4,10 ppm'de görülen triplet tarafından gizlendiği saptandı.

4 kollu YPCL polimerinin akrillenmesi sonucu elde edilen YPCL-AC polimerinin spektrumunda (Şekil 4.12.b) 3,65 ppm'de gözlenen zincir sonundaki hidroksil grubuna bağlı metilen protonlarına ait pikin kaybolduğu görüldü. Ayrıca 5,55 ile 6,55 ppm arasında gözlenen vinil protonlarına ait 7, 8 ve 9 nolu pikler akriloil grubunun PCL zincirinin sonuna başarılı bir şekilde takıldığını kanıtladı. 1:1 oranında DMEDA ve HDDA bileşikleri kullanılarak sentezlenen YPCL-b-PBAE1 (Y1) kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumunda, PCL'ye ait karakteristik piklerin yanı sıra diakrilat bileşiğinin sinyalleri d,e,f,g,h (3,67 ppm, 2,60 ppm, 4,25 ppm, 1,62 ppm ve 1,41 ppm) pikleri ile verildi. Diamin bileşiğinin –N-C**H**$_2$-C**H**$_2$-N- protonları 2,49 ppm'de (a) –N-C**H**$_3$ protonları ise 2,17 ppm'de (b) gözlendi. DACH ve PEGDA bileşiklerinden sentezlenen Y4 kopolimerinin ^{1}H NMR spektrumunda, PTOL bileşiğine ve PCL polimerine ait metilen gruplarının protonlarına ait olan karakteristik pikler görüldü. Şekil 4.12.d'de gösterildiği gibi diamin bileşiğinin; 2,49 ppm'de (a) -N-C**H**$_2$-C**H**$_2$-N- protonlarına, 2,82 ppm'de (b) –N-C**H**$_2$-CH$_2$-C**H**$_2$-N- protonlarına ve 1,57 ppm'de (c) –N-CH$_2$C**H**$_2$CH$_2$-N- protonlarına ait olan pikler

görüldü. Diakrilat bileşiğinin etilen protonları (f,g) 4,15 ppm'de görülürken akrilat grubundaki metilen protonları (d,e) ise sırasıyla 3,12 ve 2,60 ppm'de gözlendi.

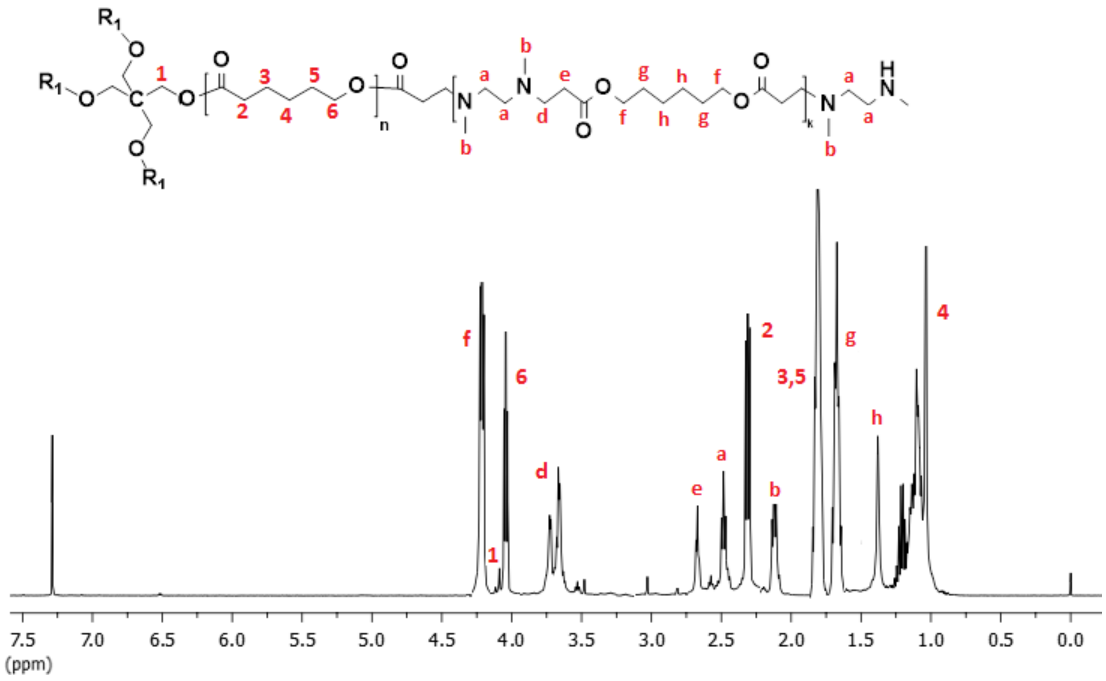


(a)

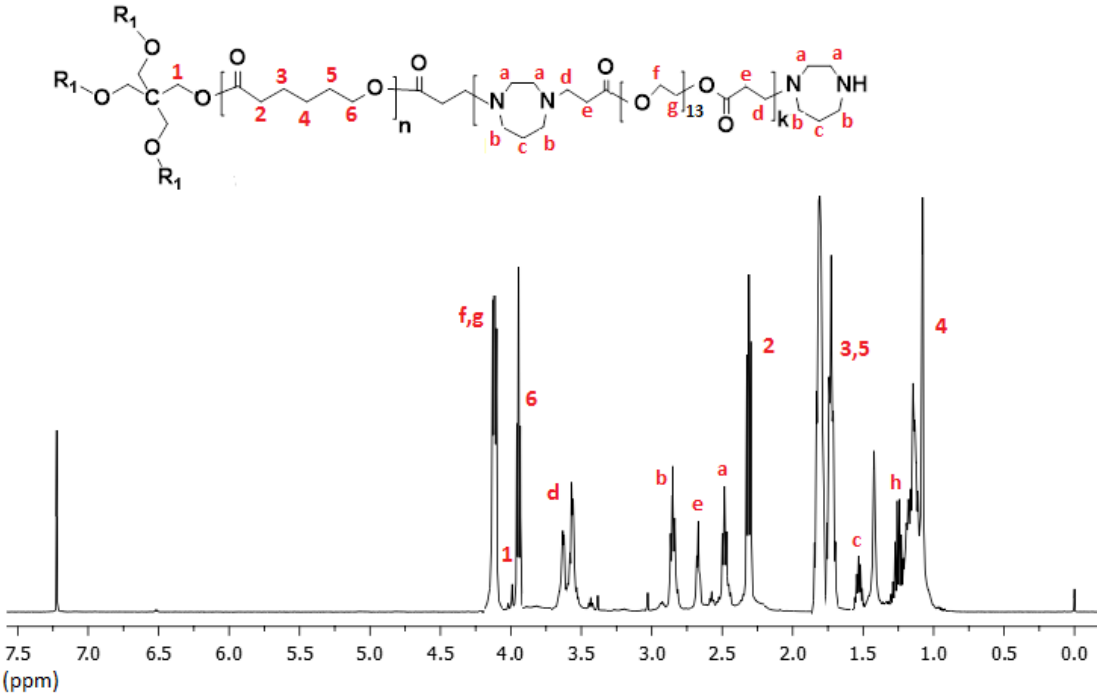


(b)

Şekil 4. 12 a) 4 kollu YPCL, b) 4 kollu YPCL-AC, c) 4 kollu YPCL-b-PBAE1 (Y1) ve d) 4 kollu YPCL-b-PBAE2 (Y4) yıldız kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları



(c)



(d)

Şekil 4. 12 a) 4 kollu PCL, b) 4 kollu PCL-AC, c) 4 kollu PCL-b-PBAE1 ve d) 4 kollu PCL-b-PBAE2 yıldız kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları (devam)

Çizelge 4.3'de sentezlenen yıldız kopolimerlerin GPC ve ^{1}H-NMR spektrumlarından elde edilen ortalama molekül ağırlıkları ve polidispersite değerleri verildi. ^{1}H-NMR spektrumları, yıldız PCL polimerinin çekirdek molekülüne ait herbir hidroksil grubu üzerindeki ε-CL'nun ortalama polimerizasyon derecesini (<DP>) ve sayıca ortalama molekül ağırlığını hesaplamak için kullanıldı. <DP> değeri yani yıldız PCL polimerinin herbir kolunun uzunluğu, 7 nolu (3.65 ppm) pikin 2 nolu (2.31 ppm) pike olan integral oranları kullanılarak hesaplandı. Çizelgedeki değerlere bakıldığında hesaplanan <DP> değerlerinin başlangıçtaki [CL]/[OH] oranlarından tahmin edilen hedef değerlerle uyum içerisinde olduğu görüldü. <DP> değerleri hesaplanan yıldız polimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlığı, $\bar{M}_n$, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı (Eşitlik 4.1).

$$\bar{M}_n = MA_{PTOL} + MA_{CL} \times \langle DP \rangle \times (\text{kol sayısı}) \qquad (4.1)$$

MA_{PTOL} : Pentaeritritolün molekül ağırlığı

MA_{CL} : ε-CL'nun molekül ağırlığı

YPCL-b-PBAE blok kopolimerlerinin bileşimini ve molekül ağırlığını hesaplamak için PCL zincirinin sonundaki -C**H**$_2$O- (2H, 6) protonlarına ait olan 4,10 ppm'deki pik ve PBAE bloğunun -C**H**$_2$- (2H, e) protonlarına ait olan 2,60 ppm'deki pikinden yararlanıldı. PBAE1 ve PBAE2 için <DP> değerleri sırasıyla 6 ve 4 olarak belirlendi.

Çizelge 4. 3 Sentezlenen yıldız kopolimerlerin molekül ağırlıkları

Polimer	[ε-CL]:[OH] (mol)	<DP> (PCL)	Amin/Diakrilat	$\bar{M}_n$[b] (PCL)	$M_{\bar{n}}$[b]	$M_{\bar{n}}$[a]	PDI[a]
Y1 (YPCL1-b-PBAE$_6$)	5:1	4,90	DMEDA/HDDA	2365	9900	9724	1,29
Y2 (YPCL2-b- PBAE$_6$)	10:1	10,10	DMEDA/HDDA	4732	12265	11948	1,42
Y3 (YPCL3-b-PBAE$_6$)	15:1	14,92	DMEDA/HDDA	6927	14460	14261	1,51
Y4 (YPCL1-b-PBAE$_4$)	5:1	4,90	DACH/PEGDA	2365	15162	15078	1,21
Y5 (YPCL2-b-PBAE$_4$)	10:1	10,10	DACH/PEGDA	4732	17530	17430	1,34
Y6 (YPCL3-b-PBAE$_4$)	15:1	14,92	DACH/PEGDA	6927	19725	19698	1,48

[a]: GPC'den elde edilen sonuçlar
[b]: ^{1}H NMR'dan elde edilen sonuçlar

Çizelgede gösterildiği gibi, GPC'den elde edilen sayıca ortalama molekül ağırlığı değerleri ^{1}H-NMR uç grup analizinden elde edilen değerlerden biraz daha düşüktür. Dallanmış yapının neden olduğu hidrodinamik hacim azalmasına bağlı olarak GPC ile dallanmış polimerlerin molekül ağırlığı karakterize edilirken genellikle bu azalma ile karşılaşılır [154]. Dallanmış yapıdaki polimerlerin lineer polistiren standartlarıyla olan göreceli uyuşmazlığına bağlı olarak dallanmış PCL'lerin GPC ile karakterize edilen molekül ağırlıkları gerçek değerleriyle kıyaslandığında daha düşük değerlere doğru sapma gösterir [155], [156]. GPC'den elde edilen sonuçların gerçek değerlerden farklı olduğu bilinse de polimerlerin polidispersite değerlerini hesaplamak için yararlıdır. Yıldız kopolimerlerin PDI değerlerinin 1,21-1,51 arasında oldukları ve genel olarak molekül ağırlığının artması ile polidispersite değerlerinin de arttığı saptandı.

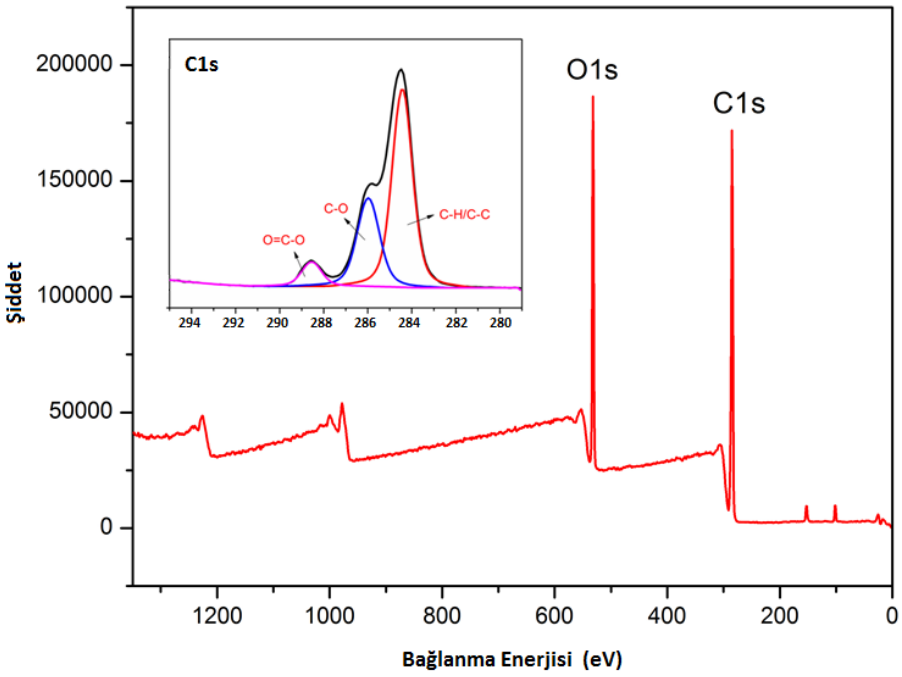
4.2.3.1 PEO Kaplı Yıldız Kopolimer Nanotaneciklerin Karakterizasyonu

PEO yüzey modifikasyonu, nanotaneciklerin kararlılığını arttırmak ve onlara koruyucu bir hidrofilik kılıf sağlayarak hidrofobik çekirdeğin proteinler ve enzimlerle olan etkileşimlerini önlemek için kullanılan bir yöntemdir [157]. Pluronik F-108 (PEO_{122}-PPO_{56}-PEO_{122})'in hidrofobik orta bloğu (PPO) benzer yapıdaki hidrofobik PCL-b-PBAE kopolimeri için yüksek etkinliğe sahip olduğu için polimerik nanotanecik oluşumu sırasında sulu çözeltisinden tanecik yüzeyine fiziksel olarak adsorplanır. Hidrofilik PEO yan zincirler ise hareketli halde kalır ve sulu ortama doğru yönlenerek tanecik yüzeyinden dışarı uzanır. Uzun PEO zincirlerinin bu şekilde yönlenmesi nanotanecik yüzeyinin hidrofilik olmasını sağlar ve aynı zamanda güçlü sterik engellemeyle taneciklerin agregasyonunu engelleyerek kararlılığını arttırır [157]. Pluronic F-108 kullanılarak tanecik oluşumu sırasında fiziksel adrorpsiyonla yüzeyi PEO ile kaplanan nanotaneciklerin karakterizasyonu XPS kullanılarak yapıldı.

XPS, malzemelerin 10 nm kalınlığındaki yüzey tabakasının yapısı ve kimyasal bileşimi hakkında bilgi veren bir yüzey analiz yöntemidir. Bu yöntemde, malzeme üzerine yollanan X-ışınları yüzeydeki atomların iç kabuklarındaki enerji seviyelerinde bulunan

elektronların fotoelektrik olay sonucu orbitallerinden saçılmasına neden olur. Bu seviyelerden uyarılan ve fotoelektron adı verilen elektronların kinetik enerjilerinden yola çıkılarak bağlanma enerjileri hesaplanır. Bağlanma enerjisi çevresel etkenlere ve malzemenin karakteristik özelliklerine (elektronun geldiği element ve bu elementin kimyasal çevresi) bağlı olduğu için, bu yöntemle elde edilen spektrumdaki piklerin enerjileri tespit edilerek malzeme yüzeyinin bileşimi bulunabilir [158].

XPS yönteminde spektrumlar geniş tarama ve yüksek çözünürlüklü çoklu tarama olmak üzere iki farklı tarama yapılarak kaydedilir. Şekil 4.13'de PEO kaplı Y1 kopolimerinin geniş tarama ve yüksek çözünürlüklü çoklu tarama XPS spektrumları verildi. Geniş tarama XPS spektrumundan, PEO kaplı Y1 kopolimerinin sadece karbon ve oksijenden oluştuğu görüldü. Karbon 1s (C1s) kabuğunda yapılan yüksek çözünürlüklü çoklu taramadan elde edilen C-H, C-C (hidrokarbon), C-O (eter) ve O-C=O (karbonil) piklerinin karakteristik bağlanma enerjileri kullanılarak piklerin altında kalan alanlar hesaplandı ve PEO ile kaplı nanotaneciklerin yüzeyindeki kimyasal fonksiyonel gruplar belirlendi.



Şekil 4. 13 PEO kaplı Y1 kopolimerinin XPS spektrumu

Çizelge 4.4 PEO ile kaplanan ve kaplanmayan yıldız kopolimer nanotaneciklerin C1s kabuğunda yüksek çözünürlük gösteren ve karakteristik bağlanma enerjileri sırasıyla 285,0 eV, 286,5 eV ve 288,0 eV olan C-H-, -C-O- ve –C=O- piklerinin oranlarını vermektedir. Farklı amin ve diakrilat bileşikleri içeren Y1 ve Y4 kopolimerlerinin PEO ile kaplanmadan önceki XPS pik analizleri incelendiğinde birbirlerine yakın oranlarda hidrokarbon (Y1-%77, Y4-%74), eter (Y1-%14, Y4-%16) ve karbonil (Y1-%9, Y4-%10) grupları içerdikleri görüldü. PEO zincirlerinin yüzeydeki varlığı C1s spektrumunun eter (-C-O-) sinyalindeki artış ile doğrulandı. % 14 C-O-C içeren Y1 kopolimeri PEO ile kaplandığında C-O-C oranının artarak % 23,7'e çıktığı görüldü. Yani Y1 kopolimerinin PEO ile kaplanması sonucu yüzeydeki -C-O-C sinyalinde % 69 artış gözlendi.

Çizelge 4. 4 Yıldız kopolimer nanotaneciklerinin yüzey elementel bileşimlerinin yüksek çözünürlüklü C1s pik analizleri

Kopolimer	**Pik Alanı (%)**		
	C-H /C-C (285,0 eV)	**C-O-C (286,5 eV)**	**C=O (288,0 eV)**
Y1	77,0	14,0	9,0
Y4	74,0	16,0	10,0
PEO kaplanmış Y1	70,3	23,7	6,0
PEO kaplanmış Y2	68,7	25,3	6,0
PEO kaplanmış Y3	66,2	27,2	6,7
PEO kaplanmış Y4	72,6	21,0	6,4
PEO kaplanmış Y5	73,3	21,4	5,3
PEO kaplanmış Y6	68,9	25,0	7,1

Yüzey modifikasyonu polimerik çekirdek ile Pluronik'in orta PPO bloğu arasındaki hidrofobik etkileşimlere bağlı olduğu için kopolimerin hidrofobikliği etkili bir kaplama için çok önemlidir [159]. Bundan dolayı [ε-CL]:[OH] oranı daha yüksek olan yani daha uzun PCL kollarına sahip Y3 kopolimer taneciğinde PPO bloklarının güçlü bir şekilde adsorplandığı ve dolayısıyla tanecik yüzeyinde daha fazla PEO grubunun tutulduğu görüldü.

Hidrofilik karakteri yüksek olan PEGDA bileşiğini içeren Y4, Y5 ve Y6 yıldız kopolimerlerinin hidrofobikliği Y1, Y2 ve Y3 kopolimerlerine göre daha düşüktür ve PPO bloğu ile daha zayıf hidrofobik etkileşimler oluşturduklarından yüzeylerinde bulunan PEO miktarı daha azdır. Aynı [ε-CL]:[OH] oranına sahip olan Y1 yıldız kopolimeri Y6 ile kıyaslandığında daha hidrofobik yapıda olduğu için, nanotanecik yüzeyinde tutulan PEO zincirlerinin yüzdesi daha fazladır (Y1-% 23,7, Y2-% 25,0).

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, Pluronik'in PEO zincirlerinin polimerik nanotanecik yüzeyine etkili bir şekilde bağlandığı görüldü.

4.3 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Karakterizasyonu

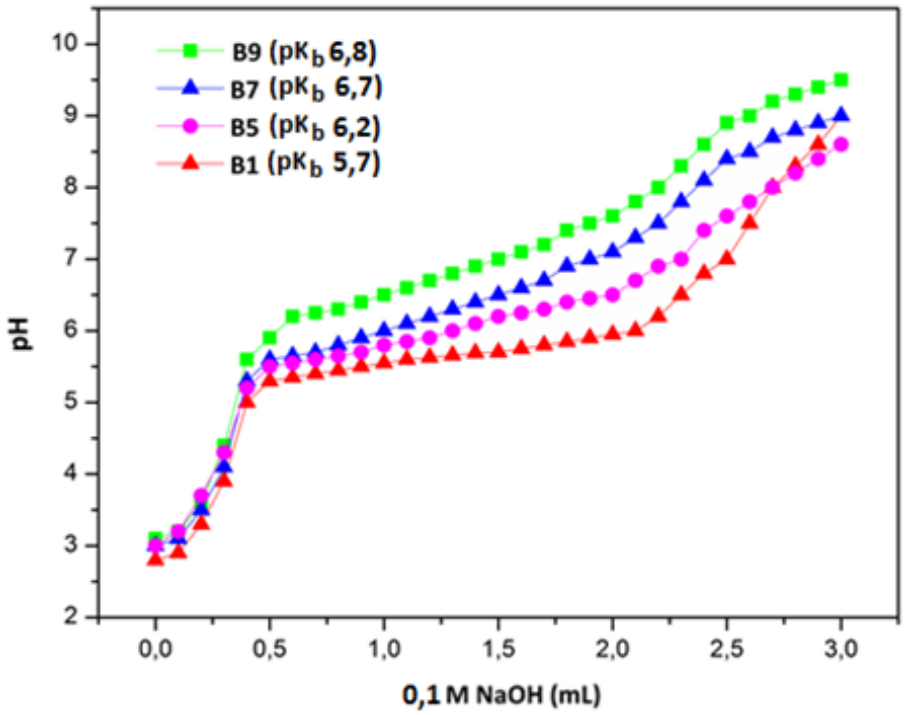
4.3.1 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin pH Duyarlılıkları

PBAE tersiyer amin gruplarından dolayı bazik karakterdedir ve pK_b değeri yaklaşık olarak 6,5'tir. Bundan dolayı pK_b değerinin (pH 6,5) altındaki pH'larda iyonize olur yani çözünürken pK_b değerinin üzerinde deiyonize haldedir yani çözünmez. pH duyarlı bir polimer olan PBAE titre edilebilen tersiyer amin gruplarından dolayı yüksek tamponlama kapasitesine sahiptir [160].

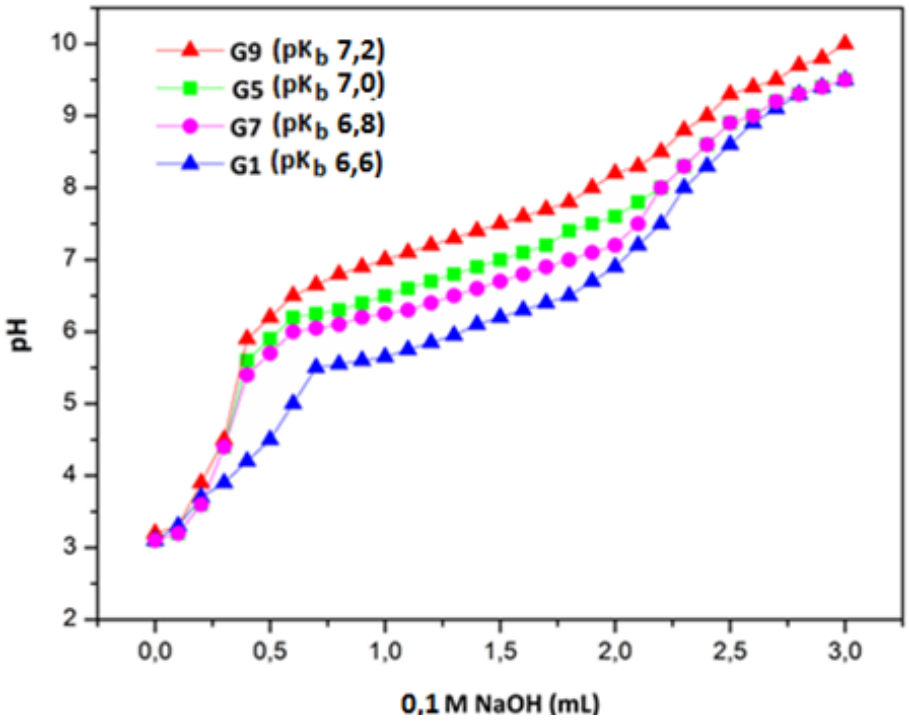
Farklı yapılarda sentezlenen kopolimerlerin sahip oldukları pH duyarlı blokların asit baz titrasyon yöntemi ile pH tamponlama özellikleri belirlendi. İlave edilen NaOH miktarının kopolimer çözeltisinin pH değişimine karşı çizilen grafikte titrasyon eğrisinin dönüm noktası kopolimerlerin pK_b değerini verir. Şekil 4.14'de verilen sonuçlar incelendiğinde, kopolimer çözeltilerine 0,1 M NaOH çözeltisi ilave edildiğinde pH değerinin çok hızlı bir şekilde 3,0'ten 6,0'ya çıktığı görüldü. Ancak PBAE bloğundaki tersiyer amin grupları deprotonlanmaya başladığından dolayı pH değeri 6,0'yı geçtikten sonra pH artışının yavaşladığı gözlendi.

Şekil 4.14'de verilen asit-baz titrasyon eğrileri PBAE grubu içeren kopolimerlerin geniş bir pH bölgesinde pH duyarlı özellik gösterdiğini ve tamponlama bölgeleri (pH 5-8) oldukça farklı olmasına rağmen elde edilen tüm kopolimerlerin pH tamponlama

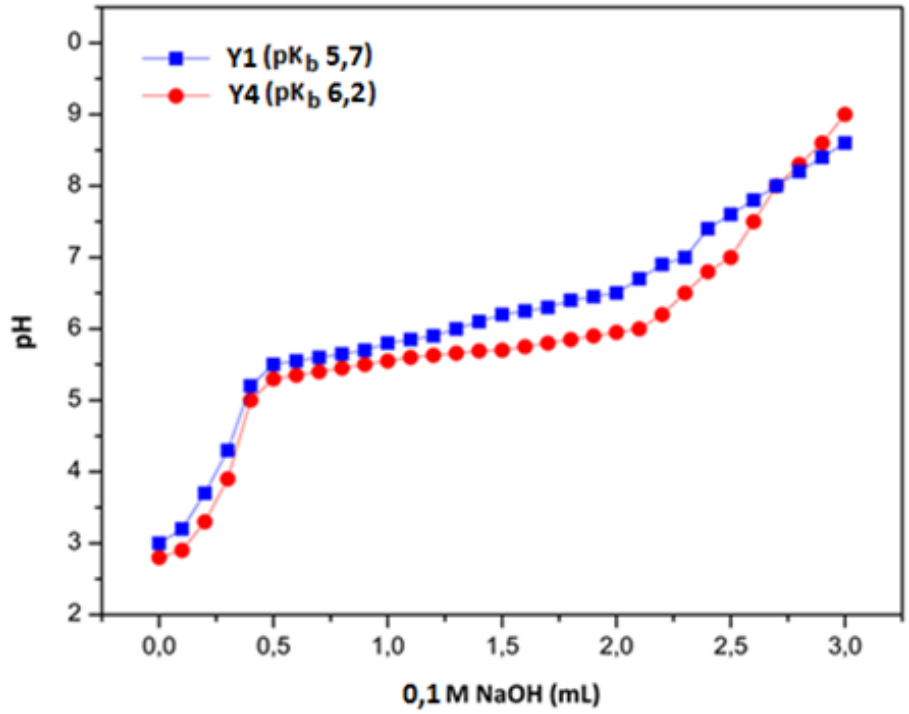
kapasitesinin olduğunu kanıtladı. Her kopolimer için farklı bir pK_b değeri olması, kullanılan amin ve diakrilat monomerlerinin pK_b değerleri üzerinde belirgin bir etkisinin olduğunu gösterdi. Örneğin triblok kopolimerlerin sentezinde kullanılan amin bileşikleri dikkate alındığında (B1, B5, B7, B9) pK_b değerlerinin sırasıyla 5,7, 6,2, 6,7 ve 6,8 olduğu görüldü. Buradan siklik bir yapıya sahip olan 1,4-diazasikloheptanın yapıda bulunmasının alifatik amin zincirine göre pK_b değerini düşürdüğü görüldü. Yapıya hidrofilik gruplar eklendikçe pK_b değerleri genellikle daha yüksek bölgeye kayar. HDEDA monomerinin kullanıldığı B7 ve B9 kopolimerlerin pK_b değerlerinin (6,7 ve 6,8) HDD bileşiğinin kullanıldığı B1 ve B5 kopolimerlerinin pK_b değerlerine (5,7 ve 6,2) göre daha yüksek olması etoksilat grubunun yapıya kazandırdığı hidrofiliklikten dolayıdır.



Şekil 4. 14 Amfifilik triblok kopolimerlerin titrasyon eğrileri



Şekil 4. 15 Graft kopolimerlerin titrasyon eğrileri



Şekil 4. 16 Yıldız kopolimerlerin titrasyon eğrileri

Şekil 4.15'de verilen titrasyon eğrilerinden PEGDA ile hazırlanan graft kopolimerlerin pK_b değerlerinin DEGDA ile hazırlananlara göre daha düşük olduğu görüldü. Bunun sebebi artan etilen glikol birimlerinin sayısının kopolimerin hidrofilikliğini arttırmasıdır. Ayrıca, kopolimer bileşimindeki pH duyarlı bloğun molekül ağırlığı arttıkça, pH hassasiyeti daha yüksek olur [161]. Bundan dolayı büyük molekül ağırlığına sahip PBAE grubu içeren G5 ve G9 graft kopolimerlerinde pH geçiş bölgesinin daha yüksek pH değerlerine kaydığı ve pK_b değerlerinin daha yüksek olduğu görüldü.

Yapısında çift hidroksil grubu bulunan APD bileşiği daha hidrofilik olduğundan dolayı AEE ve APD bileşiği kullanılarak hazırlanan G1 ve G7 kopolimerlerinin pK_b değerlerinin 6,6'dan 6,8 değerine yükseldiği görüldü. Yıldız kopolimerlere ait titrasyon eğrileri incelendiğinde (Şekil 4.16), sahip olduğu çok sayıdaki etilen glikol gruplarından dolayı hidrofilik karakteri yüksek olan PEGDA bileşiğini içeren Y4 kopolimerinin pK_b değerinin (6,2) siklik yapıdaki amin (DACH) ve HDDA bileşiğini içeren Y1 kopolimerinin pK_b değerinden (5,7) daha yüksek olduğu görüldü.

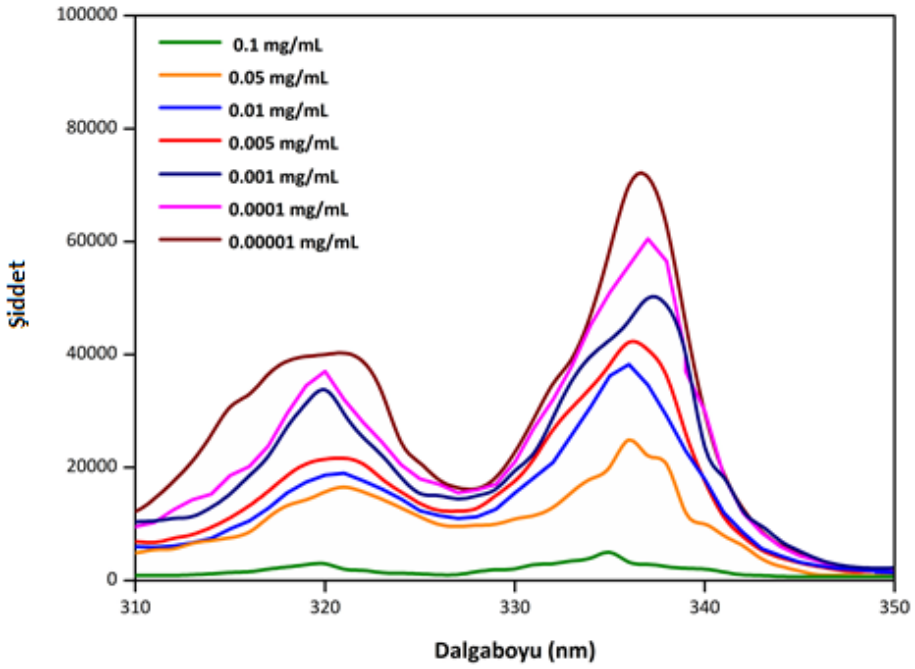
Elde edilen sonuçlar, kopolimerlerin pK_b değerlerinin monomerlerin alkil gruplarını ve hidrofilikliğini değiştirerek ayarlanabileceğini gösterdi. Siklo yapıdaki amin bileşiği gibi daha fazla alkil grubuna sahip kopolimerlerin tersiyer amin gruplarının protonlanması için yüksek proton konsantrasyonu gerekir ve bundan dolayı pK_b değeri daha düşük bölgeye kayar. Bununla birlikte, yapıya hidrofilik gruplar katıldığında kopolimerlerin pK_b değerleri daha yüksek bölgeye kayar.

4.3.2 Polimerik Misellerin Kritik Misel Konsantrasyonları

Polimerik misellerin CMC değerleri kendisini çevreleyen ortamın polaritesine bağlı olarak floresan özelliği değişim gösteren piren kullanılarak belirlendi. CMC değerinin altındaki polimer çözeltilerinde piren polar bir ortam olan suda düşük bir çözünürlüğe ($6x10^{-7}$M) sahipken, polimerik miseller oluşmaya başladığında polar olmayan hidrofobik çekirdekte tutularak suda çözünür hale gelir ve eşzamanlı olarak spektroskopik özelliklerinde değişiklik gözlenir [162]. Amfifilik kopolimerlerin CMC

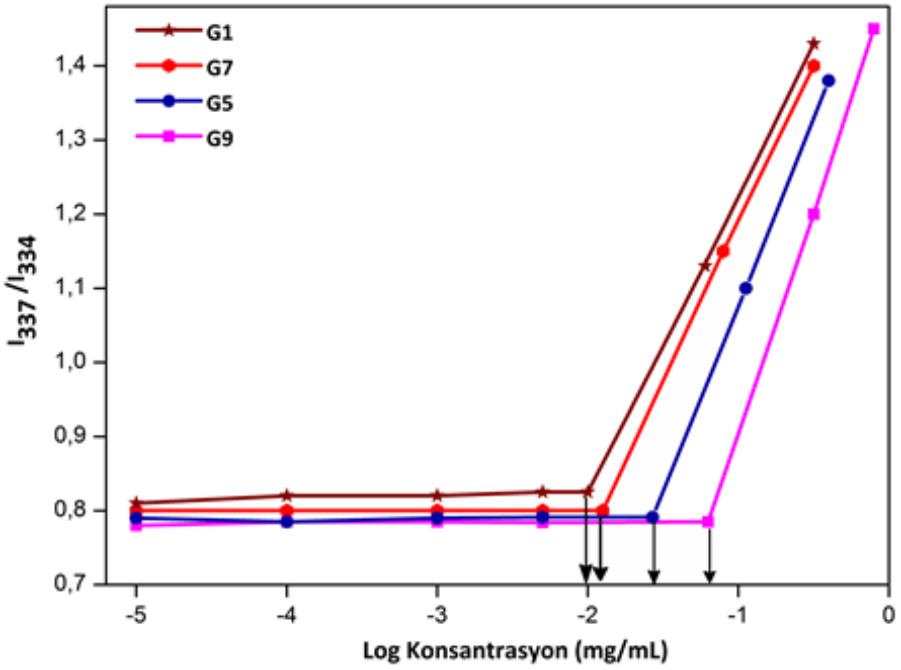
değerini belirlemek için hazırlanan kopolimer çözeltileri CMC değerinin altına seyreltildiğinde misel yapısı bozulur, çekirdeğe yüklenen piren su ortamına salınır ve emisyon spektrumunda kırmızı kayma gözlenir. Piren molekülünün floresans spektrumundaki değişim B1 kopolimeri için gözlendi ve Şekil 4.17'de verildi.

Bütün kopolimerlerin çekirdeği aynı polimerden (PCL) oluşmuş olmasına rağmen pirenin emisyon spektrumundaki dalga boylarında meydana gelen kayma değerleri farklıdır. Örneğin G1 kopolimeri için 334 nm'den 337 nm'ye kayma gözlenirken, B1 kopolimeri için 336 nm'den 339 nm'ye kayma görüldü. Kopolimerlerin yapısında bulunan pH duyarlı PBAE grubu floresans ölçümlerinin alındığı bu pH değerinde (pH 7,4) deiyonize halde olup kopolimerin hidrofobikliğine katkı sağlar. Bu PBAE grupları farklı amin ve diakrilat monomerlerinden oluştuğu için hidrofobikliği aynı değildir ve misel çekideğinin toplam hidrofobikliğini etkilediği için farklı dalga boylarında kaymalara sebep olur.



Şekil 4. 17 B1 kopolimerinin floresans spektrumu

Kopolimer konsantrasyonunun I_1/I_3 bantlarının şiddetlerinin oranına karşı çizilen grafiğin eğiminin aniden değiştiği nokta CMC değerini verir. Bu prensibe dayanarak çalışmada sentezlenen kopolimerlerin sulu ortamda misel oluşturma davranışları incelendi.



Şekil 4. 18 G1, G5, G7 ve G9 kopolimerlerinin CMC grafikleri

Kritik misel konsantrasyonu kopolimerin toplam molekül ağırlığı, çekirdeği oluşturan hidrofobik bloğun uzunluğu ve yapısı, hidrofilik bloğun uzunluğu ve hidrofilik/hidofobik blok oranı olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Ancak CMC üzerindeki en büyük etkiyi çekirdeği oluşturan bloğun uzunluğu ve yapısı sağlar. Floresans ölçümlerinden yararlanılarak çizilen grafiklerden elde edilen kritik misel konsantrasyonu değerleri Çizelge 4.5'de verildi. Blok kopolimerlerin CMC değerlerine bakıldığında, aynı PBAE grubuna sahip B1-B4 kopolimerleri için hidrofobik bloğu büyük (PCL 2) ve hidrofilik bloğu küçük (mPEG:2000) olan B2 triblok kopolimerinin en küçük CMC değerine (0.001 mg/mL) sahip olduğu görüldü. Hidrofobik bloğu kısa ve hidrofilik mPEG bloğu uzun olan B3 kopolimeri ise serinin en yüksek CMC değerine (0,007 mg/mL) sahip üyesidir. B5 ve B6 kopolimerlerinin CMC değerleri ise sırasıyla 0,017 ve 0,016 mg/mL'dir. Farklı PBAE

grupları söz konusu olduğunda ise, yapısında hidrofilik etoksilat grupları içeren B7-B10 kopolimerlerinin daha yüksek CMC değerlerine sahip olduğu gözlendi. Bu sonuçlardan kopolimerlerin PCL içeriği arttıkça hidrofobik karakterinin arttığı ve bundan dolayı CMC değerinin düştüğü; kopolimerlerin hidrofilik karakteri arttıkça da CMC değerinin arttığı belirlendi.

Graft kopolimerlerin PBAE bloğunun sentezinde hidroksil grubu içeren amin bileşiklerinin ve etilen glikol birimi içeren diakrilat bileşiklerinin kullanılması yapının hidrofilikliğini önemli derecede arttırarak CMC değerlerinin de yükselmesine neden olur. Bu etki, çok sayıda etilen glikol birimine sahip PEGDA ve 2 hidroksil grubu içeren APD bileşiklerinden sentezlenen PBAE4 grubu içeren G9 ve G10 kopolimerlerinde görüldü. Bu kopolimerler 0,063 mg/mL ve 0,068 mg/mL olmak üzere en yüksek CMC değerlerine sahiptir. Bunu tek hidroksil grubu ve PEGDA bileşiğini içeren G5 (0,031 mg/mL) ve G6 (0,034 mg/mL) kopolimerleri izler. G1, G7, G5 ve G9 kopolimerlerinin floresans spektrumları kullanılarak CMC değerlerinin belirlenmesi için çizilen grafikler Şekil 4.18'de verildi. Sabit PCL blok uzunluğuna sahip G1, G7, G5 ve G9 kopolimerlerinin, PBAE grubunun yapıya kazandırdığı hidrofiliklik arttıkça CMC değerlerinin (sırasıyla 0,009 mg/mL, 0,011 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,063 mg/mL) de arttığı görüldü.

Yüksek molekül ağırlığına sahip olan örneklerde misel birleşmelerinin erken başlamasından dolayı düşük CMC değerleri gözlenir. Bu durumda, çok seyreltik çözeltilerde bile misel yapılarının oluşumu görülür. G2 ve B4 kopolimerlerinin beklenen düşük CMC değeri yüksek molekül ağırlıklı kopolimerlerin düşük CMC değerine sahip olduğunu kanıtlar.

Çizelge 4. 5 Farklı yapılardaki kopolimerlerin CMC değerleri

Blok Kopolimer	CMC (mg/mL)	Graft Kopolimer	CMC (mg/mL)
B1	0,006	G1	0,009
B2	0,001	G2	0,015
B3	0,007	G3	0,010
B4	0,003	G4	0,012
B5	0,017	G5	0,031
B6	0,016	G6	0,034
B7	0,018	G7	0,011
B8	0,021	G8	0,017
B9	0,038	G9	0,063
B10	0,029	G10	0,068

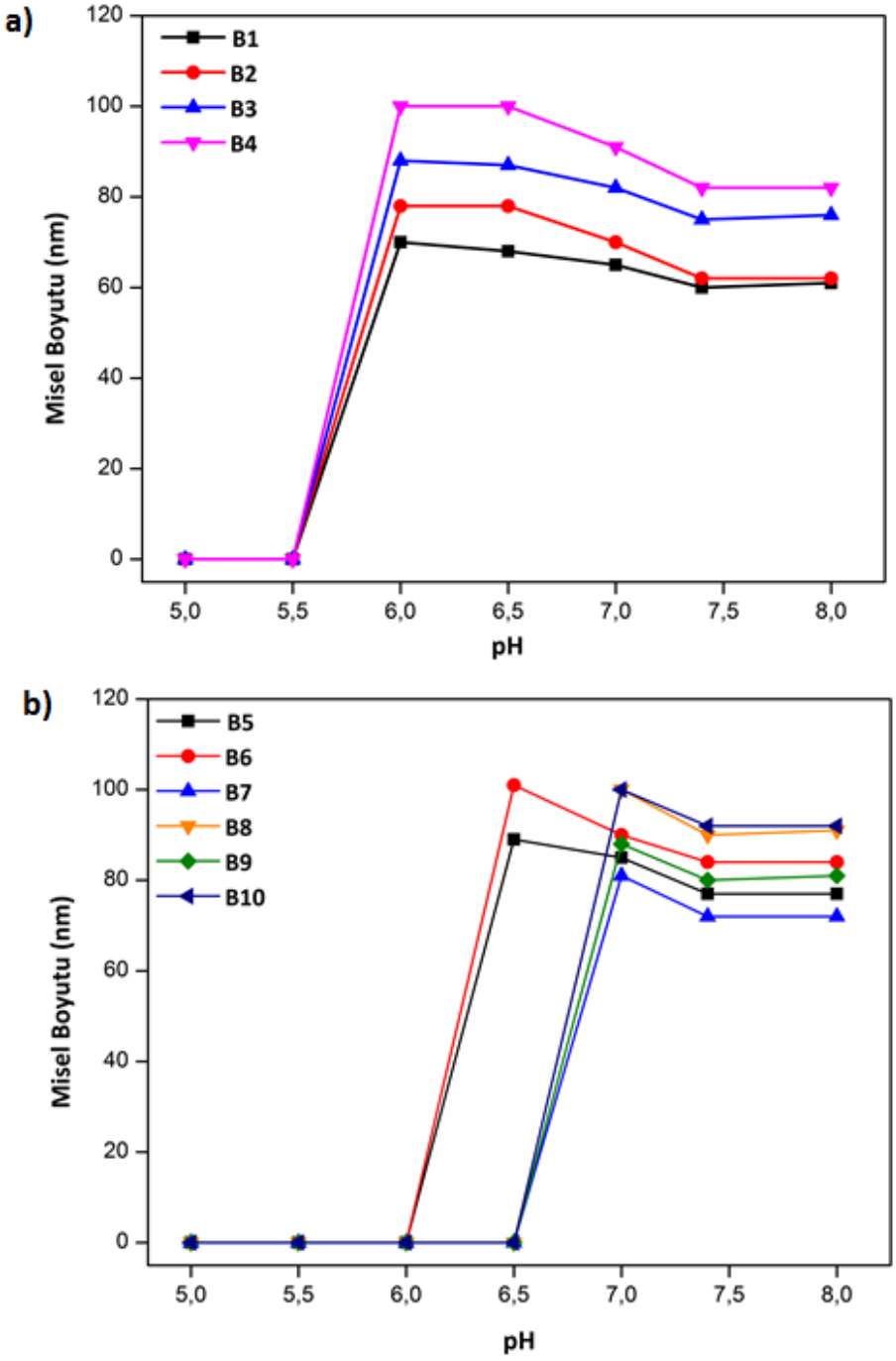
Genel olarak elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, lineer blok kopolimerlerin CMC değerlerinin dallanmış yapıdaki graft kopolimerlerinkinden daha düşük olduğu saptandı. Bunun sebebi dallanmış yapıların unimerlerin agregasyonunu engelleyerek misel oluşumunu güçleştirmesidir. Ayrıca, düşük molekül ağırlığına sahip kopolimerlerin daha kolay misel oluşturdukları ve artan molekül ağırlığından dolayı CMC değerlerinin daha yüksek değerlere kaydığı ve misel oluşumunun zorlaştığı belirlendi. Düz zincirli yapıların CMC değerlerinin aynı molekül ağırlığına ve hidrofilik/hidrofobik orana sahip diğer kopolimerlerinkinden genellikle daha düşük olduğu belirlendi. Misel kabuğunu oluşturan hidrofilik blok sabit tutulduğunda, çekirdeği oluşturan bloğun molekül ağırlığındaki artışın CMC değerini düşürdüğü, çekirdeği oluşturan blok sabit tutulduğunda ise hidrofilik bloğun uzunluğundaki artışın CMC değerinin de artmasına neden olduğu görüldü. Elde edilen düşük CMC değerleri, vücutta sistemik dolaşım sırasında karşılaşılan büyük hacim artışının neden olduğu aşırı seyrelmeden sonra bile blok kopolimerlerden oluşan misellerin çözelti içinde iyi bir denge sağlayacağını gösterir [163].

4.3.3 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Boyutu ve Boyut Dağılımı Analizi

Sentezlenen kopolimerlerden diyaliz yöntemi ile elde edilen misellerin farklı pH değerlerindeki boyutları ölçüldü. Farklı yapılardaki kopolimerlerden elde edilen misellerin farklı pH'lardaki tanecik boyutu dağılımları incelendiğinde tüm misel örneklerinin benzer davranış gösterdiği görüldü. Genel olarak pH 5,5'in altında herhangi bir tanecik boyutunun gözlenmemesi bu koşullar altında kopolimerlerin misel oluşturmadığını ve ortamda tek zincirler halinde bulunduğunu gösterdi. Ortamın pH'ı yaklaşık 6,0 ile 7,0 arasında olduğu zaman ise tanecik boyutunda gözlenen keskin bir artış misel oluşumunu doğruladı.

Kopolimer çözeltilerinin pH'ı 7,4 olduğu durumda elde edilen misel boyutu, pH değeri düştükçe azalır. pH arttıkça ise polimer zinciri deprotonlanmakta ve bu durum ana zincirdeki pozitif yüklerin mizeli genişletme etkisini azaltmaktadır. Yüksek pH değerlerinde deiyonize halde olan PBAE blokları kararlı bir misel yapısı gösterirken, pH değeri düştükçe PBAE grubundaki tersiyer amin grupları iyonize olur ve misel yapısı şimeye başlar. PBAE grubunun protonlanması misellerin polaritesinin artmasına neden olur ve pH duyarlı kopolimerler bu pH değerinin altında suda tamamen çözünür. Pozitif yükle yüklenen kopolimer zincirleri birbirini iteceğinden dolayı çözeltinin pH'ı düştükçe misel yapısı tamamen bozulur ve kopolimerler tek zincirler haline ayrışır.

PBAE grubunun tersiyer amin gruplarının düşük pH'ta protonlanarak tamamen iyonize olması ile pH duyarlı blok kopolimerler daha hidrofilik olur ve hidrofilik/hidrofobik denge artar. Misel çekirdeğinin hidrofobikliğine katkı sağlayan PBAE grubunun hidrofilik karakter kazanması miselin net hidrofobikliğini azaltır ve misel çekirdeği daha gevşek hale gelir. Ortamın pH değerinin azalması ile miselin hidrofilik bloğunun büyüdüğü ve misellerin yoğun olan yapıdan şişmiş yapıya dönüştükleri, bunun da misel boyutunun büyümesine neden olduğu görüldü.



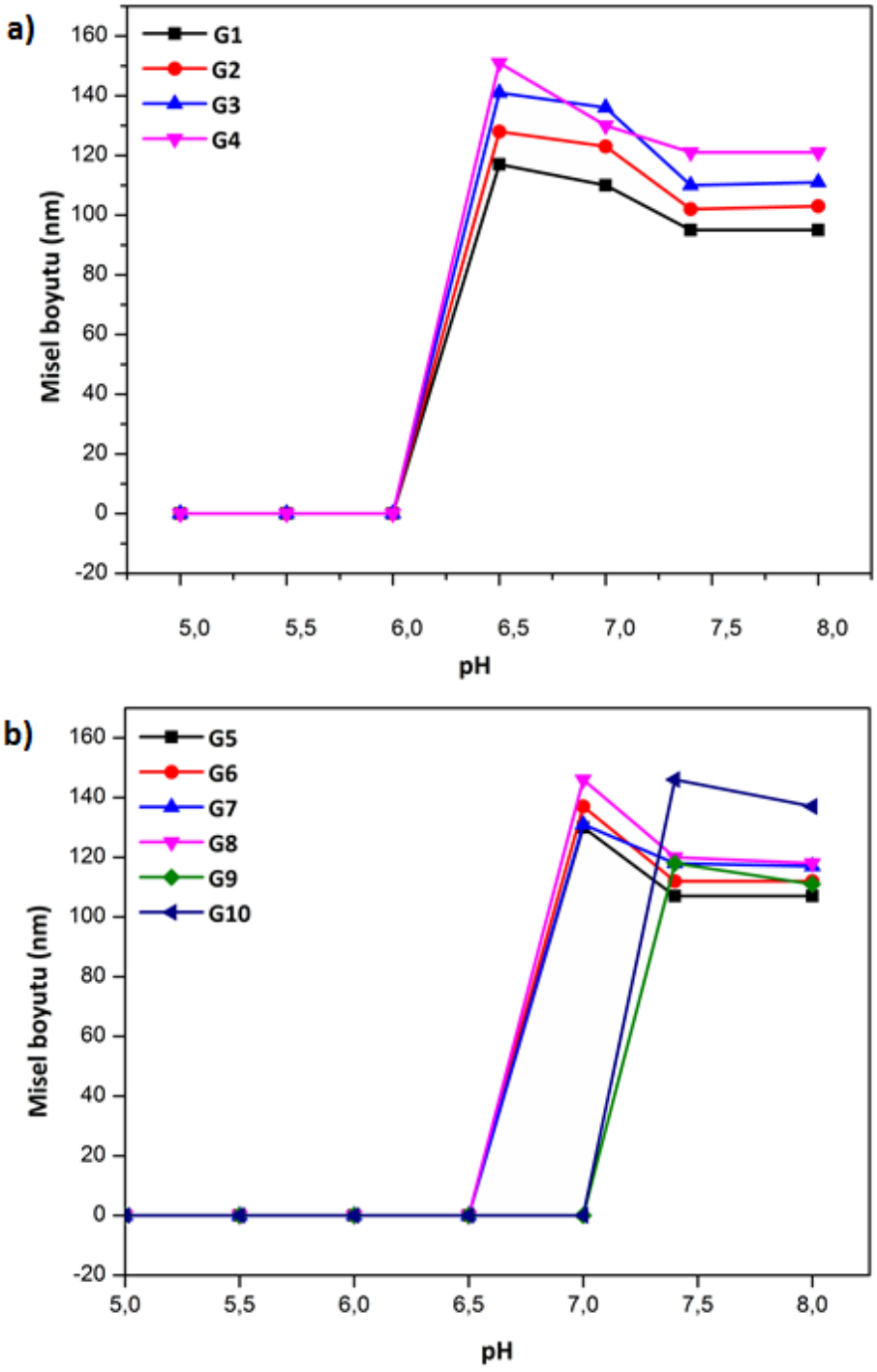
Şekil 4. 19 Triblok kopolimerlerden hazırlanan misellerin farklı pH değerlerindeki boyut dağılımları

Şekil 4.19'da amfifilik triblok kopolimerlerden elde edilen misellerin farklı pH değerlerinde sahip oldukları tanecik boyut dağılımları verildi. Verilen şekiller incelendiğinde, genel olarak molekül ağırlığı arttıkça misel boyutunun da arttığı görüldü. Yüksek PCL oranına sahip olan B2, B4, B6, B8 ve B10 kopolimerlerinin pH 7,4'de misel boyutu en büyükken düşük PCL bloğuna sahip olan diğer kopolimerlerden oluşan misellerin tanecik boyutlarının daha düşük olduğu belirlendi. B2, B4, B6, B8 ve B10 kopolimerlerinden elde edilen misellerin boyutu pH 7,4'de sırasıyla 62 nm, 82 nm, 84 nm, 90 nm ve 92 nm iken; B1, B3, B5, B7 ve B9 kopolimerlerinden elde edilen misellerin boyutunun sırasıyla 60 nm, 75 nm, 77 nm, 72 nm, 80 nm olduğu görüldü. Bu sonuçlar kopolimerlerin hidrofobik grup uzunluğunun misel boyutu üzerinde önemli katkısının olduğunu gösterdi. Misel çekirdeğini oluşturan hidrofobik PCL kısmı büyüdükçe misel çekirdeği daha büyük olur bu da misellerin tanecik boyutunun daha büyük olmasına neden olur. Ayrıca molekül ağırlığı daha yüksek olan mPEG grubuna sahip olan kopolimerlerin de misel boyutunun daha büyük olduğu saptandı. Örneğin, aynı PCL blok uzunluğuna ve PBAE1 grubuna sahip olan B1 ve B3 kopolimerlerinden elde edilen misellerin boyutları kıyaslandığında (B1-60 nm, B3-75 nm) mPEG bloğu uzun olan B3 kopolimer miselinin daha büyük boyuta sahip olduğu görüldü. Hidrofilik karakteri daha fazla olan PBAE3 ve PBAE4 gruplarını içeren B7, B8, B9 ve B10 kopolimerlerinden hazırlanan misellerin boyutunun genel olarak daha büyük olduğunu söylemek mümkündür.

Aynı PBAE bloğuna sahip olan G1, G2, G3 ve G4 graft kopolimer misellerinin boyutları kıyaslandığında en büyük misel boyutu 121 nm ile G4 miselinde en küçük misel boyutu ise 95 nm ile G1 miselinde ölçüldü. Bunun sebebi G1 kopolimerinin en kısa G4 kopolimerinin ise en uzun PCL ve mPEG bloğuna sahip olmasıdır. mPEG 2000 bloğuna sahip G2 ve mPEG 5000 bloğuna sahip G3 misellerinin boyutu ise sırasıyla 102 nm ve 110 nm'dir. Farklı PBAE bloklarına sahip G5-G6, G7-G8 ve G9-G10 miselleri kıyaslandığında en hidrofilik olan PBAE4 bloğunu içeren G9 (118 nm) ve G10 (146 nm) misellerinin en büyük misel boyutuna sahip olduğu görüldü. pH duyarlı grup olarak

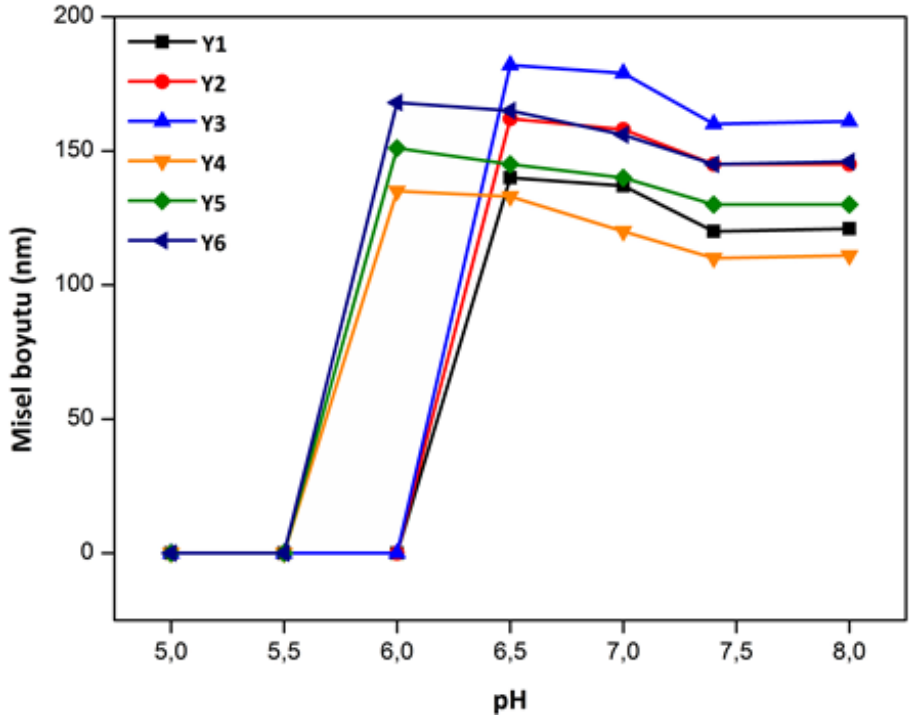
PBAE3 bloğunu içeren G7 ve G8 misellerinin boyutunun sırasıyla 118 nm ve 120 nm; PBAE2 bloğunu içeren G5 ve G6 misellerinin boyutunun ise sırasıyla 107 nm ve 112 nm olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlardan, PBAE bloklarının molekül ağırlığı arttıkça graft kopolimerlerin daha yüksek pH değerlerinde iyonlaştıkları görüldü. Çünkü bu polimerler büyük PBAE blokları ve yüksek molekül ağırlığından dolayı daha karmaşık yapıya sahiptir ve bundan dolayı düşük pH'ta iyonize olması zordur. Ayrıca, daha büyük PCL bloğunun kazandırdığı yüksek hidrofobiklik polimerin çözünürlüğünü azaltır ve iyonizasyon derecesini etkiler, polimerin iyonizasyon derecesi de direk olarak misel boyutunu etkiler.

Yıldız kopolimer nanotanecikler diğer yapılardan farklı olarak elde edildi. Bu yapıların önce hidrofobik çekirdek bloğu sentezlendi ve sonra bu çekirdeğin dış yüzeyi hidrofobik etkileşimler vasıtasıyla PEO ile kaplandı. Düşük pH değerlerinde yapıdaki PBAE'nin tersiyer amin gruplarının iyonlaşması ile hidrofilikliğin artması dış yüzeyde hidrofobik etkileşimlerle tutulan PEO birimlerinin çok az miktarda da olsa yüzeyden ayrılmasına neden olur. Bundan dolayı ortamın pH değerinin düşmesi nanotaneciklerin boyutunda iki farklı etki yaratır; ilki PBAE'nin iyonlaşması ile misel boyutunun artması diğeri ise PEO birimlerinin yüzyden ayrılması ile misel boyutunun azalmasıdır. Daha hidrofobik PBAE grubuna sahip olan Y1, Y2, Y3 kopolimerlerinin pH değeri 6,0'nın üzerinde olduğunda tanecik boyutunun arttığı, hidrofilik PBAE bloğuna sahip Y4, Y5, Y6 yıldız kopolimerlerinin ise pH 5,5'in üzerinde olduğunda tanecik boyutunda artışın olduğu görüldü (Şekil 4.21). [ε-CL]:[OH] oranı yüksek olan Y3 (160 nm) ve Y6 (145 nm) kopolimer nanotaneciklerinin en yüksek tanecik boyutuna sahip oldukları bulundu.



Şekil 4. 20 Graft kopolimerlerden hazırlanan misellerin farklı pH değerlerindeki boyut dağılımları

Tüm şekiller incelendiğinde blok kopolimerlerin misel boyutunun 60 nm ile 92 nm arasında, graft kopolimerlerin misel boyutunun 95 nm ile 121 nm arasında ve yıldız kopolimerlerin tanecik boyutunun 110 nm ile 160 nm arasında olduğu saptandı. Dallanmış yapıdaki graft kopolimerlerin oluşturduğu misellerin ve 4 kollu yıldız kopolimerlerin oluşturduğu nanotaneciklerin boyutlarının doğrusal yapıdaki triblok kopolimerlere göre daha yüksek olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlardan misel boyutu üzerinde kopolimerin düz zincirli ve dallanmış yapısının etkili olduğu görüldü. Farklı yapılardaki kopolimerlerden elde edilen misellerin farklı pH'lardaki tanecik boyutu dağılımları incelendiğinde pH duyarlı misel oluşumu doğrulandı. Tersiyer amin gruplarının düşük pH'da yani asidik tümör pH'ında tamamen iyonize olarak ayrışabilmesi bu bileşiklerin antikanser ilaçlarının taşınmasında kullanılabileceğini gösterir.



Şekil 4. 21 Yıldız kopolimerlerden elde edilen nanotaneciklerin farklı pH değerlerindeki boyut dağılımları

Polimerik misellerin ve nanotaneciklerin polidispersite değerlerinin 0.025 ile 0.089 arasında değiştiği saptandı. Polidispersite değerinin bir birimi yoktur ve sıfıra yakın değerler (0.000-0.020) monodispers veya monodisperse yakın örnekler için, küçük değerler (0.020-0.080) dar dağılımlar için ve daha büyük değerler geniş dağılımlar için tanımlanır. Çizelge 4.6'da verilen polidispersite değerleri misellerin bu pH değerlerinde genellikle dar dağılımlı olduklarını gösterdi.

Çizelge 4.6 etoposid yüklü polimerik misel ve nanotaneciklerin boyutlarını göstermektedir. Verilen tanecik boyutu değerleri incelendiğinde, misellerin ve nanotaneciklerin boyutlarının etoposid yüklemesinden sonra kopolimer yapısından bağımsız olarak yaklaşık iki katına çıktığı görüldü. Örneğin B1 kopolimerinin misel boyutunun etoposid yüklendikten sonra 60 nm'den 130 nm'ye artttığı görüldü. Bu misel genişlemesi, etoposidin misellerin hidrofobik çekirdeğine yerleştiğini yani ilaç molekülünün misel yapısına başarı ile yüklendiğini gösterir. Etoposid yüklendikten sonra hidrofobik bloğu uzun olan misel ve nanotaneciklerin ortalama boyut artışının daha fazla olduğu görüldü. Bunun sebebi, hidrofobik etkileşimlerle çekirdekte daha fazla etoposid molekülünün tutulması olabilir. Ayrıca, misel ve nanotaneciklere etoposid yüklendikten sonra polididpersite indeksi değerlerinin önemli ölçüde değişmediği ve dar dağılımda oldukları görüldü.

4.3.4 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Yük Tayini

Zeta potansiyel değeri ortamın pH değişiminden önemli derecede etkilendiği için, polimerik misel ve nanotanecik çözeltilerinin farklı pH değerlerinde zeta potansiyelleri ölçüldü ve sonuçlar Şekil 4.22'de verildi. Elde edilen zeta potansiyeli değerlerinden misellerin yüzey yükünün pH ile ilgili olduğu görüldü. Şekilden de görüldüğü gibi ortamdaki ilk pH azalması (pH 8,0'den pH 7,0'ye) ile zeta potansiyelinde önemli bir değişim olmadı. pH 6,8'e düştüğünde ise zeta potansiyellerinin hızlı bir şekilde arttığı ve bir platoya ulaşarak sabit kaldığı görüldü. Ortamın pH değeri 7,4 ve üzerinde olduğunda miseller PBAE grubundaki amin grubunun tamamen deiyonize olmasına bağlı olarak

neredeyse nötrdür. pH değeri azalmaya başladığında PBAE zincirindeki tersiyer amin grupları iyonize olmaya başlar ve kopolimer pozitif yüklü hale gelir. Böylelikle pH düştükçe zeta potansiyeli değerinde artış meydana gelir.

Kopolimerlerin yapıları incelendiğinde misellerin yüzey yükü üzerinde sadece PBAE grubunun etkili olacağı öngörüldü ve bundan dolayı aynı PBAE grubuna sahip olan kopolimer misellerin aynı zeta potansiyeli değerine sahip olmaları beklendi. Elde edilen zeta potansiyeli sonuçları da bunu doğruladı. Blok kopolimerlerin zeta potansiyeli değerleri incelendiğinde, neredeyse aynı PBAE blok uzunluğuna sahip olan bu misellerin yüzey yüklerinin yaklaşık olarak aynı oldukları görüldü. Yıldız kopolimerlerin zeta potansiyeli değerleri de benzer olarak birbirine yakın sonuçlar verdi. Graft kopolimerler söz konusu olduğunda ise, daha büyük PBAE grubuna sahip olan G1 ve G5 kopolimerlerinin birbirinden farklı zeta potansiyeli değerleri gösterdikleri görüldü.

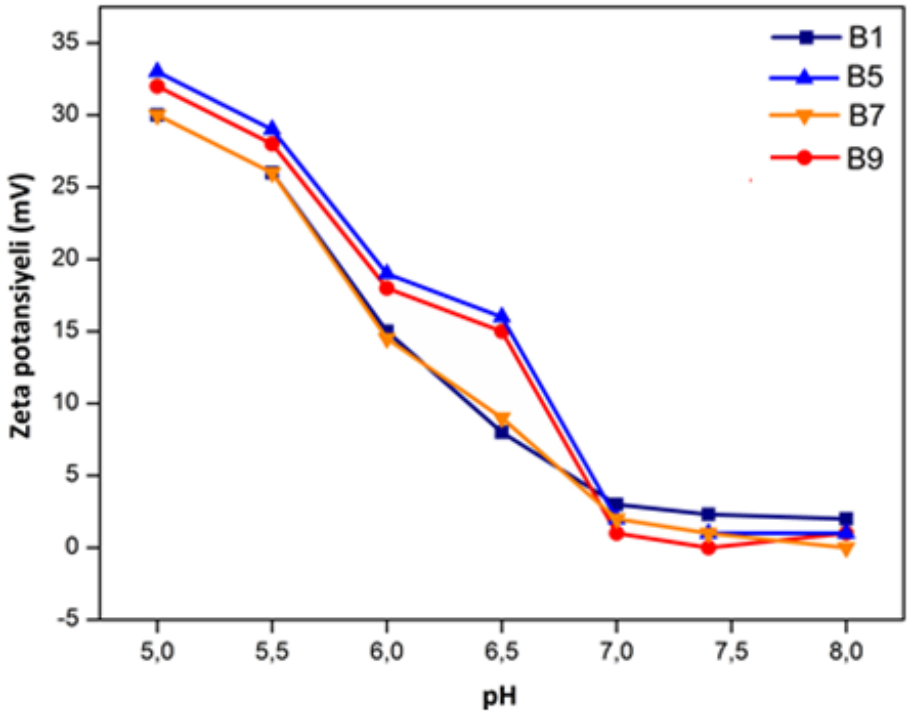
Elde edilen tüm zeta potansiyeli değerlerinden, blok ve yıldız kopolimerlerdeki pozitif yüklenmenin daha fazla olduğu görüldü. Bunun sebebi, bu kopolimerlerin PBAE bloğunun sentezinde iki –NH grubuna sahip diamin bileşiklerinin kullanılmasıdır. Ortamın pH değeri düştüğünde bu iki azot atomu da protonlanacağı için misellerin toplam yükü artar ve daha büyük değerler elde edilir. Tek amin grubuna sahip PBAE bloğu içeren graft kopolimerlerin PBAE bloğu daha uzun da olsa zeta potansiyeli değerlerinin daha düşük olduğu saptandı.

Sentezlenen tüm kopolimerlerin pH 5,5 ve pH 7,0 aralığında yani hücre dışı ortamda zeta potansiyellerinin pozitif değerde olması bu kopolimerlerin sahip oldukları pozitif yükten dolayı kanserli hücreler tarafından hücresel alımının artmasını sağlar. Yüksek pH değerinde miseller tamamen iyonlaşmamıştır, pH daha fazla düştükçe miseller tamamen iyonlaşır ve zeta potansiyel değerleri maksimuma ulaşır. Misellerin pH 5,0 değerindeki zeta potansiyel değerlerinin yüksek oluşu ve hidrofilik/hidrofobik oranın da en yüksek değerde olması bu pH'taki en yüksek misel boyutunu da açıklar.

Çizelge 4. 6 Etoposid yüklenmiş ve yüklenmemiş polimerik misellerin ve nanotaneciklerin pH 7,4'deki tanecik büyüklüğü ve dağılımı

Kopolimer	Boyut (nm)	PDI	Etoposid Yüklü kopolimer	Boyut (nm)	PDI
B1	60	0,025	**B1**	130	0,016
B2	62	0,043	**B2**	140	0,029
B3	75	0,017	**B3**	132	0,021
B4	82	0,022	**B4**	159	0,039
B5	77	0,027	**B5**	134	0,031
B6	84	0,031	**B6**	160	0,042
B7	72	0,029	**B7**	100	0,056
B8	90	0,074	**B8**	172	0,047
B9	80	0,047	**B9**	143	0,076
B10	92	0,031	**B10**	187	0,072
G1	95	0,056	**G1**	176	0,062
G2	102	0,023	**G2**	201	0,032
G3	110	0,036	**G3**	198	0,061
G4	121	0,078	**G4**	250	0,053
G5	107	0,025	**G5**	204	0,042
G6	112	0,036	**G6**	200	0,035
G7	118	0,028	**G7**	217	0,024
G8	120	0,027	**G8**	248	0,051
G9	118	0,034	**G9**	234	0,047
G10	146	0,030	**G10**	286	0,063
Y1	120	0,089	**Y1**	215	0,029
Y2	145	0,020	**Y2**	268	0,041
Y3	160	0,040	**Y3**	305	0,064
Y4	110	0,058	**Y4**	206	0,025
Y5	130	0,067	**Y5**	257	0,038
Y6	145	0,081	**Y6**	273	0,059

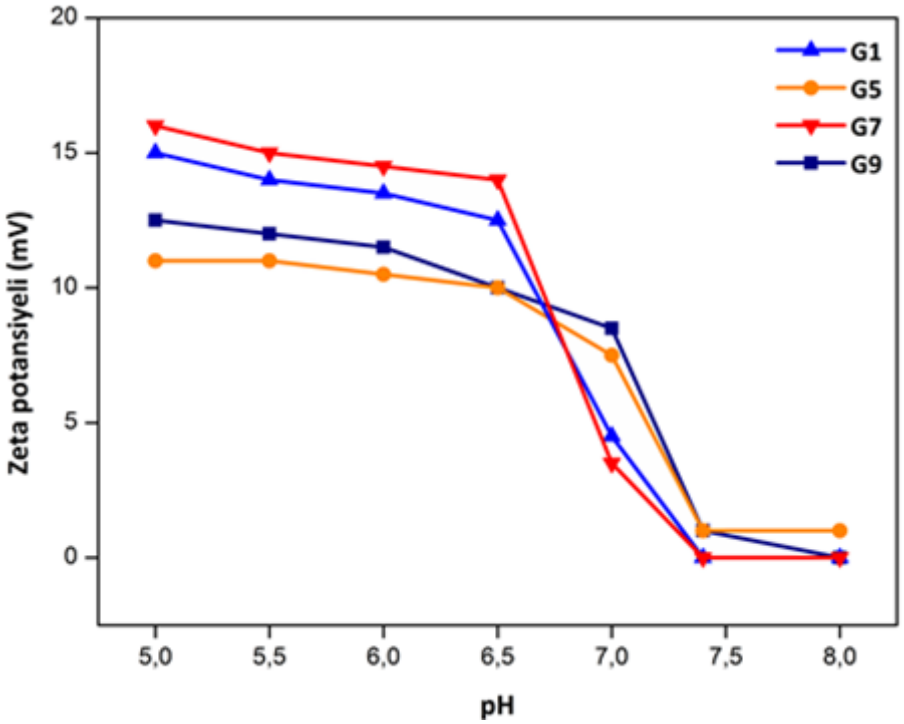
Çok asidik ortamda amin gruplarının ortamdan proton alarak pozitif yüklü hale geldiği, bunun sonucunda, polimerin de pozitif yüklü hale geldiği ve pozitif yüklü grupların birbirini itmesi sonucunda polimerik misellerinin genişleyerek daha büyük boyutlara sahip olduğu anlaşılmaktadır. Ancak kopolimerlerin yapısında bulunan mPEG bloğu pozitif yüklerin birbirini itme etkisini azaltır ve misel boyutunun sınırsız büyümesine engel olur. Ortamdaki H^+ azaldıkça yani pH değeri arttıkça amin gruplarının pozitif yükü azaldığı için itme kuvveti azalmakta, buna paralel olarak zeta potansiyeli de tanecik büyüklüğü de azalmaktadır.



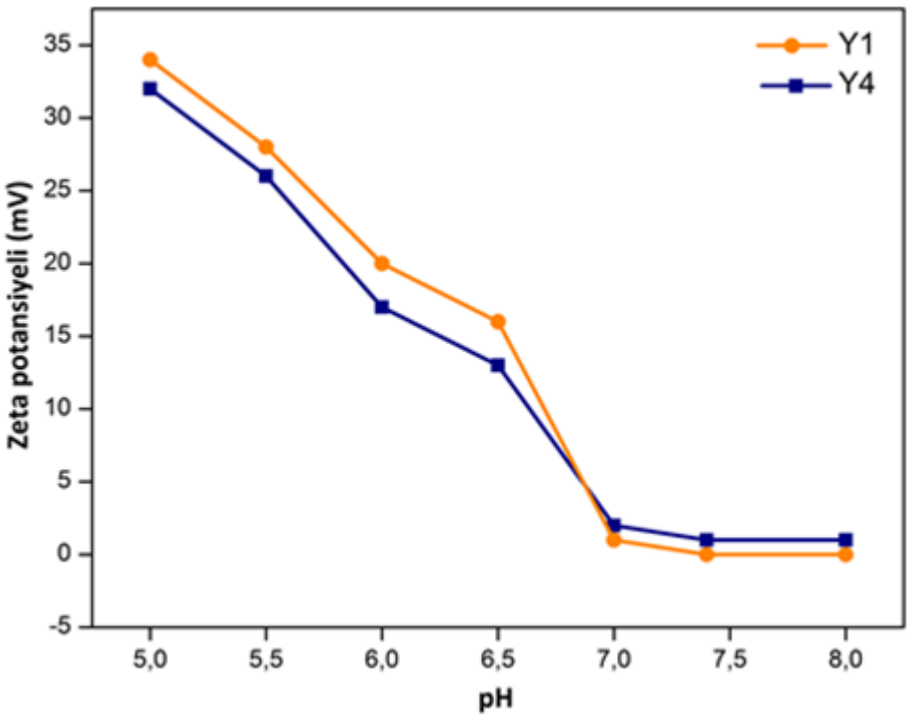
Şekil 4. 22 Amfifilik triblok kopolimer misellerin farklı pH'lardaki zeta potansiyeli değişimleri

pH 7,0 ve yukarısındaki değerlerde neredeyse yüksüz olan triblok kopolimerlerin zayıf asidik pH'da (5,0) zeta potansiyel değerlerinin B1 ve B7 kopolimeri için 30 mV, B5 için 33 mV, B9 için 32 mV olduğu görüldü (Şekil 4.22). Farklı PBAE gruplarına sahip graft kopolimerlerden daha kısa PBAE bloğuna sahip G5 ve G9 kopolimerlerinin zayıf asidik pH'daki (5,0) zeta potansiyeli değerlerinin 11 mV ve 13 mV olduğu; daha uzun PBAE bloğu içeren G1 ve G7 kopolimerlerinin ise 15 mV ve 16 mV olduğu saptandı (Şekil

4.23). Yıldız kopolimerlerin zeta potansiyeli değerleri incelendiğinde ise, hidrofobik karakteri yüksek olan Y1 kopolimerinin zeta potansiyel değeri 34 mV iken hidrofilik PBAE grubuna sahip olan Y4 kopolimerinin zeta potansiyel değerinin 32 mV olduğu görüldü. Bu farklılığın sebebi Y1 kopolimerinin daha büyük PBAE blok uzunluğuna sahip olmasıdır (Şekil 4.24). Polimerik miseller ve nanotaneciklere ait zeta potansiyel değerleri incelendiğinde açıkça görülmektedir ki kopolimer yapısındaki PBAE miktarı arttıkça kolloidal sistemin sahip olduğu yük mutlak değer olarak artmaktadır.



Şekil 4. 23 Graft kopolimer misellerin farklı pH'lardaki zeta potansiyeli değişimleri



Şekil 4. 24 Yıldız kopolimer nanotaneciklerinin farklı pH'lardaki zeta potansiyeli değişimleri

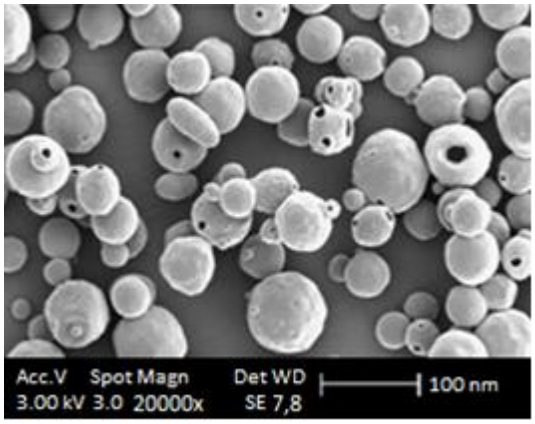
4.3.5 Polimerik Misellerin ve Nanotaneciklerin Morfolojilerinin Tayini

Bu çalışma kapsamında sentezlenen kopolimerlerden elde edilen polimerik misel ve nanotaneciklerin yüzey özelliklerinin incelenmesinde SEM ile görüntüleme tekniği kullanıldı. Elde edilen SEM görüntüleri, yapılarındaki hidrofilik ve hidrofobik gruplar nedeniyle amfifilik yapıda olan blok ve graft kopolimerlerin sulu ortamda çekirdek-kabuk yapısına sahip küresel miseller vermek üzere kendiliğinden düzenlendiklerini yıldız kopolimerlerin ise küresel yapıda nanotanecikler oluşturduğunu gösterdi.

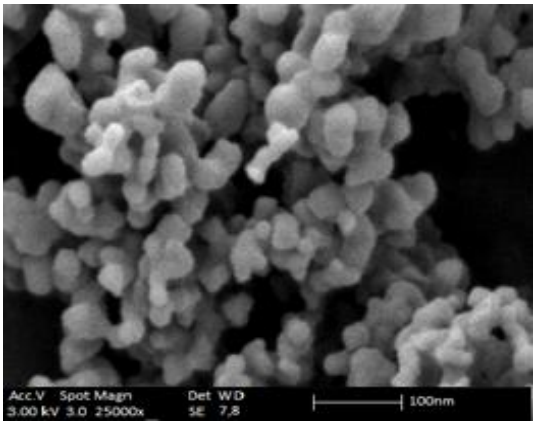
Elde edilen SEM görüntülerinden, DLS ölçümlerinin SEM ölçümlerine göre daha büyük misel çapı gösterdiği görüldü. SEM ölçümünden önce uygulanan yüksek vakum misel yapısındaki suyun buharlaşarak mPEG kabuğunun büzülmesine ve misellerin dehidrate olmasına neden olur ve bundan dolayı misel çapında azalma görülür [164]. Ayrıca hazırlanan polimerik misellerin boyut dağılımı ölçümü için kullanılan Zeta Sizer cihazı ile daha büyük boyuta sahip miseller elde edildiğinden dolayı SEM cihazından elde edilen

değerlerin daha gerçekçi olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca Zeta Sizer ölçümlerinde sulu fazda bulunan taneciğin etrafında suyun içinde bulunan serbest iyonların toplanmasıyla bir difüzyon tabakası oluşur. Zeta sizer cihazındaki ölçümler sırasında oluşan bu difüzyon tabakası da hesaba katılarak tanecik boyutu hesaplanmaktadır, dolayısıyla hesaplanan tanecik boyutu gerçekte olandan biraz daha büyüktür.

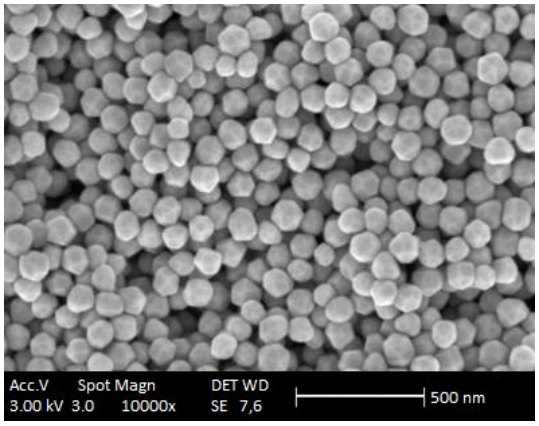
Şekil 4.25'de blok kopolimerler kullanılarak diyaliz yöntemi ile hazırlanan polimerik misellerin SEM görüntüleri verildi. Bu görüntülerden triblok kopolimerlerin küresel ve boyutları 40-200 nm arasında değişen genellikle polidispers miseller oluşturdukları görüldü. Hidrofobik blok uzunluğu ile hidrofilik blok uzunluğu birbirine yakın olan B4, B6, B8 ve B10 kopolimerlerinin düzgün küresel miseller oluşturdukları görüldü. Ancak kabuğu oluşturan hidrofilik bloğu daha kısa olan B2 blok kopolimerlerinden elde edilen misellerin kabuk kısmı kısa mPEG zincirlerinden dolayı misel kararlılığını tam olarak sağlayamaz. Bu kabuğun zayıf stabilizasyon etkisinden dolayı su misel çözeltisini terk ederken polimerik miseller yığın halinde yan yana gelir ve bu yapılar birleşerek daha büyük agregatlar oluşturur. Ayrıca B4, B8 ve B10 blok kopolimerlerinden hazırlanan çözeltilerde hem büyük hem de küçük boyutta misellerin var olduğu ve bundan dolayı misel taneciklerinin boyut dağılımlarının homojen olmadığı görüldü. B1 kopolimerinden hazırlanan polimerik misellerin boyutu B10 ile kıyaslandığında kabuğu oluşturan bloğu daha uzun olan B10'un ortalama misel boyutunun daha büyük olduğu ancak iki oluşumda da misel dağılımlarının homojen olmadığı gözlendi. Kısa hidrofobik bloğa ve uzun mPEG zincirine sahip olan B3 kopolimer misellerinin düzgün küresel formda ve homojen dağılımda oldukları görüldü. B8 kopolimerinin oluşturduğu düzgün ve nanometre boyutundaki misellerin yanında, sahip olduğu uzun hidrofobik bloğun sudaki zayıf çözünürlüğünden dolayı çok büyük agregatlar da oluşturduğu belirlendi.



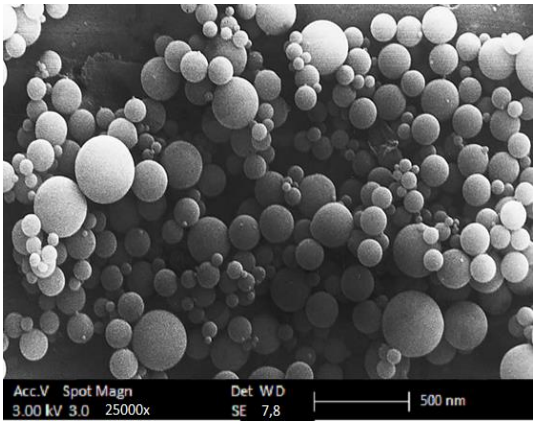
a)



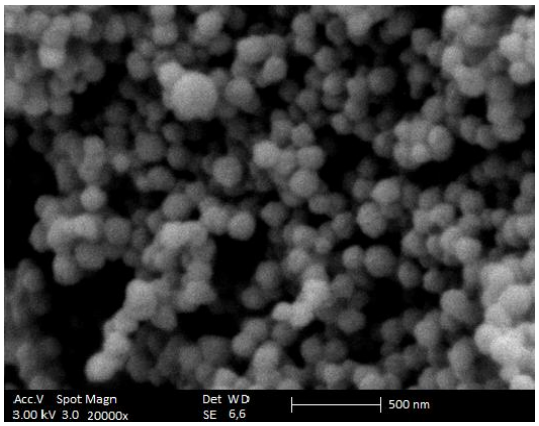
b)



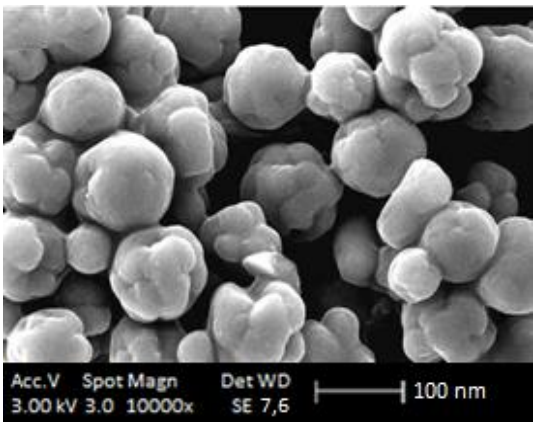
c)



d)

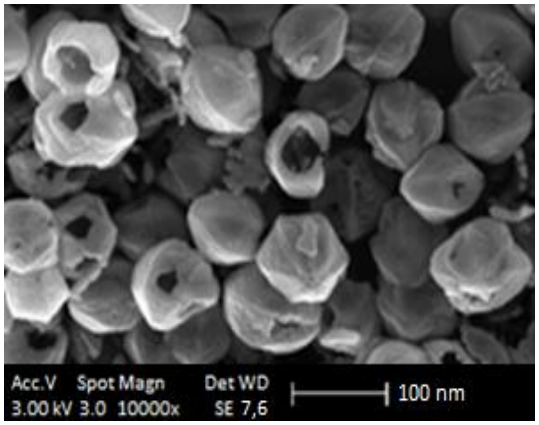


e)

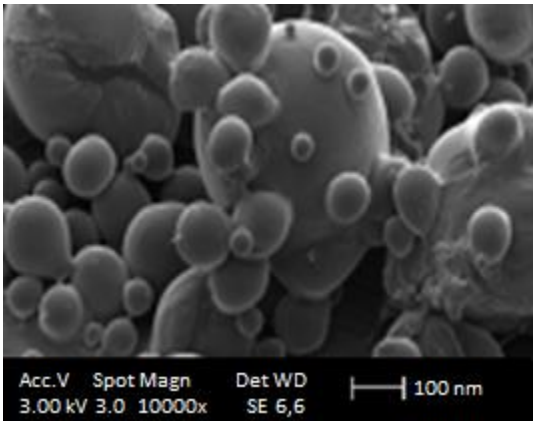


f)

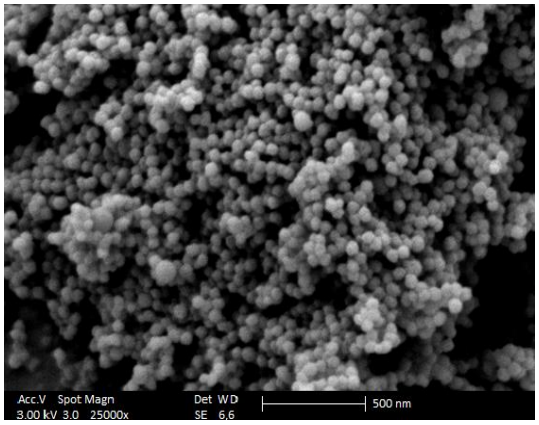
Şekil 4. 25 a)B1, b)B2, c)B3, d)B4, e)B5, f)B6, g)B7, h)B8, i)B9 ve j)B10 triblok kopolimerlerinden elde edilen polimerik misellerin SEM görüntüleri



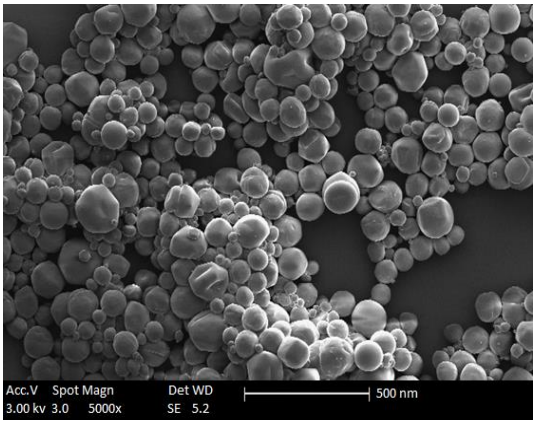
g)



h)



i)

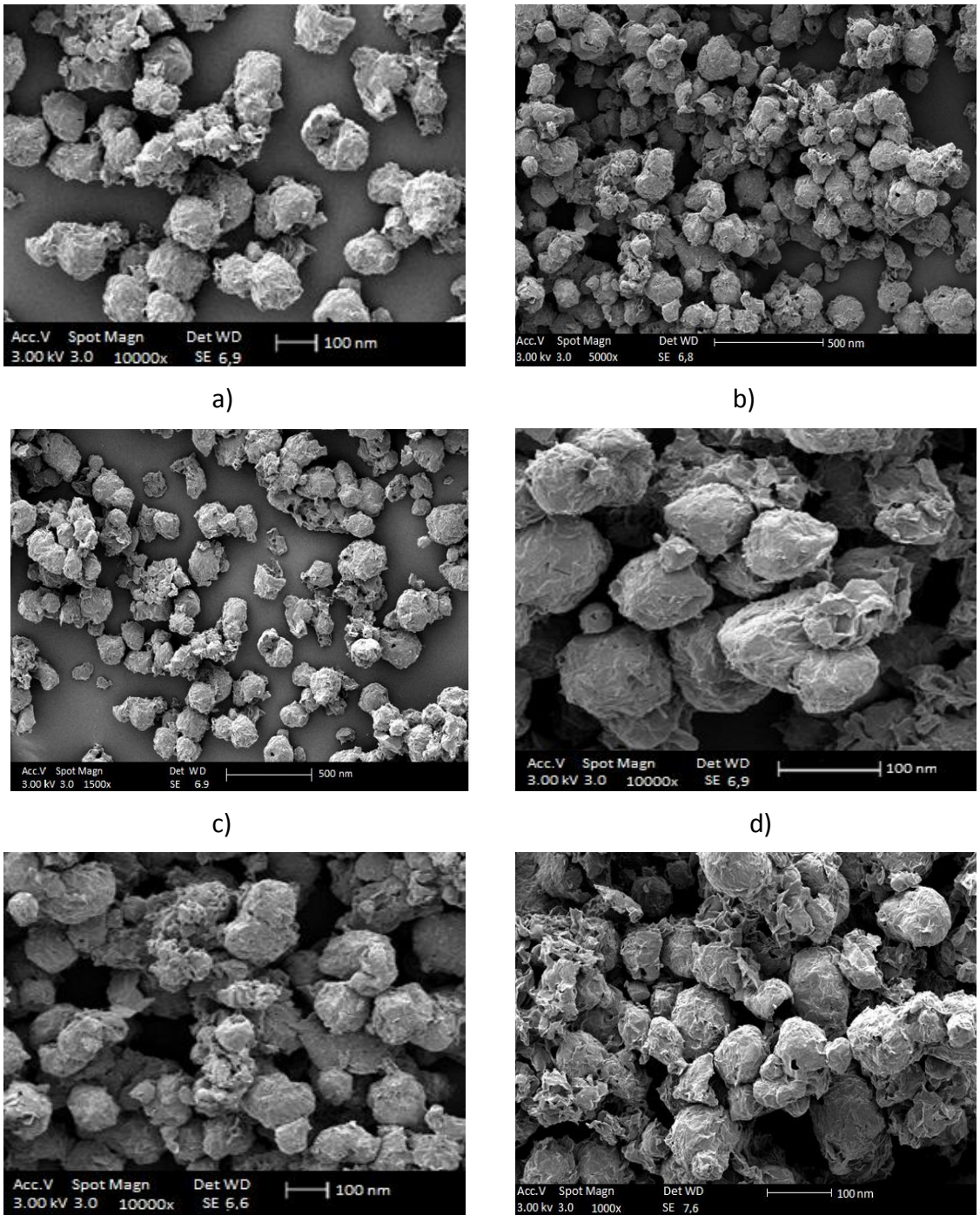


j)

Şekil 4. 25 a)B1, b)B2, c)B3, d)B4, e)B5, f)B6, g)B7, h)B8, i)B9 ve j)B10 triblok kopolimerlerinden elde edilen polimerik misellerin SEM görüntüleri (devam)

Şekil 4.26'da graft kopolimerlerden hazırlanan polimerik misellere ait SEM görüntülerinden morfolojinin epeyce değiştiği görülmektedir. Graft kopolimerler kendi içlerinde kıyaslandıklarında genellikle tam olarak küresel özellik göstermeyen yapıların gözlendiği söylenebilir. Graft kopolimerlerden elde edilen, ortalama 120 nm büyüklüğündeki polimerik misellerin düzgün küresel şekilleri bozulsa da tanecikler hala belirgin olarak ayırt edilebilmektedir. Ayrıca SEM görüntülerinden bozuk misel yapılarının bulunduğu ve aglomere olan misel taneciklerinin de oldukça yaygın olduğu saptandı. Genel olarak sentezlenen 10 farklı yapıya ait tüm görüntüler incelendiğinde amfifilik graft kopolimerlerin toplam molekül ağırlığının, çekirdeği oluşturan bloğun ve

pH duyarlı blokların molekül ağırlığının misellerin yüzey özelliklerini ve şekillerini belirgin bir şekilde değiştirmediği gözlendi.

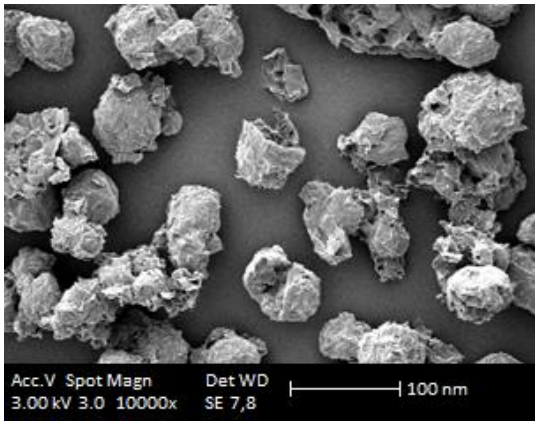


a) b)

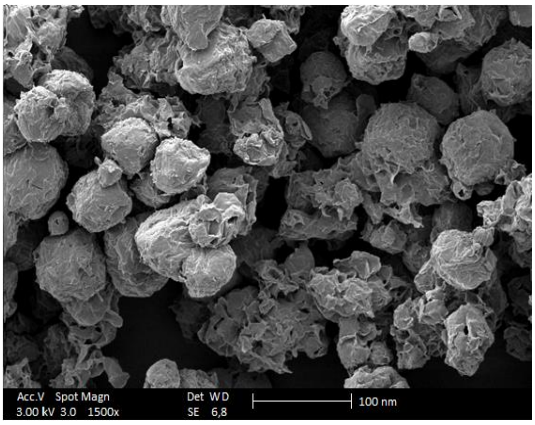
c) d)

e) f)

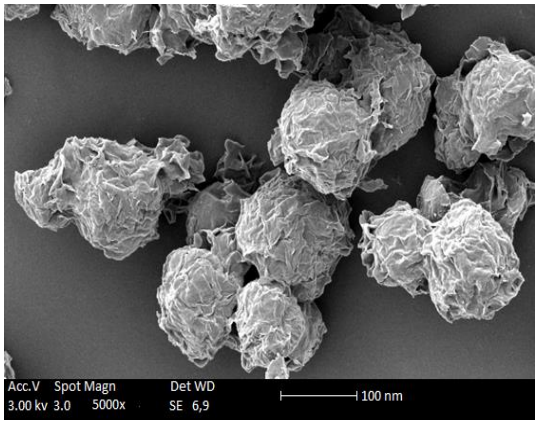
Şekil 4. 26 a)G1, b)G2, c)G3, d)G4, e)G5, f)G6, g)G7, h)G8, i)G9 ve j)G10 graft kopolimerlerinden elde edilen polimerik misellerin SEM görüntüleri



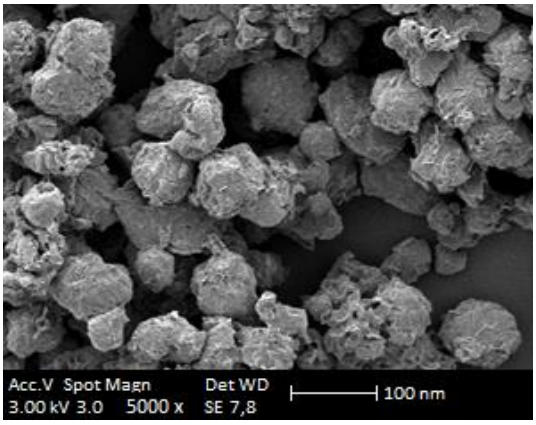
g)



h)



i)



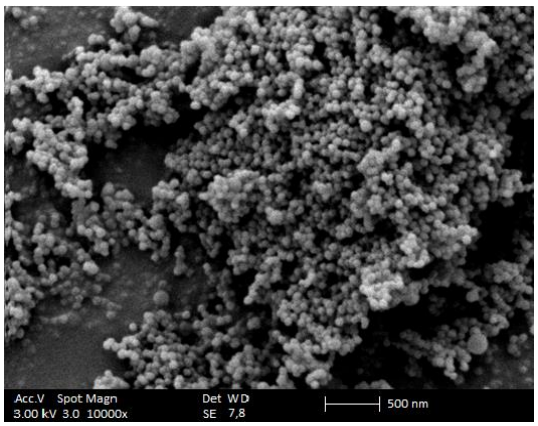
j)

Şekil 4. 26 a)G1, b)G2, c)G3, d)G4, e)G5, f)G6, g)G7, h)G8, i)G9 ve j)G10 graft kopolimerlerinden elde edilen polimerik misellerin SEM görüntüleri (devam)

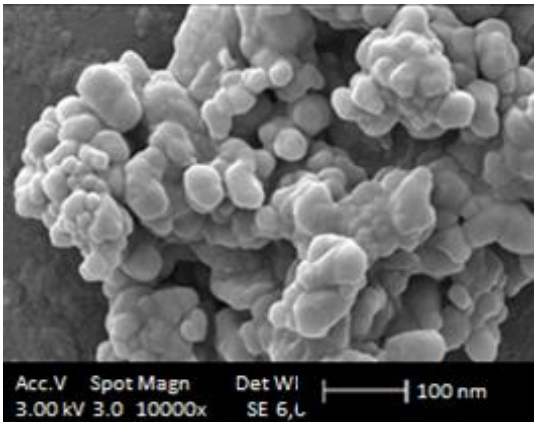
Molekül ağırlığı daha büyük olan G2, G4, G5, G6, G8 ve G10 graft kopolimerlerinin SEM görüntülerinden birbiriyle birleşmiş daha büyük agregatların oluştuğu gözlendi. G2 kopolimerinden hazırlanan misellerin daha az aglomere oldukları ve daha homojen misel yapıları oluşturdukları belirlendi. G1, G3, G7 ve G9 kopolimerlerinin küresele daha yakın ve kısmen birbirinden ayrı homojen misel yapıları oluşturdukları görüldü. Şekil 4.26.d'de verilen G4 kopolimerinin SEM görüntüsünde, nispeten düzgün fakat polidispers büyük aglomere yapılar yüzeyin her yerinde görülmektedir. G4 ile kıyaslandığında daha kısa PCL zincirine sahip G3 kopolimerinin ise daha küçük boyutta bozuk küresel yapıda tanecikler oluşturduğu görüldü. Küresele en yakın ve en düzgün misel tanecikleri G1 ve G9 kopolimerleri ile elde edildi.

Yıldız kopolimerlerin yüzeyinin PEO ile kaplanması ile elde edilen nanotaneciklerin morfolojilerinin bozulduğu ve yüzey özelliklerinin bölgesel farklılıklar gösterdiği saptandı. Şekil 4.27'de verilen SEM görüntülerinin bazı bölgelerinde küresel misel tanecikleri belirgin olarak görülse de yapıya misellerin birleşmesine neden olan aglomere olmuş taneciklerin hakim olduğu gözlendi. Oluşan bu büyük aglomere yapılarda PEO'in rolü olduğu görülmektedir. Hidrofobik çekirdek taneciklerinin etrafına hidrofobik etkileşimlerle PPO polimerinin takılması ile yüzeyde kalan hidrofilik PEO zincirlerinin birkaç taneciğin etrafını aynı anda sararak küresel yapısı bozulmuş büyük yapılar oluşmasına neden olduğu görüldü.

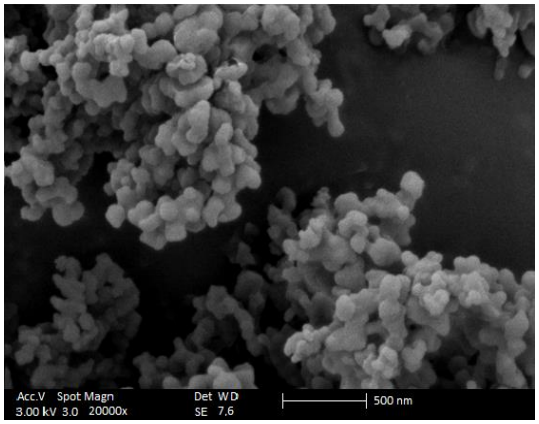
Yıldız kopolimer taneciklerin SEM görüntülerinde blok ve graft kopolimerlerde gözlenen düzgün şekilli taneciklerin yanı sıra küresel ya da küresele yakın şekilsiz taneciklerin mevcut olduğu görüldü. Tanecik yüzeyine adsorplanmadan ortamda kalan serbest Pluronik'in SEM ölçümü sırasında kopolimer yapısındaki suyun uzaklaştırılması ile kopolimer taneciklerinin arasında birikerek, onların düzgün küresel yapısını bozduğu saptandı. Şekil 4.27'deki SEM görüntülerinde hidrofobik bloğu uzun olan Y2, Y3, Y5 ve Y6 kopolimerlerinden hazırlanan şekli bozulmuş ve üst üste kümelenmiş küresel taneciklerin yanı sıra boyutu küçük küresel tanecik morfolojileri de gözlenmektedir. Hidrofobik blok uzunluğu düşürüldüğünde bu aglomere yapıların yerini Şekil 4.27.a ve Şekil 4.27.d'de görülen küresel ve daha küçük boyuttaki taneciklere bıraktığı görüldü. Daha sıkı yapıda ve birbiriyle birleşmiş Y1 ve Y4 kopolimer taneciklerinin diğerlerine göre daha homojen oldukları görüldü.



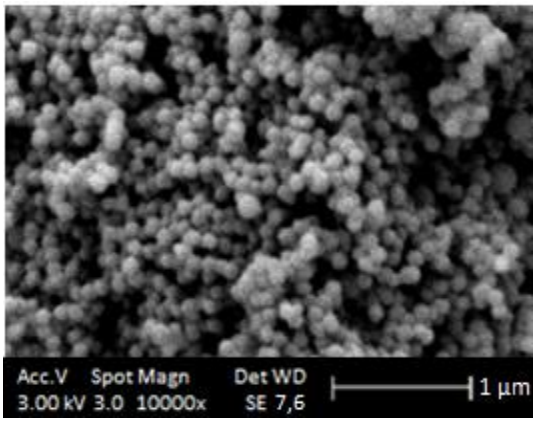
a)



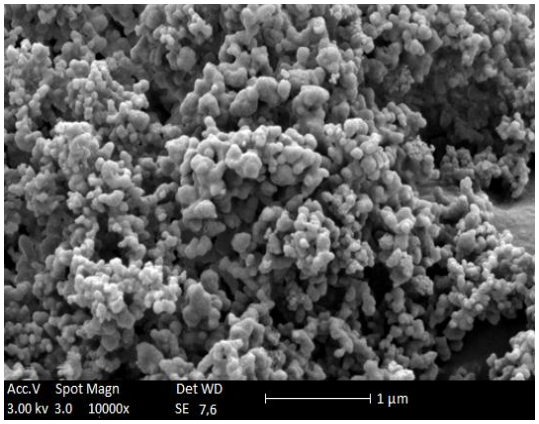
b)



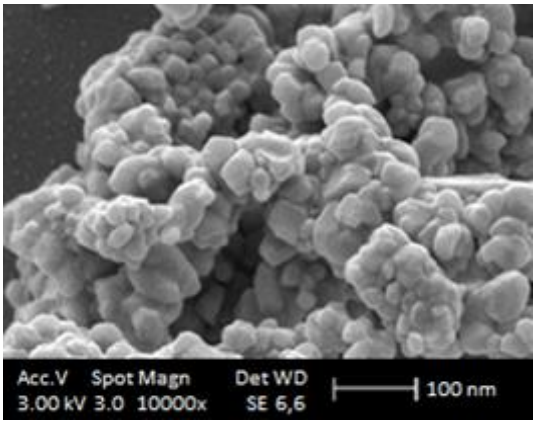
c)



d)



e)



f)

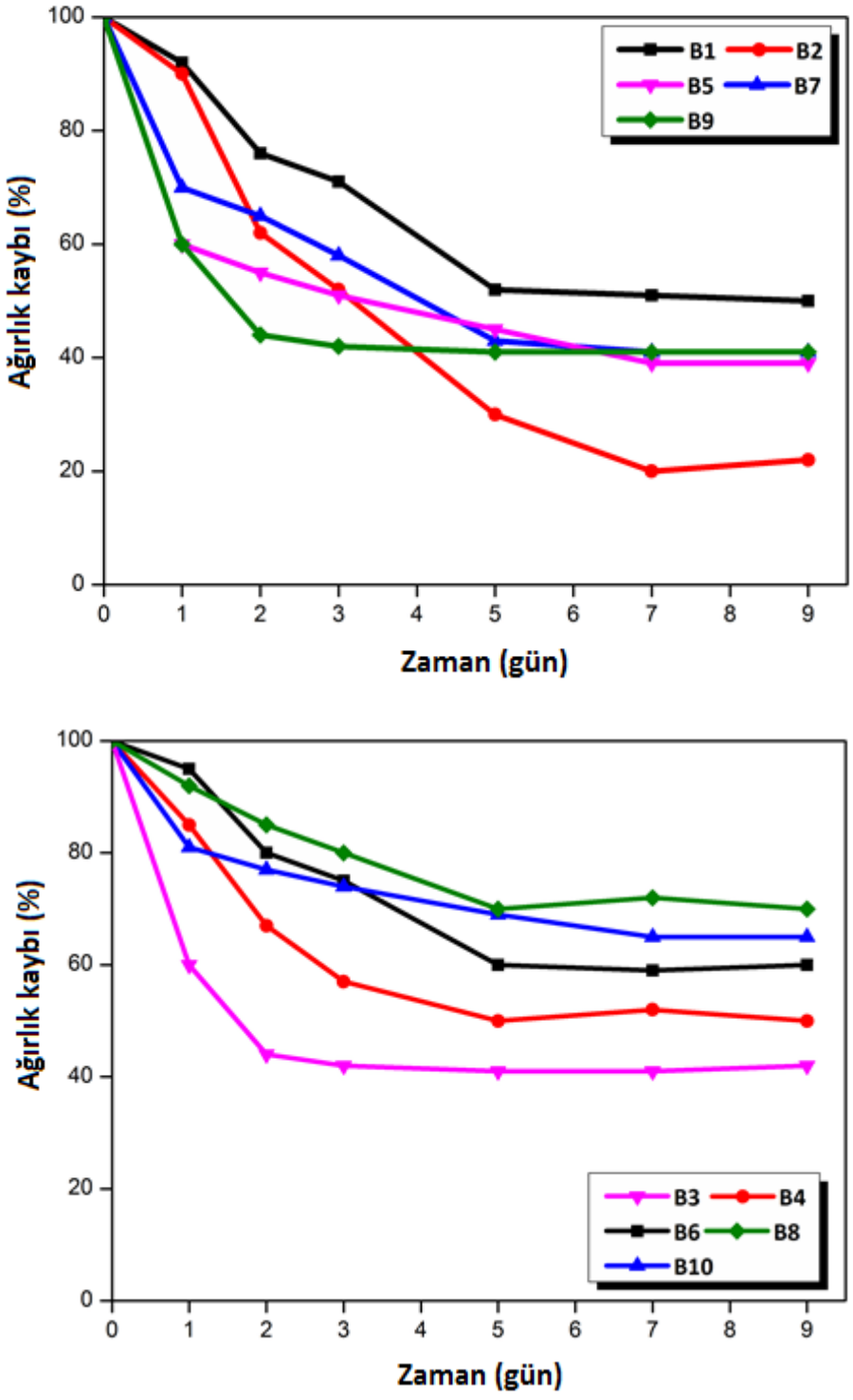
Şekil 4. 27 a)Y1, b)Y2, c)Y3, d)Y4, e)Y5, f)Y6, yıldız kopolimerlerinden elde edilen nanotaneciklerin SEM görüntüleri

4.4 Amfifilik Kopolimerlerin Hidrolitik Olarak Biyobozunma Özellikleri

PCL homopolimerinin molekül ağırlığına bağlı olarak 2-4 yıl arasında tamamen bozunduğu [22], PBAE homopolimerinin ise % 70'inin yaklaşık 1 günde bozunduğu bilinmektedir [23]. PBAE'nin bu hızlı bozunurluğu PCL'nin ise çok yavaş bozunması tek başlarına bir ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmalarını sınırlandırır. Bu iki polimer aynı yapıda bulunduklarında ise kopolimerdeki oranlarına bağlı olarak bozunma süreleri ayarlanabilir.

Hidrolitik bozunma, su tüm polimer yapısına nüfuz ettiği zaman rastgele hidrolitik zincir bölünmesi ile gerçekleşir ve polimerin molekül ağırlığında genel bir azalma olur. PCL ve PBAE'nin yapısında bulunan ester bağları kararsız olduklarından su ile temas ettiğinde hidroliz olur ve düşük molekül ağırlıklı, toksik olmayan yan ürünler oluşur. PCL'nin hidroliz ara ürünü olan 6-hidroksikaproik asit ve PBAE'nin yan ürünleri olan poli(β-amino asid) ve dioller biyolojik çevrime girerek vücuttan atılırlar. Kopolimer yapısında bulunan mPEG bozunmadan kalır ve bu şekliyle vücuttan uzaklaştırılır.

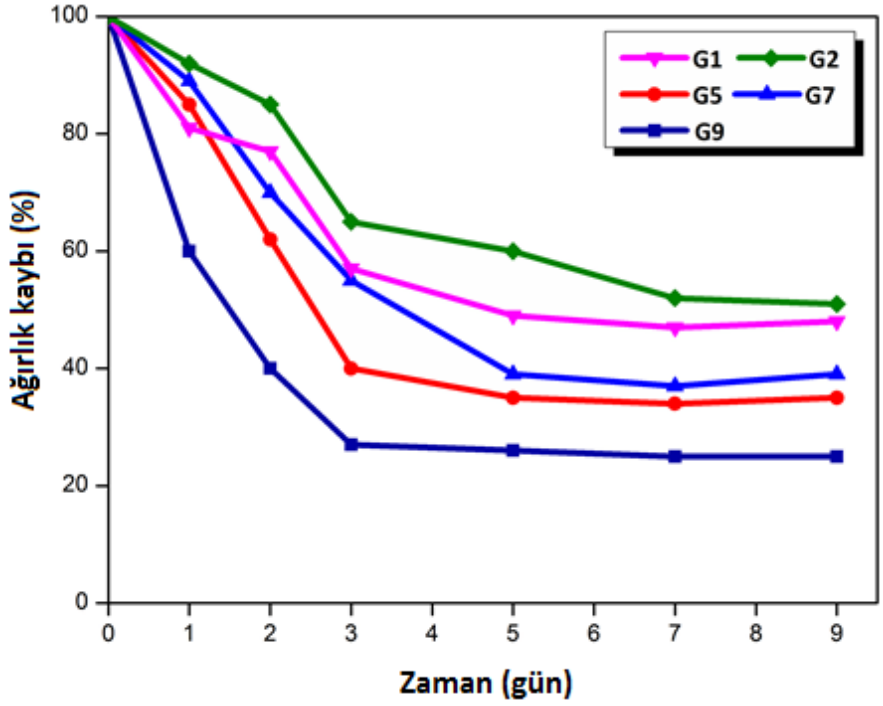
Polimerin molekül ağırlığının artmasının hidrolitik bozunma üzerinde iki farklı etkisi vardır. Bunlardan ilki, yüksek molekül ağırlığının polimerin zincir uzunluğunu yani zincirdeki ester gruplarının sayısını arttırmasıdır. Hidrolitik olarak bölünecek ester bağlarının daha fazla sayıda olması bozunmanın daha uzun sürede olacağı anlamına gelir. Diğeri ise, molekül ağırlığı arttıkça suyun daha sıkı olan polimer yapısına girmesi zorlaşacak ve bozunma hızının düşmesine neden olacaktır. Yani kopolimerlerin molekül ağırlığı arttıkça bozunma hızlarının düşmesi ve bozunmanın daha yavaş gerçekleşmesi beklenir.

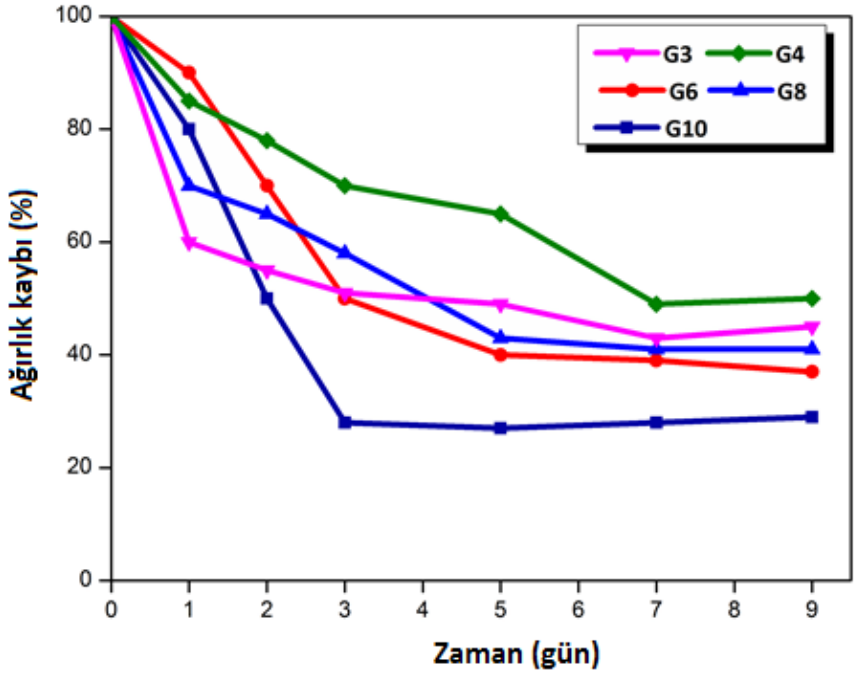


Şekil 4. 28 Triblok kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları

Triblok kopolimerler söz konusu olduğunda, yüksek molekül ağırlıklı mPEG ($\bar{M}$n:5000) bloğu içeren B3, B4, B6, B8 ve B10 kopolimerlerinin daha hızlı bozundukları görüldü. Bu sonuçlardan, daha hidrofilik olan kopolimerlerin daha fazla su absorplayarak kopolimerin hidroliz ve bozunma hızlarında artışa neden oldukları söylenebilir. Bunlar arasında en kısa PCL zinciri içeren ve toplam molekül ağırlığı en küçük olan B3 kopolimerinin en hızlı bozunduğu belirlendi. Bu sonuç, daha az ester grubu içeren kopolimerin daha çok ester grubu içerenlere göre daha yavaş bozunduğu gerçeğini destekledi [165]. PBAE grubu daha hidrofilik olan B8 ve B10 kopolimerlerinin B4 ve B6'dan daha hızlı bozunduğu görüldü. Ayrıca B9 kopolimerinin B1 ve B7'den daha hızlı bozunması, onun daha hidrofilik olduğunu gösterir. Düşük molekül ağırlıklı mPEG (Mn:2000) içeren kopolimerlerden B2 uzun PCL zincirinden dolayı bu grubun en yavaş hidroliz olan üyesidir.

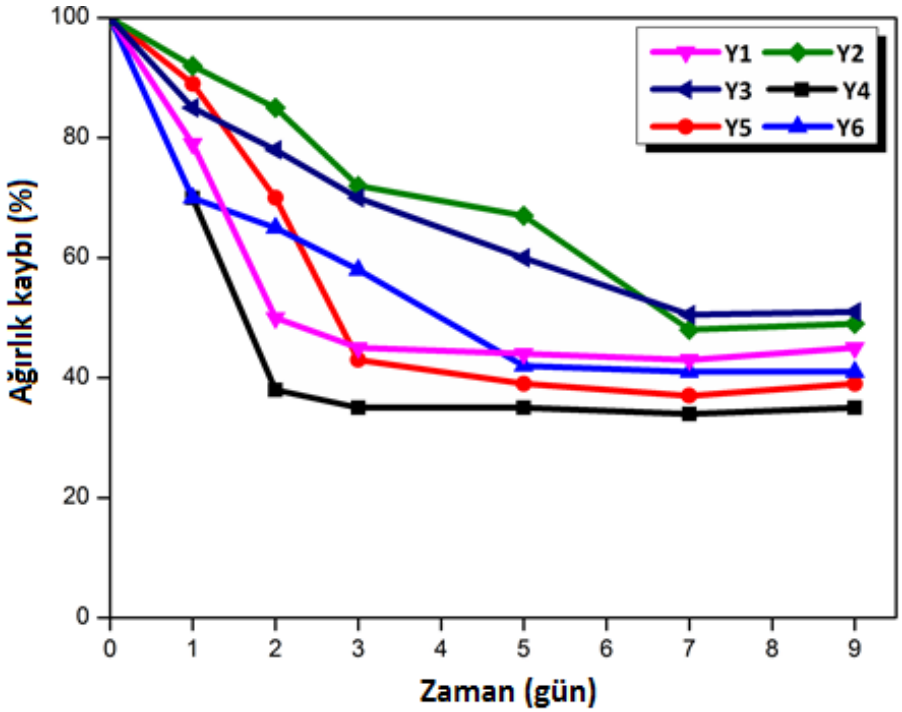
Graft kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları üzerinde hem hidrofilik mPEG gruplarının hem de pH duyarlı PBAE'lerin hazırlanmasında kullanılan amin ve diakrilat bileşiklerinin hidrofilik karakterinin etkisi söz konusudur. Yapısında mPEG 5000 bloğunu içeren graft kopolimerlerden (G3, G4, G6, G8 ve G10) en yavaş bozunanı yapısında uzun PCL bloğu bulunan G4 kopolimeridir. Hidrofilik bir diakrilat olan PEGDA içeren G10 ve G6 kopolimerlerinin 9 günde sırasıyla % 30 ve % 40 kadarının bozunduğu görüldü. DEGDA içeren G8 ve G3 kopolimerlerinde ise 9 günde sırasıyla % 43 ve % 50'lik ağırlık kaybı gözlendi. mPEG 2000 içeren graft kopolimerlerden (G1, G2, G5, G7 ve G9) ise 3 günde % 75 bozunmayla en hızlı olanı hidrofilik karakteri yüksek olan G9 kopolimeridir. Bunu sırasıyla 3 saatte % 58, % 42, % 41 ve % 25 bozunmayla G5, G7, G1 ve G2 kopolimerleri izler. G2'nin en yavaş bozunmaya sahip olmasının nedeni, diğerlerinden farklı olarak uzun PCL bloğuna sahip olmasıdır.





Şekil 4. 29 Graft kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları

PBAE'nin bozunma hızı amin ve diakrilatın ikisinin de hidrofilikliğine bağlıdır. Bundan dolayı yapısında iki hidroksil grubu bulunan amin bileşiği ve hidrofilikliği yüksek olan PEGDA içeren G10 kopolimeri daha hızlı bozunur. Beklenildiği gibi, G10 kopolimeri hidrofobik karakteri yüksek olan G4 kopolimerinden daha hızlı bozundu. G4 kopolimerinin yaklaşık olarak % 50'si 9 günde bozunurken aynı sürede G10 kopolimerinin % 75'i bozundu. Bu sonuçlardan, daha hidrofilik olan sistemlerin daha çok su absorplamasının hidroliz ve bozunma hızlarının artmasına neden olduğu görüldü. Diğer kopolimerlerle kıyaslandığında G9 ve G10 kopolimerlerinin göstermiş olduğu hızlı bozunma davranışı, su molekülleri ile yüzey hidrolizinin kolaylıkla olmasına bağlıdır.



Şekil 4. 30 Yıldız kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları

Yıldız kopolimerlerin biyobozunurluk davranışları üzerinde üç etkinin varlığı söz konusudur. Bunlar; artan [ε-CL]:[OH] oranıyla beraber PCL bloklarının uzunluğunun artması, kullanılan diakrilat bileşiklerinden PEGDA'nın HDDA'ya göre çok daha fazla hidrofilik olması ve bu kopolimerlerin yüzeyini kaplayan PEO'in yüzeyde ne derece var

olduğudur. PEGDA bileşiğini içeren Y4, Y5 ve Y6 kopolimerleri diğer yıldız kopolimerlerinden daha hidrofilik olduğu için daha hızlı bozunması beklenir ve bozunma oranları sırasıyla 3 günde % 60, % 58 ve % 40'dır. Y1, Y2 ve Y3 kopolimerleri değerlendirildiğinde ise, [ε-CL]:[OH] oranı en yüksek olan Y3 kopolimerinin 9 günde yaklaşık yarısının bozunduğu yani en yavaş bozunmanın bu kopolimerde olduğu görüldü. Bunun sebebi uzun PCL zincirlerinin dolaşık yapısının PBAE'nin hızlı bozunmasını önlemesidir. Bunu % 55 ve % 58 bozunma oranlarıyla Y2 ve Y1 kopolimerleri izler.

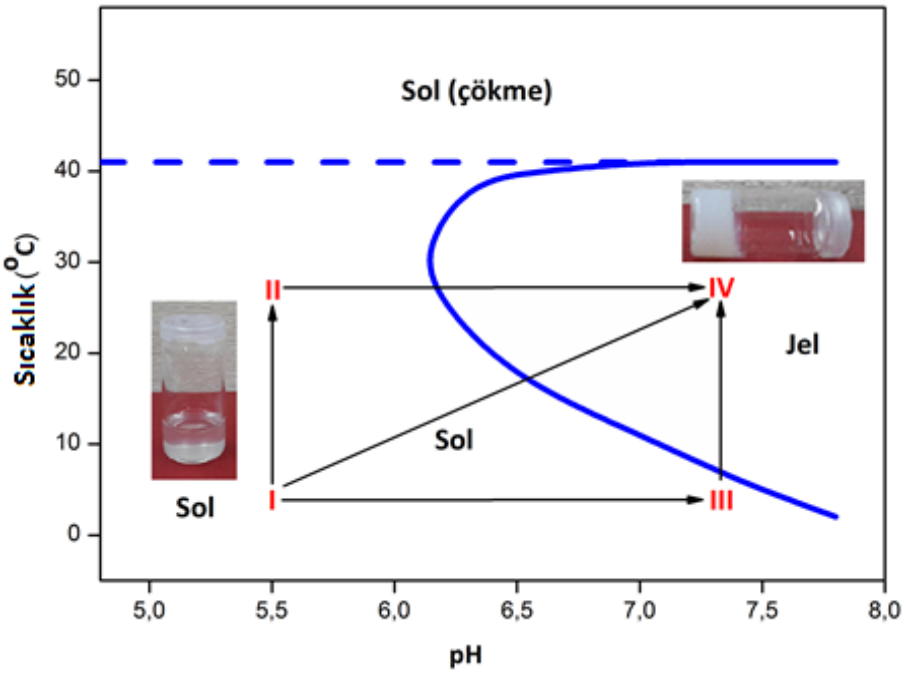
Elde edilen sonuçlar farklı amin, diamin ve diakrilat bileşikleri kullanarak veya hidrofilik ve hidrofobik bloklarının uzzunluğunu ayarlayarak kopolimerlerin hidrolitik bozunma davranışlarının kontrol edilebileceğini gösterdi.

4.5 Kopolimrlerin Sol-Jel Faz Geçiş Özellikleri

İyonlaşabilen gruplar, farklı pH'larda polimerin hidrofilik ya da hidrofobik parçası olarak davranırlar. Bu grup iyonlaştığı zaman polimer çözünürken deiyonize olduğu zaman çözünmez ve bu tersinir çözünme davranışı polimerin hidrofobikliğinin değişmesine neden olur. Bu çalışmada sentezlenen amfifilik kopolimerler yapısında bulunan hidrofilik mPEG ve PBAE gruplarından dolayı düşük pH'ta sulu çözeltilerinde kolaylıkla çözünürler. Ancak, PCL bloğu çok büyük olduğunda polimer suda çözünmez ve belirli bir konsantrasyonun üzerinde misel yapısı meydana gelir. Kopolimer çözeltisinin konsantrasyonu arttırıldığında, pH ve sıcaklığın da etkisiyle polimerik miseller arasında ara bağlantılar oluşur ve çözelti jel faza geçer.

Kopolimer çözeltilerinin sol-jel faz geçişleri tüp ters çevirme yöntemi ile çeşitli pH ve sıcaklık değerlerinde incelendi. Şekil 4.31'de gösterildiği gibi yüksek polimer konsantrasyonlarında (% 20-30) pH ve sıcaklık değişimine bağlı olarak 4 farklı geçiş durumu gözlendi. Düşük sıcaklık (5˚C) ve düşük pH (pH 5,5) değerlerinde, PBAE bloğunun tersiyer amin grupları iyonize olarak kopolimer yapısında hidrofilik bir blok olarak davranır. PCL bloğunun hidrofobikliği de sıcaklığın düşürülmesi ile azaldığından

kopolimer çözeltisi bu koşullarda jel oluşturumaz ve çözünür halde bulunur (*Durum I*). Yüksek sıcaklık ve düşük pH'ta (37˚C ve pH 7,4), PCL blokları daha hidrofobik olur ve bu bloklar arasındaki hidrofobik etkileşimlerden dolayı miseller büyüme eğilimindedir. Ancak, iyonize PBAE bloğunun hidrofilikliği PCL blokları arasındaki güçlü misel etkileşimlerini engeller ve kopolimer çözeltisi sıcaklık artışına rağmen jelleşemez (*Durum II*). Benzer olarak, düşük sıcaklık ve yüksek pH değerlerinde (5˚C ve pH 7,4), PBAE blokları deiyonize olarak hidrofobik hale gelir ancak düşük sıcaklıktan dolayı PCL blokları güçlü hidrofobik değildir ve jel oluşumu gözlenmez (*Durum III*). Fizyolojik koşullarda (37°C ve pH 7,4) PBAE'nin iyonlaşması azalır ve deiyonize PBAE blokları hidrofobik davranış gösterir. Ayrıca, sıcaklık arttıkça PEG dehidrate olmaya başlar. Bu pH ve sıcaklık değerinde su ve mPEG arasındaki hidrofilik etkikeşimler aşılır, PCL ve PBAE blokları arasındaki güçlü hidrofobik etkileşimlerin neden olduğu misel agregasyonunun artmasından dolayı kopolimer çözeltisi jelleşir (*Durum IV*) [166].



Şekil 4. 31 Kopolimerlerin sol-jel faz geçiş özellikleri

Kopolimerlerin sol-jel faz geçiş diyagramları sol-jel geçişinin gözlendiği alt sıcaklık ve jel-sol geçişinin gözlendiği üst sıcaklık sınırı olmak üzere iki kritik jelleşme sıcaklığı gösterir.

Kritik jelleşme sıcaklığının altında ve düşük pH değerlerinde, kopolimer çözeltisinde unimerler, miseller ve gruplaşmış miseller bir arada bulunur ve çözeltide hidrofilik grupların etkileşimi önemli bir rol oynar. Sıcaklığın artması çözeltideki unimer oranının azalmasına ve gruplaşmış misellerin boyutunun hızlı bir şekilde büyümesine neden olur ve kopolimer çözeltileri sol-jel faz geçişi gösterir. Sıcaklık arttıkça misel çekirdeklerindeki hidrofobik grupların etkileşimi kademeli olarak artarak daha yoğun bir jel yapısı oluşur ve jel saydam yapıdan opak hale geçer. Sıcaklık daha da arttırılırsa, misel çekirdeğindeki hidrofobik zincirler sıkı bir şekilde büzülür ve hidrofilik PEG blokları dehidratasyona uğrar. Büzülmüş misel grupları yeniden düzenlenir, su içinde akma eğilimindedir ve jel-sol geçişi başlar. Sıcaklık jel-sol geçiş sıcaklığının üzerine çıktığında, PEG bloklarının kısmi dehidratasyonunun neden olduğu kümelenmiş ağ yapısı bozulmaya başlar. Hidrofobik grup etkileşimleri baskın hale gelir, kopolimer ve su arasındaki hidrojen bağları zayıflayarak su jel yapısından dışarı atılır ve büzülmüş misel grupları suda çöker. pH ve sıcaklık duyarlı bu kopolimer çözeltisi sol-jel geçişi gösterdiğinde homojen yapıdayken jel-sol geçişi gösterdiğinde çözelti heterojendir, yani jel yapısından atılan su ve kopolimerden oluşur [167].

Kopolimerlerin sol-jel faz geçiş özellikleri üzerine kopolimer konsantrasyonunun, farklı PBAE blok uzunluğunun, mPEG molekül ağırlığının ve hidrofobik/hidrofilik blok oranının (PCL/mPEG) etkileri incelendi.

4.5.1 Kopolimer Konsantrasyonunun Etkisi

Triblok, graft ve yıldız yapıdaki kopolimerlerin PBS içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin sol-jel faz geçişleri incelendi ve sonuçlar Çizelge 4.7'de verildi. Kopolimerlerin jelleşmesinde konsantrasyon çok önemlidir. Yapılan denemelerde % 10 kopolimer konsantrasyonunun altında çözeltide jel oluşumu gözlenmezken, konsantrasyon % 30'un üzerine çıkarıldığında ise bazı kopolimerler tampon çözeltide çözünmedi. Çözünen kopolimer örneklerinin ise yüksek viskozite değerlerinden dolayı enjeksiyon uygulamalarında kullanılmalarının münkün olmayacağı görüldü.

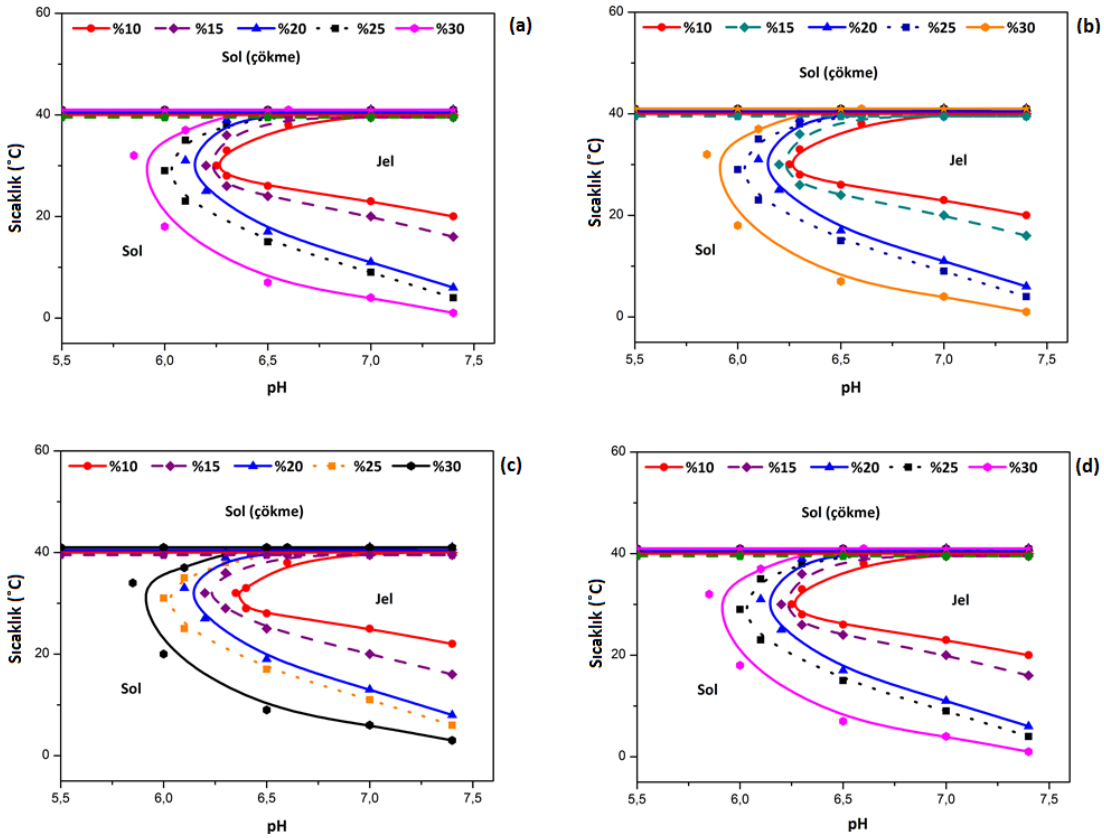
Hidrofilik karakteri yüksek olan bazı kopolimer yapıların düşük konsantrasyonlarda jel oluşumu için gerekli olan hidrofobik etkileşimleri sağlayamadığı için sol-jel geçişi göstermedikleri görüldü. Blok kopolimerlerden PCL bloğu daha kısa ve toplam molekül ağırlığı daha küçük olan örneklerin düşük kopolimer konsantrasyonlarında (% 10) jel oluşturamadıkları gözlendi. Uzun PCL grubu içeren B2 kopolimerinin güçlü hidrofobik etkileşimlerden dolayı % 30 konsantrasyonda suda çözünmediği görüldü. Graft kopolimerlerin hazırlanmasında kullanılan amin ve diakrilat bileşikleri diğerlerinden daha hidrofilik yapıda olduğu için % 10 kopolimer konsantrasyonunda jel oluşumu gözlenmedi. G10 ve G6 graft kopolimeri hem yapısındaki PEGDA bileşiğinden hem de uzun mPEG zincirinden dolayı daha hidrofilik yapıda olduğundan % 15 konsantrasyonda jel geçişi olmadı. Ayrıca, APD bileşiğindeki çift hidroksil grubundan dolayı G10 kopolimerinin % 20 konsantrasyonunda da jel oluşumu gözlenmedi. Y1, Y2 ve Y3 yıldız kopolimerlerinin sulu çözeltileri düşük konsantrasyonlarda sol-jel geçişi gösterirken Y4, Y5 ve Y6 kopolimerlerinin hidrofilikliği yüksek PEGDA bileşiğini içerdiğinden dolayı % 15 ve % 20 konsantrasyonlarda jel oluşturamadığı belirlendi. Y2 ve Y3 kopolimeri uzun PCL zincirleri içerdiğinden ve yüksek molekül ağırlığından dolayı % 30 konsantrasyonda çözünmedi.

Şekil 4.32'de farklı PBAE bloklarına sahip triblok kopolimer çözeltilerinin sol-jel faz geçiş grafikleri verildi. Bu grafikler incelendiğinde, genel olarak kopolimer konsantrasyonu arttıkça, sol-jel faz geçiş sıcaklığının düştüğü ve kopolimerin jel oluşturduğu bölgenin genişlediği görüldü. Daha hidrofilik PBAE grubuna sahip olan B8 ve B10 kopolimerlerinin jel oluşturduğu alt kritik sıcaklığın daha yüksek olduğu belirlendi. Artan sıcaklık ve pH değerlerinde, deiyonize halde olan PBAE grupları ve PCL grupları arasında güçlü hidrofobik etkileşimler sağlanır ve blok kopolimer çözeltilerinin düşük konsantrasyonlarında (% 10) polimer çözeltisi jelleşebilir. Kopolimer konsantrasyonu arttıkça oluşan misellerin sayısı artar ve misellerin birleşmesi daha düşük sıcaklıklarda olur bundan dolayı geniş jel bölgesi elde edilir.

Çizelge 4. 7 Farklı yapılardaki kopolimer çözeltilerin değişik konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçiş özellikleri

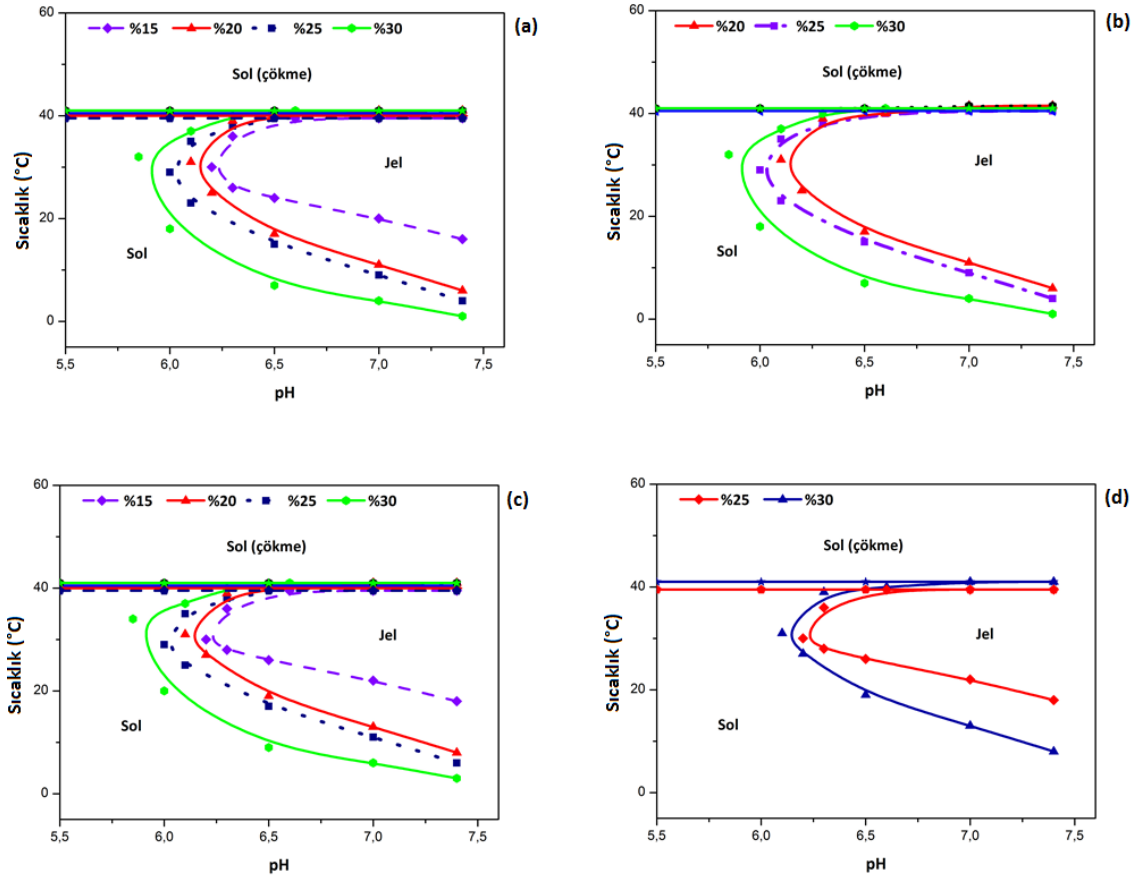
Kopolimer	Kopolimer Miktarı (%)				
	10	15	20	25	30
B1	-	+	+	+	+
B2	+	+	+	+	X
B3	+	+	+	+	+
B4	+	+	+	+	+
B5	-	+	+	+	+
B6	+	+	+	+	+
B7	-	+	+	+	+
B8	+	+	+	+	+
B9	-	+	+	+	+
B10	+	+	+	+	+
G1	-	+	+	+	+
G2	-	+	+	+	+
G3	-	+	+	+	+
G4	-	+	+	+	+
G5	-	+	+	+	+
G6	-	-	+	+	+
G7	-	+	+	+	+
G8	-	+	+	+	+
G9	-	+	+	+	+
G10	-	-	-	+	+
Y1	+	+	+	+	+
Y2	+	+	+	+	X
Y3	+	+	+	+	X
Y4	-	-	+	+	+
Y5	-	-	+	+	+
Y6	-	-	+	+	+

(-) : Sol-jel geçişi gözlenmedi, (+) : Sol-jel geçişi gözlendi, (x) : Kopolimer çözünmedi.



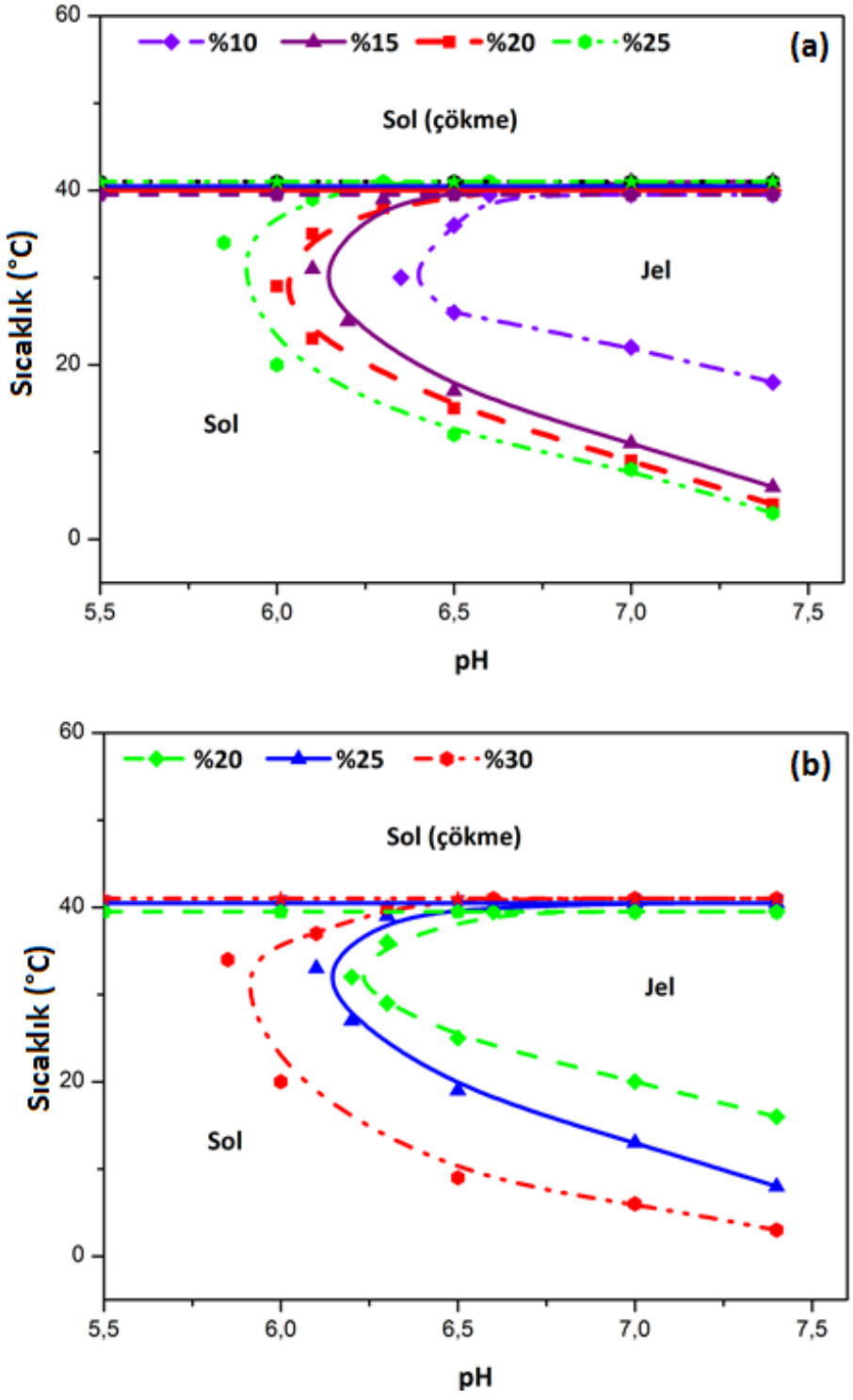
Şekil 4. 32 (a) B4, (b) B6, (c) B8, (d) B10 triblok kopolimerlerinin farklı konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçişleri

Şekil 4.33 farklı PBAE bloğuna sahip graft kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerinde kopolimer konsantrasyonunun etkisini göstermektedir. Kopolimer konsantrasyonu azaldıkça, sol-jel faz geçiş sıcaklığının tüm pH değerlerinde arttığı ve kopolimerin jel bölgesinin daraldığı gözlendi. Ayrıca, graft kopolimerlerin ana zincirini oluşturan PBAE bloğunun hidrofilikliğinin artmasının sol-jel geçiş sıcaklığını daha yüksek değerlere taşıdığı görüldü. G4, G6, G8 ve G10 kopolimerlerinin % 30 konsantrasyonlarının pH 7,4'de sol-jel faz geçişi gösterdiği sıcaklıkların sırasıyla 2˚C, 6˚C, 3˚C ve 8˚C olduğu bulundu. Bu sonuçlardan hidrofilik PEGDA bileşiğini içeren G6 ve G10 kopolimerlerinin verilen konsantrasyonlardaki jel bölgesinin daha dar olduğu tespit edildi.



Şekil 4. 33 (a) G4, (b) G6, (c) G8, (d) G10 graft kopolimerlerinin farklı konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçişleri

Y2 ve Y5 yıldız kopolimerlerinin farklı konsantrasyonlarda incelenen sol-jel geçişleri Şekil 4.34'de verildi. Konsantrasyon artışı ile beraber jel oluşum sıcaklığının düştüğü görüldü. PBAE grubunun sentezinde kullanılan hidrofilik PEGDA bileşiğini içeren kopolimerlerin düşük konsantrasyonlarda (% 10-15) sol-jel geçişi göstermedikleri ve hidrofobik bloğu uzun olan Y2 ve Y3 kopolimerlerinin ise yüksek konsantrasyonda (%30) çözünmediği görüldü. Yıldız kopolimer tanecik yüzeyinin PEO ile kaplanması sırasında yıkama ile ortamdan uzaklaştırılamayan ve serbest halde kalan PPO-PEO-PPO grupları tanecikler arasında köprü bağlantıları oluşturarak jel oluşumunun daha düşük sıcaklıklara kaymasına neden olur.



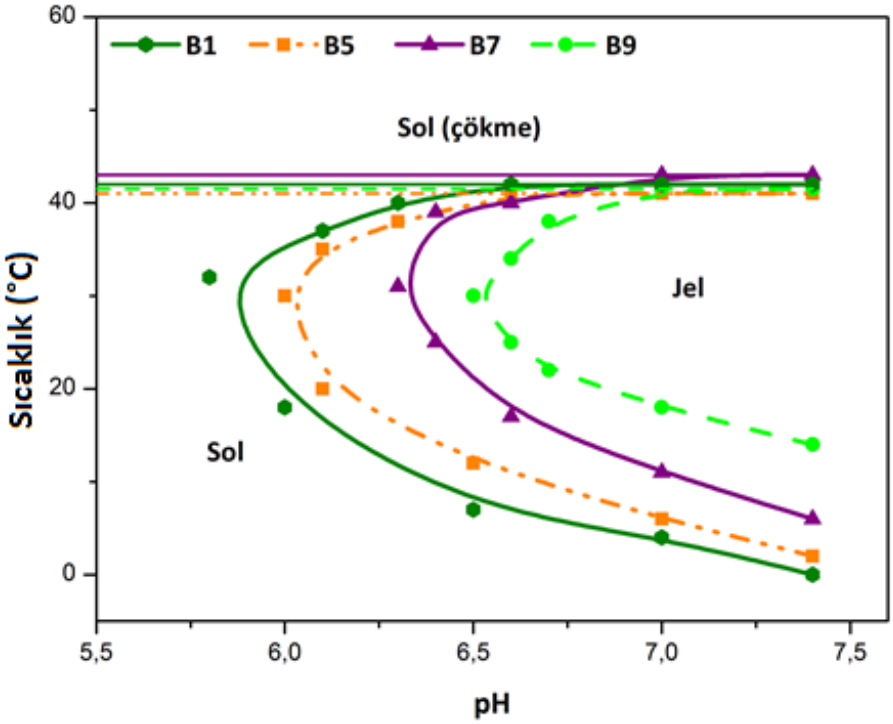
Şekil 4. 34 (a) Y2, (b) Y5 yıldız kopolimerlerinin farklı konsantrasyonlardaki sol-jel faz geçişleri

Farklı kopolimer konsantrasyonlarında gerçekleştirilen denemelerden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bu aşamadan sonraki çalışmalarda tüm kopolimer örneklerinin sol-jel faz geçişi gösterdiği % 25 kopolimer konsantrasyonu kullanıldı.

4.5.2 PBAE Grubunun Etkisi

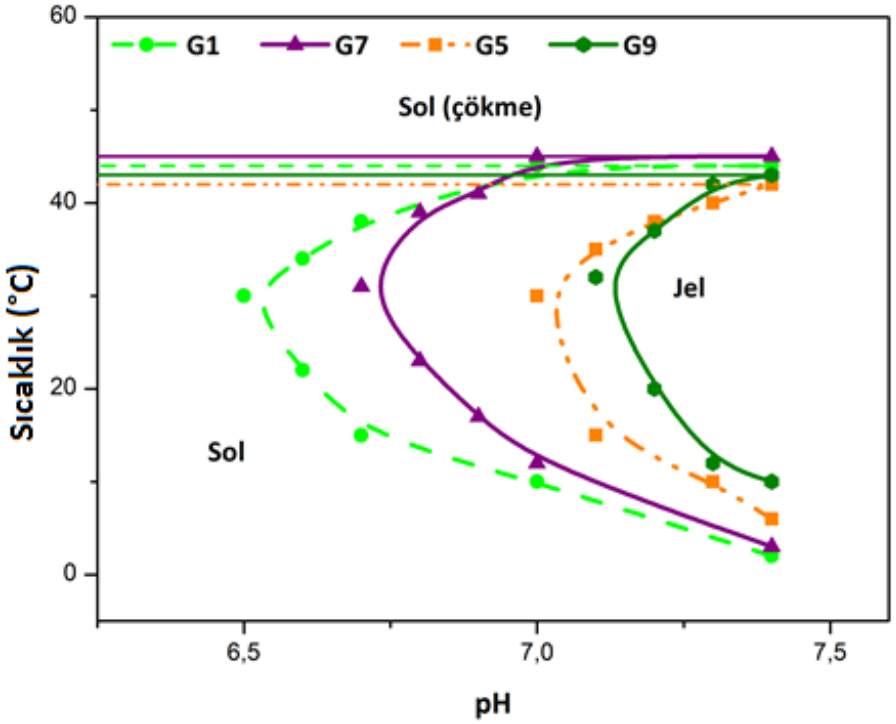
mPEG molekül ağırlığı ve hidrofobik/hidrofilik oran (PCL/mPEG) sabit tutularak kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine farklı yapıdaki ve farklı molekül ağırlığındaki PBAE gruplarının etkisi incelendi. pK_b'nin altındaki pH değerlerinde PBAE'nin iyonizasyonundan dolayı molekül ağırlığından bağımsız olarak kopolimerin hidrofobikliği azalır ve kopolimer çözeltisi sol halde bulunur. PBAE blok uzunluğu arttıkça jel-sol geçiş sıcaklığı aynı kalmasına rağmen sol-jel geçiş sıcaklığı yükselir ve bundan dolayı jel bölgesi daralır. Bundan dolayı PBAE blok uzunluğu arttıkça hidrofilik karakteri de artan kopolimerlerin jel oluşturabilmeleri için daha yüksek sıcaklık ve pH değerleri gerekir.

Şekil 4.35, Şekil 4.36 ve Şekil 4.37 incelendiğinde; farklı PBAE gruplarına sahip triblok, graft ve yıldız kopolimer çözeltilerinin pH 5,7 ile pH 7,4 arasında sol-jel faz geçişi gösterdikleri görüldü. Düşük pH değerlerinde tersiyer amin gruplarının iyonizasyonundan dolayı PBAE hidrofilik kararkterdedir ve yüklü PBAE blokları arasındaki elektrostatik itme kopolimerler arasında zayıf etkileşimlere neden olur. Buna karşın, pH 7,4 gibi yüksek bir değerde iken, düşük sıcaklıkta bile kümelenmiş misellerin oluşumundaki artış jel faza geçişe neden olur. PBAE bloklarının daha çok deiyonize olmasından dolayı pH 7,2-7,8 aralığındaki jel bölgesinin pH 6,4-7,0 arasındakinden daha geniş olduğu belirlendi.



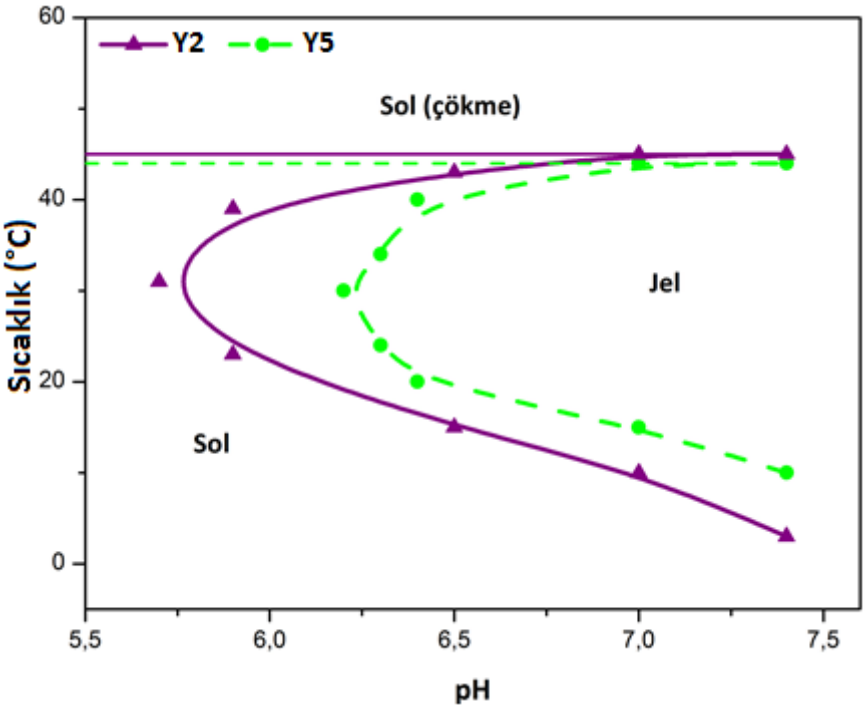
Şekil 4. 35 Blok kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PBAE etkisi

ε-CL:mPEG oranı 25:1 olan ve düşük molekül ağırlıklı mPEG ($\bar{M}$n:2000) içeren B1, B5, B7 ve B9 blok kopolimerlerinin sol-jel geçişleri üzerine PBAE bloğunun etkisi Şekil 4.35'de gösterildi. PBAE bloğunun yapısında bulunan HDEDA bileşiğinin hidrofilik karakterinin son kopolimerin net hidrofilikliğini de etkilediği görüldü. PBAE grubunun hidrofilikliği arttıkça (B1'den-B9'a) kopolimerlerin sol-jel geçiş sıcaklığı yükselirken jel-sol geçiş sıcaklığının değişmeden aynı kaldığı görüldü. Elde edilen sonuçlardan, jel oluşumunu desteklemek için sadece PBAE'nin deiyonizasyonuna neden olacak yüksek pH değil aynı zamanda PCL blokları arasındaki hidrofobik etkileşimleri arttıracak yüksek sıcaklığın da gerekli olduğu görüldü.



Şekil 4. 36 Graft kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PBAE etkisi

mPEG molekül ağırlığı ve ε-CL:mPEG oranı sabit olan G1, G5, G7 ve G9 graft kopolimerlerinin sol-jel geçişleri üzerine PBAE bloğunun etkisi Şekil 4.36'da gösterildi. AEE/DEGDA bileşikleri kullanılarak hazırlanan PBAE1 grubu içeren G1 kopolimeri daha düşük sol-jel geçiş sıcaklığı gösterdi ve jel bölgesinin daha geniş olduğu bulundu. G5 ve G9 kopolimerleri, çok sayıda etilen glikol grubundan oluşan PEGDA bileşiği içerdikleri için hidrofilik karakterleri çok yüksek ve pKb değerleri yaklaşık 7,0 olan bu kopolimerler daha yüksek sıcaklıklarda jel geçişi gösterdi. Bu graft kopolimerlerin jel oluşturabildiği pH ve sıcaklık aralığı çok dar olmasına rağmen fizyolojik koşullarda jel oluşumu gözlendi. G7 kopolimeri amin bileşiğinin (APD) yapısında bulunan iki hidroksil grubundan dolayı G1 kopolimerinden daha hidrofilik olduğundan daha yüksek sıcaklıkta sol-jel geçişi gösterdi.



Şekil 4. 37 Yıldız kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PBAE etkisi

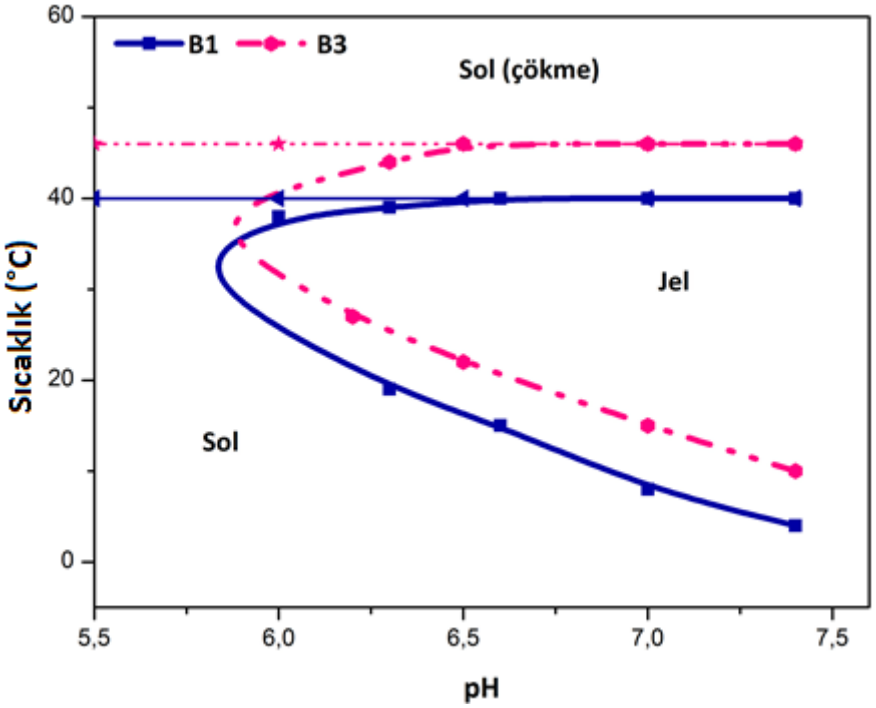
Şekil 4.37'de [ε-CL]:[OH] oranı 10:1 olan Y2 ve Y5 yıldız kopolimerlerinin sol-jel geçişleri üzerine farklı PBAE bloklarının etkisi gösterildi. Daha hidrofilik karakterde olan Y5 kopolimerinin sol-jel geçişi beklenildiği gibi daha yüksek sıcaklık değerlerinde görüldü. PBAE grubunun hidrofilik karakteri arttıkça kopolimerin net hidrofilikliğinin de arttığı ve bunun sonucu olarak jel bölgesinin daraldığı söylenebilir.

4.5.3 mPEG Molekül Ağırlığının Etkisi

ε-CL:mPEG oranı 25:1 ve PCL blok uzunluğu sabitken mPEG molekül ağırlığı artışının blok ve graft kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerindeki etkisi incelendi. Kopolimer yapısından bağımsız olarak, mPEG bloğunun molekül ağırlığı 2000'den 5000'e çıkarıldığında, sol-jel geçişinin daha yüksek sıcaklıklara kaydığı görüldü (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39). Yüksek pH değerlerinde PBAE deiyonize haldedir ve hidrofobik bir blok olarak davranır. Bundan dolayı sabit PCL/mPEG oranında ve PBAE blok uzunluğunda, hidrofobik blokların hidrofilik bloklara oranı mPEG molekül ağırlığının artması ile azalır.

PCL ve PBAE grupları arasında güçlü hidrofobik etkileşimler oluşturmak için sıcaklığın arttırılması gerekir [143].

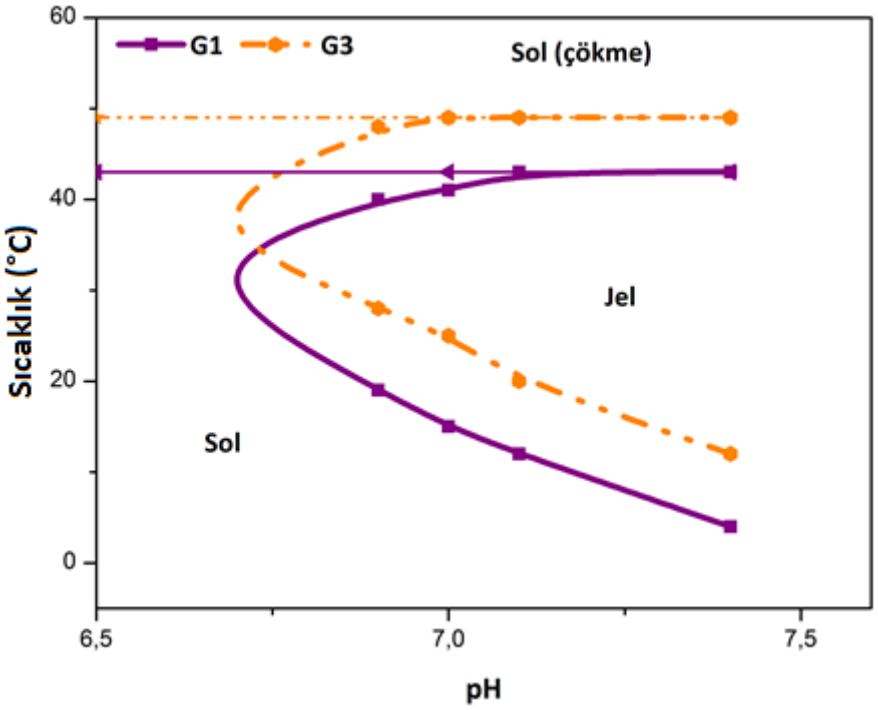
Kopolimerlerin sol-jel geçiş sıcaklığı üzerinde molekül ağırlığının büyük bir etkisi vardır. Kopolimerin molekül ağırlığının artması mPEG uzunluğunun artması ile aynı olduğundan, aynı PCL/mPEG oranında, kopolimerin toplam molekül ağırlığındaki artışın sol-jel geçişini yüksek sıcaklıklara kaydırdığı görüldü. Kopolimer zincirlerinin uzunluğu arttıkça, miseller arasındaki çok sayıda köprü bağlantılarından dolayı daha fazla gruplanmış misel üretilir, bu da sol-jel geçiş sıcaklığının düşmesine ve jel-sol geçiş sıcaklığının artmasına neden olur.



Şekil 4. 38 B1 ve B3 kopolimerlerinin sol-jel faz geçişleri üzerine mPEG molekül ağırlığının etkisi

B1 triblok kopolimerinde pH 7,4'de 3˚C sıcaklıkta jel geçişi olurken, B3 kopolimerinde 12˚C'nin altındaki sıcaklıklarda hiçbir pH değerinde jel oluşumu gözlenmedi çünkü uzun mPEG zincir uzunluğundan dolayı bu koşullarda B3 kopolimer yapısında hidrofiliklik baskın haldedir. B1 kopolimerinde, jel-sol geçişi tüm pH değerlerinde 40˚C sıcaklıkta görülürken B3 kopolimerinde 46˚C sıcaklıkta görülmesi, uzun PEG zincirlerinin

tamamının dehidratasyonu için daha yüksek sıcaklıkların gerekli olduğunu kanıtladı [168].

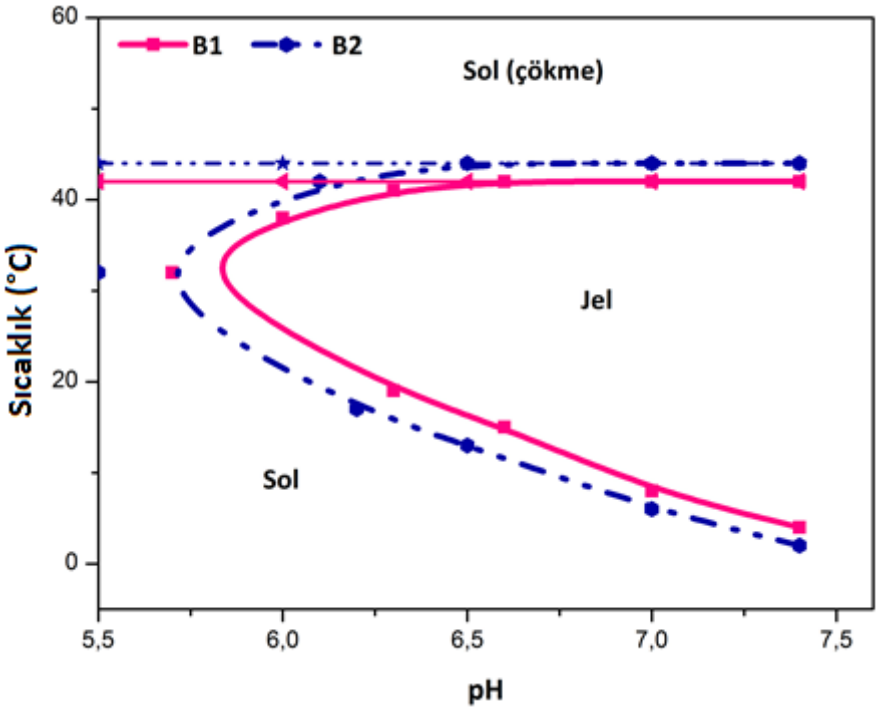


Şekil 4. 39 G1 ve G3 kopolimerlerinin sol-jel faz geçişleri üzerine mPEG molekül ağırlığının etkisi

G1 ve G3 kopolimerinin sol-jel geçiş grafikleri kıyaslandığında düşük mPEG molekül ağırlıklı G1'in, güçlü hidrofobik etkileşimlerden dolayı daha geniş bir jel bölgesine neden olduğu görüldü. Blok kopolimerler düzenli misel yapıları oluştururken, graft kopolimerlerde miseller arasında oluşan köprüler moleküler kümelenmenin daha kolay olmasını sağlar. Bundan dolayı graft kopolimerlerin sol-jel geçiş sıcaklığı düşüktür ve jel bölgesi daha geniştir [169].

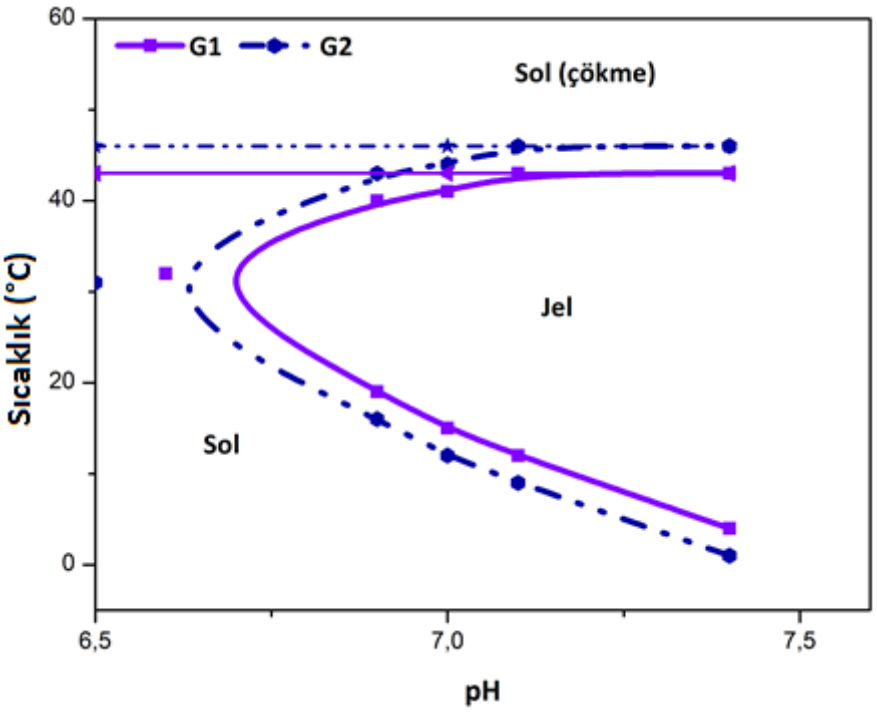
4.5.4 Hidrofobik/Hidrofilik Blok Oranın Etkisi

Hidrofobik/hidrofilik blok oranı kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerinde önemli bir parametredir. Çeşitli hidrofobik/hidrofilik blok oranlarındaki ve sabit PBAE blok uzunluğundaki kopolimerlerin pH 5,5-7,4 arasındaki sol-jel geçiş grafikleri Şekil 4.40, Şekil 4.41 ve Şekil 4.42'de verildi.



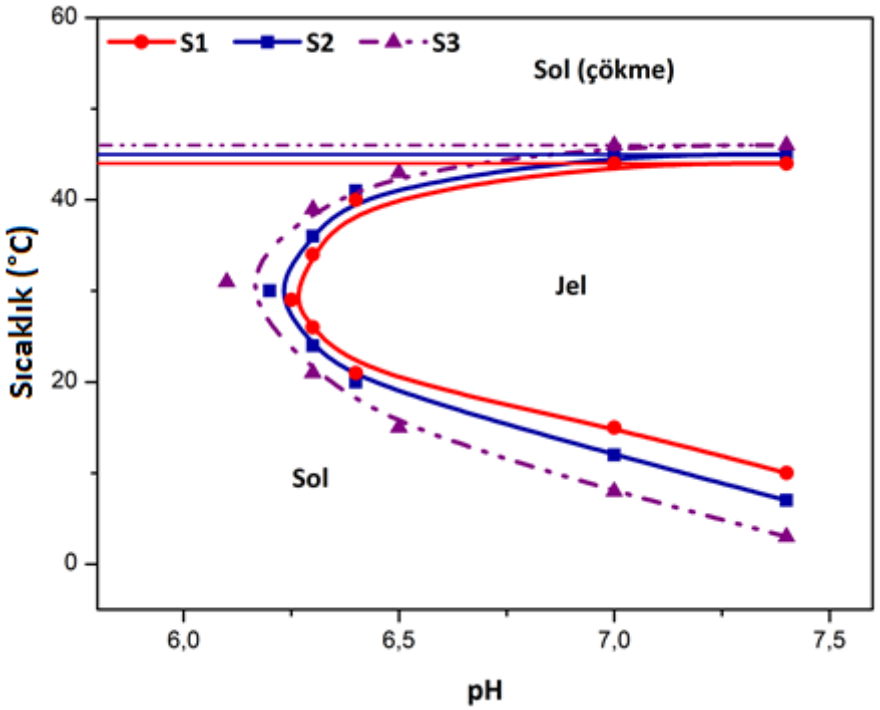
Şekil 4. 40 Blok kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PCL/mPEG oranının etkisi

Düşük pH'da PBAE bloğunun iyonlaşması ile PCL ve PBAE blokları arasındaki zayıflayan hidrofobik etkileşim pH arttıkça artar. Yüksek pH da hidrofobik bir blok olarak davranan PBAE grubu hidrofobik/hidrofilik oranın artmasına ve kopolimerin jel oluşturduğu bölgenin genişlemesine neden olur. Ayrıca, PCL'nin molekül ağırlığının artması yani PCL/mPEG oranının artması herhangi bir sıcaklıkta moleküllerası güçlü hidrofobik etkileşimlerden dolayı jel oluşumunun gözlendiği sıcaklık aralığını düşürerek jel bölgesinin genişlemesine neden olur [146].



Şekil 4. 41 Graft kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PCL/mPEG oranının etkisi

Jel oluşumunun gözlendiği sıcaklık aralığı esas olarak hidrofobik/hidrofilik blok oranından etkilenir. Düşük sıcaklıkta, hidrofobik/hidrofilik denge iyonlaşan PBAE gruplarından dolayı hidrofilik karaktere kayar bundan dolayı kopolimer çözeltisi düşük pH ve sıcaklıkta sol halinde bulunur. Yüksek sıcaklıkta, PBAE gruplarının da katkısıyla bu denge hidrofobik yöne kayar ve jel oluşumu gözlenir. Hidrofobik/hidrofilik blok oranı arttıkça tüm kopolimer sistemlerinde (25:1'den 50:1'e) sol-jel geçiş sıcaklığının ve jel-sol geçiş sıcaklığının daha yüksek sıcaklık değerlerine kaydığı ve jel bölgesinde önemli bir genişlemenin olduğu görüldü.



Şekil 4. 42 Yıldız kopolimerlerin sol-jel faz geçişleri üzerine PCL/mPEG oranının etkisi

4.6 Polimerik Misellerin, Nanotaneciklerin ve Jellerin Enkapsülasyon Etkinliği ve Etoposid Yükleme Kapasitesi Tayini

Bir antikanser ilacı olan etoposid polimerik misellerin ve nanotaneciklerin hidrofobik çekirdeğine fiziksel olarak bağlanarak, kan dolaşımındaki çözünürlüğü arttırılıp yan etkileri azaltıldı. Polimerik misellere ve nanotaneciklere farklı miktarlarda yüklenen etoposid miktarının belirlenmesi için Bölüm 3.2.8'de verilen yöntem kullanıldı ve analizler sonucunda elde edilen etoposid yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliği değerleri Çizelge 4.9'da verildi. İlaç yükleme kapasitesi misel yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemler için önemli bir karakterizasyon parametresi olup, yükleme sonucunda hesaplanan ilaç miktarının başlangıçta ortama konulan ilaç miktarına oranlanması ile bulundu (Eşitlik 3.1).

Hazırlanan etoposid yüklü polimerik misellerin ve nanotaneciklerin enkapsülasyon etkinliğinin % 10,43 ile % 58,41 arasında değişkenlik gösterdiği yükleme kapasitesinin ise % 3,99 ile % 11,56 arasında değiştiği görüldü. Elde edilen tüm değerler

incelendiğinde genel olarak amfifilik yapıdaki polimerlerin hidrofobik kısmını oluşturan PCL ve PBAE gruplarının oranının daha yüksek olduğu örneklerin daha büyük çekirdek kısmına sahip miseller oluşturduğu ve bunun da daha fazla ilacın misellerde tutulmasını sağladığı görüldü. Bu grupların polimerdeki miktarının artması ile misellerin % enkapsülasyon etkinliğinin ve yükleme kapasitesinin arttığı saptandı.

Misel yapısına yüklenen etoposid miktarı arttıkça, tüm kopolimer çeşitlerinde, enkapsülasyon etkinliğinin azaldığı görüldü. En yüksek enkapsülasyon etkinliğinin blok kopolimerlerden hazırlanan misellerde görülmesi, bu yapıların ilaç salımında daha yüksek verimle kullanılabileceğini gösterdi. Buradaki sonuçlardan da dallanmış yapının ilaç yükleme etkinliğini azalttığı görüldü.

Optimum ilaç yükleme miktarını belirlemek için, polimerik misel ve nanotaneciklere 5, 10, 15 ve 20 mg/mL arasında değişen miktarlarda etoposid yüklendi. Yüklenen etoposid miktarı 5 mg/mL olduğunda ilaç yükleme etkinliği % 57,84; 10 mg/mL olduğunda ilaç yükleme etkinliği % 58,41; 15 mg/mL olduğunda % 35,58 ve 20 mg/mL olduğunda ise yükleme etkinliği % 29,75 olarak bulundu (Çizelge 4.8). Bundan dolayı, optimum etoposid yükleme içeriği 10 mg/mL olarak bulundu ve bundan sonraki etoposid salım çalışmalarında 10 mg/mL ilaç yüklü misel ve nanotanecikler kullanıldı.

Çizelge 4. 8 Polimerik misellerin ve nanotaneciklerin % enkapsülasyon etkinliği ve % yükleme kapasitesi

Kopolimer	Kullanılan Etoposid Miktarı (mg)							
	5		10		15		20	
	EE (%)	YK (%)	EE (%)	YK (%)	EE (%)	YK (%)	EE (%)	YK (%)
B1	54,29	6,03	50,30	10,06	31,26	8,52	25,02	8,34
B2	58,41	6,49	57,84	11,56	35,58	9,70	28,95	9,65
B3	53,98	5,99	51,29	10,25	29,67	8,09	26,32	8,77
B4	57,86	6,42	55,36	11,07	34,59	9,43	27,45	9,15
B5	51,23	5,69	49,76	9,95	27,46	7,48	24,88	8,29
B6	57,91	6,43	55,23	11,04	34,27	9,34	27,93	9,31
B7	49,62	5,51	47,59	9,51	26,29	7,17	22,37	7,45
B8	56,32	6,26	57,45	11,49	35,21	9,60	29,01	9,67
B9	48,23	5,35	45,96	9,19	25,12	6,85	21,62	7,2
B10	56,88	6,32	55,64	11,12	33,94	9,25	29,75	9,91
G1	44,21	4,91	46,51	9,38	35,86	9,78	27,41	9,13
G2	43,71	4,85	44,26	8,85	34,28	9,34	29,84	9,94
G3	45,93	5,10	44,75	8,95	34,75	9,47	26,39	8,79
G4	44,38	4,93	43,26	8,65	33,62	9,16	28,41	9,47
G5	41,23	4,58	42,38	8,47	32,16	8,77	21,37	7,12
G6	42,39	4,71	45,73	9,14	35,69	9,73	21,96	7,3
G7	43,98	4,88	49,62	9,9	39,71	10,83	23,42	7,8
G8	45,69	5,07	41,27	8,25	31,96	8,71	24,59	8,19
G9	39,12	4,34	34,59	6,91	29,37	8,01	18,35	6,11
G10	40,12	4,45	41,28	8,25	31,53	8,59	19,69	6,56
Y1	39,12	4,34	30,26	6,05	20,36	5,55	10,43	3,47
Y2	35,96	3,99	29,58	5,91	19,57	5,33	15,96	5,32
Y3	37,51	4,16	30,67	6,13	20,19	5,5	17,86	5,95
Y4	46,31	5,14	35,84	7,16	25,48	6,94	22,03	7,34
Y5	44,48	4,94	33,19	6,63	23,91	6,52	24,12	8,04
Y6	42,66	4,74	32,57	5,42	22,75	6,20	23,68	7,89

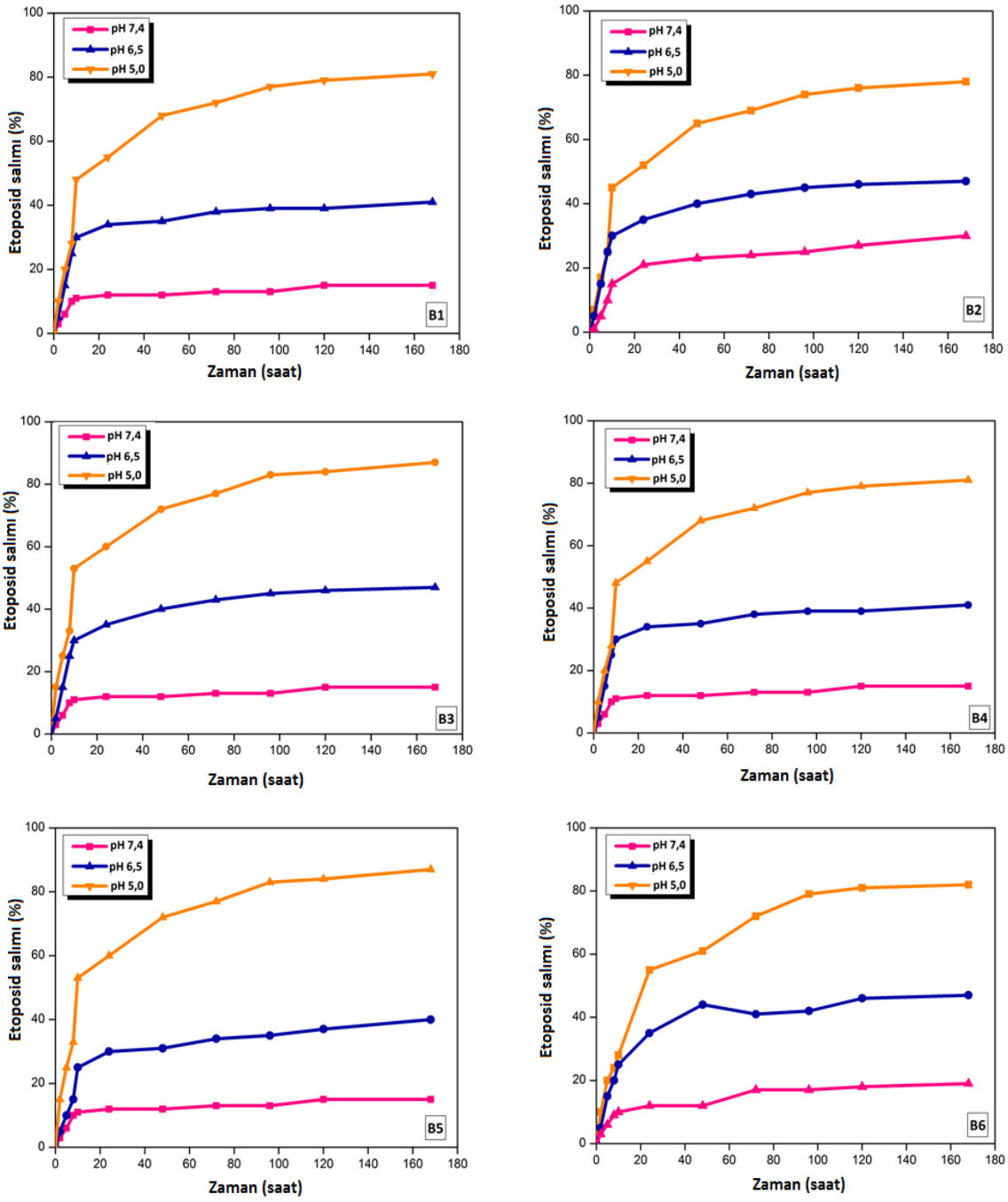
4.7 Polimerik Miseller, Nanotanecikler ve Jellerden In Vitro Etoposid Salımı

4.7.1 Polimerik Misel ve Nanotaneciklerden In Vitro Etoposid Salımı

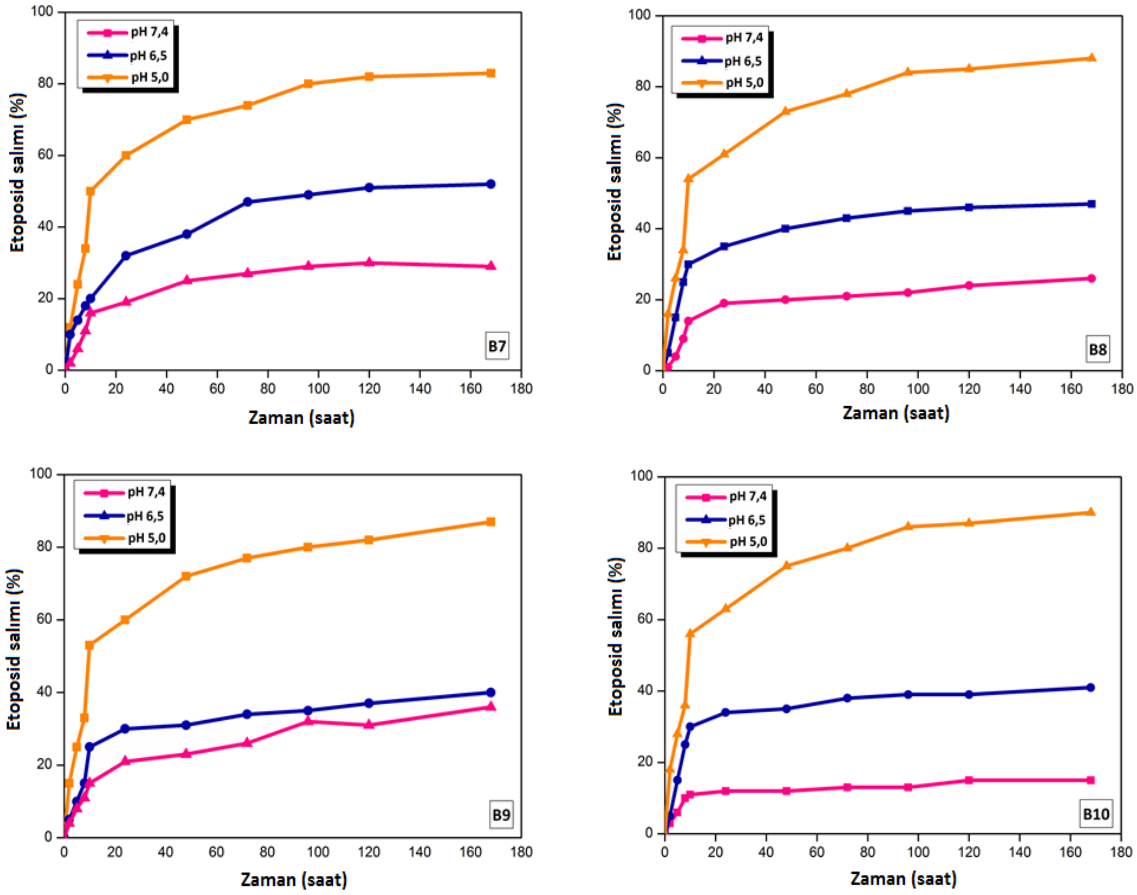
Vücuda alındıktan sonra dolaşım sırasında ilacın kanda salınmayarak sadece hedeflenen bölgede salımı kontrollü salım sistemlerinde istenilen ve hedeflenen bir özelliktir [414]. Bu amaçla misellerin in vitro ilaç salım özellikleri fizyolojik koşullar (pH 7,4) altında ve zayıf asidik ortamda (pH 6,5 ve pH 5,0) belirlendi ve sonuçlar aşağıdaki şekillerde verildi.

Blok, graft ve yıldız kopolimerlerden elde edilen miseller yapılarında bulunan poli(β-aminoester) grubundan dolayı pH duyarlı özellik gösterirler. Bu misellerin ilaç salım davranışları genel olarak incelendiğinde, polimerik misellere yüklenen etoposidin salım oranının ortamın pH değerinin değişiminden belirgin olarak etkilendiği görüldü. pH duyarlı özellik gösteren PBAE grubu fizyolojik koşullarda yani pH 7,4'de içerisinde ilaç molekülünü taşıyan sıkı bir misel yapısındadır ve ilaç salım oranı düşüktür. Zayıf asidik ortamda ise (pH 6,5) PBAE gruplarının iyonizasyonundan dolayı misel yapısı gevşek hale gelir ve ilaç salımı hızlanır. Ortamın pH değeri daha da düşürülürse (pH 5,0) polimerik misellerin ilaç salım oranları da yükselir. Bu artış, düşük pH değerlerinde PBAE bloğunun tersiyer amin gruplarının güçlü bir şekilde protonlanmasından dolayı meydana gelen daha gevşek misel yapısına bağlanabilir. Ayrıca, düşük pH değerlerinde PBAE bloğunun daha fazla iyonize olması misel yüzeyinin yük yoğunluğunu arttırır ve bu bloklar arasındaki artan elektrostatik itme kuvvetleri PBAE bloklarının şişmesine ve gevşek misel yapısına neden olur.

7 günlük bir süreçte gerçekleştirilen ilaç salım davranışlarından, ortamın pH değeri ne olursa olsun ilaç salımının 0-10 saat ve 10-168 saat olmak üzere 2 kısıma ayrıldığı görüldü. Tüm misel sistemleri için, ilk birkaç saatte ani bir salımın meydana geldiği ve bu salımın bir platodan geçerek yavaş yavaş arttığı veya sabit kaldığı gözlendi.

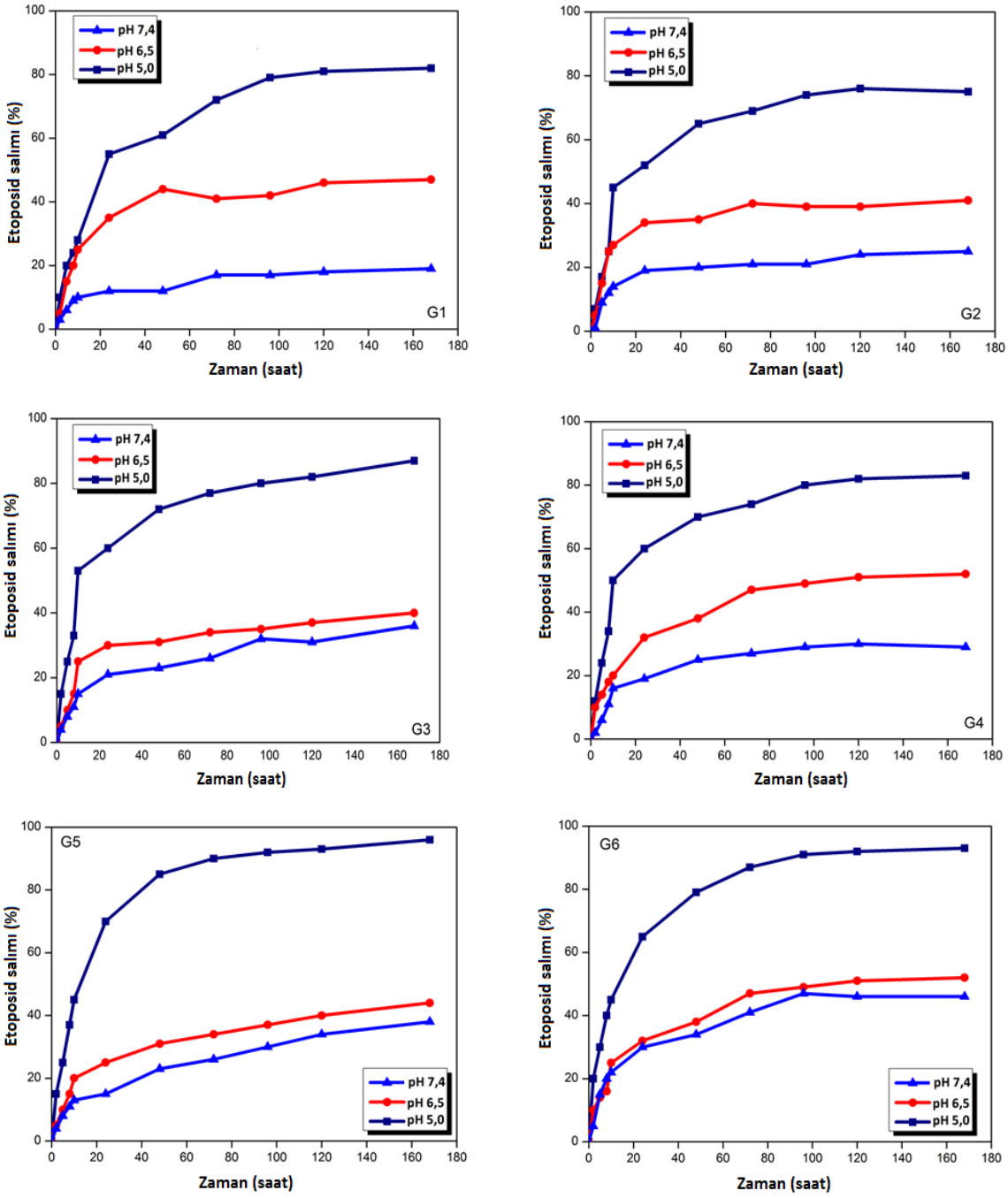


Şekil 4. 43 Etoposid yüklü triblok kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri

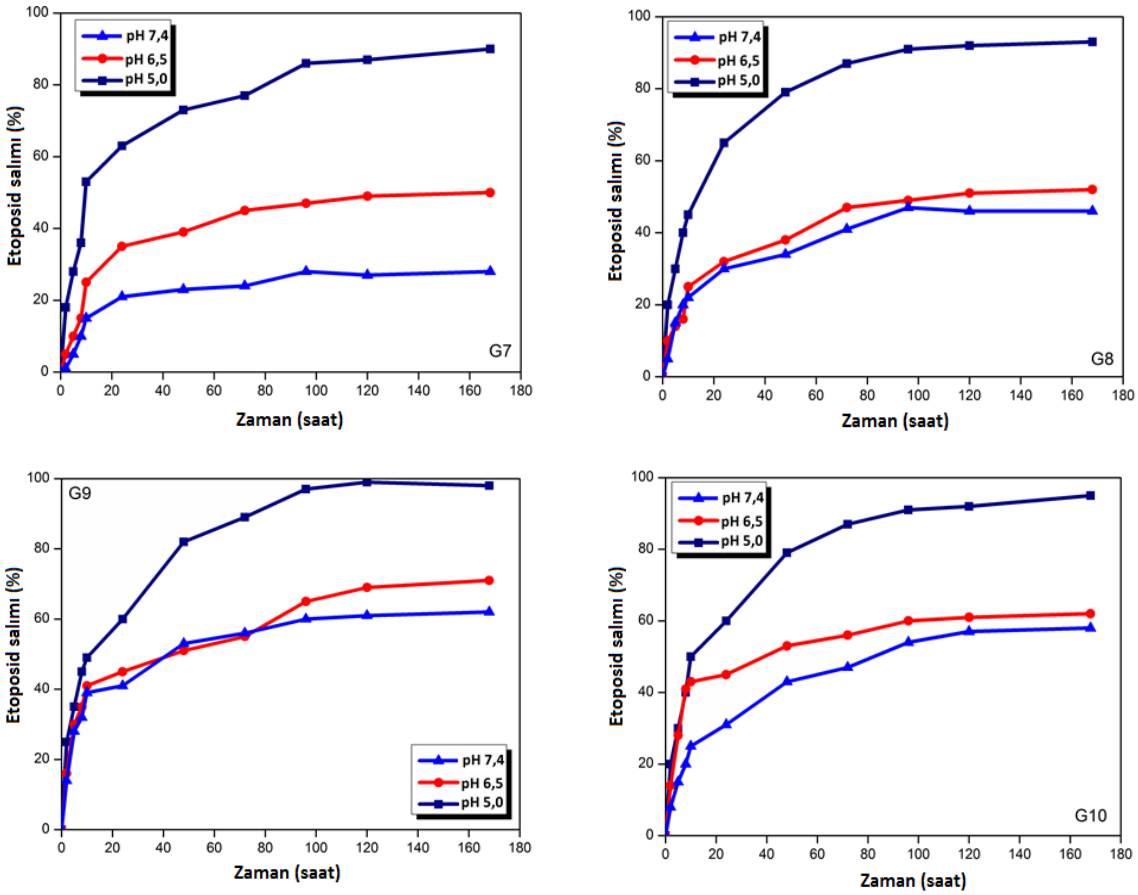


Şekil 4.43 Etoposid yüklü triblok kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri (devam)

Triblok kopolimer misellerin ilaç salım davranışlarına bakıldığında, ilk 10 saatte blok kopolimerler için pH 5,0'te ortalama % 80 civarında salım gözlenirken pH 7,4'te ortalama % 20 civarında salım gözlendi. Başlangıçtaki bu hızlı salım kabukta veya kabukla çekirdek arasındaki arayüzeye yerleşen ilaç moleküllerinden kaynaklanır. 10 saat sonunda ilaç salım hızının yavaşlayarak yaklaşık 100. saatten sonra dengeye geldiği gözlendi. Fizyolojik pH değerinde pH 7,4'de uzun PCL grubuna sahip B2 ve B4 nolu misellerin ilk 3 saatte içerdikleri ilacın % 10 ile % 11'ini saldıkları; kısa PCL grubuna sahip B7 ve B9 nolu örneklerin % 15 ile % 19 arasında salım yaptığı ve 168 saaat sonunda yapılarındaki ilacın yaklaşık % 20- 25'ini salabilikleri görüldü. pH değeri düşük olduğunda (pH 6,5), 168 saat sonra B2 ve B4 sistemlerin salım oranının % 55 ve % 59 olduğu, B7 ve B9 sistemlerin salım oranının ise % 70 ve % 68 olduğu görüldü.



Şekil 4. 44 Etoposid yüklü graft kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri



Şekil 4. 44 Etoposid yüklü graft kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri (devam)

Bu sonuçlar, triblok kopolimerlerin yapısında bulunan PCL grubunun ilaç salım davranışları üzerinde etkisi dolduğunu gösterdi. Uzun PCL zincirleri yüklenen etoposid ile daha güçlü hidrofobik etkileşimler oluşturacağı için misellerden etoposid salımını uzatmada güçlü bir etkiye sahiptir. Bundan dolayı bu sistemlerde daha yavaş ve uzun süreli bir salım gözlenir.

Graft kopolimerlerin etoposid salım özelliklerine bakıldığında genel olarak blok kopolimerlerden daha hızlı bir salım gösterdikleri görüldü. Bunun sebebi PBAE bloğunun hazırlanmasında kullanılan amin ve diakrilat bileşiklerinin hidrofilik karakteridir. Yapısında hidroksil grubu içeren amin bileşiği kullanılarak sentezlenen PBAE grupları PCL grubuyla graft edilirken tüm hidroksil gruplarına bağlanmadığından elde edilen graft kopolimerin yapısında kalan serbest hidroksil grupları yapıya

hidrofiliklik kazandırır. Ayrıca diakrilat bileşiklerinin yapısında bulunan etilen glikol gruplarıda hidrofilik karakterinden dolayı hızlı ilaç salım davranışı gösterir.

pH 7,4'de graft kopolimerlerden elde edilen tüm miseller sıkı yapıdadır ve ilaç salım hızları düşüktür. Örneğin G2 kopolimer miseli ilk 3 saatte %10 salım gösterirken 168 saat sonunda % 30 salım yaptığı görüldü. Buradan etoposidin miselin yoğun yapısından dolayı ani salım olmadığında yapısını koruduğu görüldü. Fizyolojik pH'daki bu düşük ilaç salım profili sağlıklı dokulardaki istenmeyen ilaç salımını en aza indirger. pH 6,5'e düştüğünde ilaç salımı hızlanarak 168 saat sonra % 77 salım gerçekleşirken pH 5,0'e düştüğünde ilaç salım hızı daha da yükselerek % 95 oldu. PBAE kısımlarının güçlü ptoronlanması misel yapısının gevşemesine ve daha yüksek oranda ilaç salınmasına neden oldu. Elde edilen veriler pH 7,0'de graft kopolimerlere yüklenen etoposid miktarının yaklaşık % 30-40'ının salındığını gösterdi.

Çözeltinin pH değeri 7,4'ten 5,0'e düştükçe, ilaç salım hızları önemli derecede hızlanır. Asidik pH, misellerden etoposid salımını başlatmak için güçlü bir etkiye sahiptir. pH 6,4'de ilaç yüklü miseller 6 saatte çok hızlı salım gösterdi ve ilacın % 66'sı hızlı bir şekilde misellerden salındı. Buna karşılık pH 5.0'de ilaç salım oranlarının çok yüksek olduğu belirlendi (B1-%95, B2-%77, B3-%86)

Blok kopolimerlerin ilaç salımı ilk 24 saatte hızlı bir şekilde gerçekleşti, pH 5,0'te % 32, pH 6,5'te % 27 pH 7,4'te % 21 ilaç salındı. Bu ani salım hidrofilik kabukta veya kabukla çekirdek arasındaki arayüzeyde bulunan ilacın salınmasına bağlanabilir. Bundan sonra salım hızı yavaşladı ve 7 gün sonra pH 5,0'te yaklaşık % 62, pH 6,5'te %51 ve pH 7,4'te % 40 salım gözlendi. Misel çekirdeğinin gevşek yapıda olması ilacın misellerden difüzyonunu kolaylaştırdığı için pH 5'teki salım hızı her zaman pH 7,4'ten daha hızlıdır.

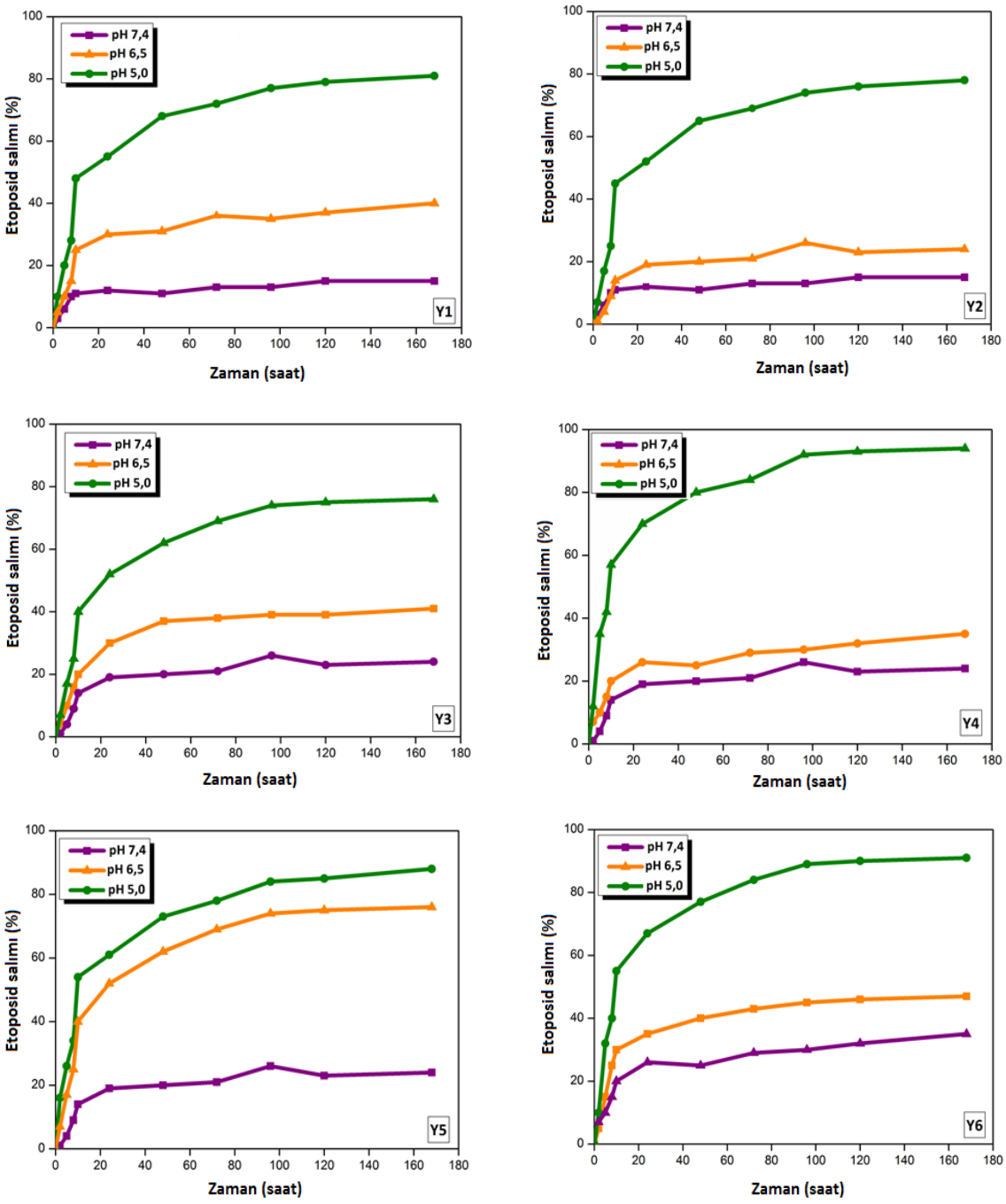
Kopolimerlerin yapısındaki PCL/PBAE oranı çok yüksek olduğunda yani PCL blokları daha uzunsa etoposid ağırlıklı olarak PCL katmanında tutulur. Fizyolojik koşullarda bu yapılardan önemli derecede salım gözlenmezken düşük pH'ta uzun süre tutulduğunda PCL'nin kütle erozyonuna uğramasından dolayı etoposidin etkili bir şekilde salımının kolaylaşdığı görüldü. pH 7,4'te ilaç salımının düşük, pH 6,5'te ise hızlı olmasının sebebi,

fizyolojik koşullar altında etoposid yüklü misellerin misel yapısını sürdürmesi fakat düşük pH değerlerinde kopolimerin çözünmesidir. Ayrıca, düşük molekül ağırlıklı PCL içeren kopolimerlerin çözünürlüğü PBAE bloğunun tersiyer amin gruplarının iyonlaşması ve deiyonlaşmasından kolaylıkla etkilenir [145].

Farklı pH değerlerinde yıldız kopolimer miseller diğer kopolimer misellerle benzer bir ilaç salım davranışı gösterdi. 6 farklı kopolimerin ilaç salım profilinden, başlangıçta ani salım gözlendiği ve 5 saatte etoposidin yaklaşık % 20-25'inin hızlı bir şekilde salındığı sonra da salımın 24 saatte bir platoya ulaşarak 168 saat sonuna kadar çok değişmeden kaldığı görüldü. Bu polimerik misellerin önce belirli miktarda salım yaparak kandaki gerekli etkin madde düzeyini sağladığını ve sonra sürekli belirli bir oranda salım yaparak bu düzeyin aynı kalmasını sağladığını gösterir.

Yıldız kopolimerlerin ilaç salım davranışı incelendiğinde, Y4, Y5 ve Y6 kopolimerlerinin pH 7,4'te 168 saat sonunda sırasıyla %25, %27 ve %31 salım gösterdikleri, pH değeri 6,5 olduğunda ise salım oranının hızla artarak Y4 %95, Y5-%77 ve Y6-%86 olduğu belirlendi. Aynı koşullarda, Y1, Y2 ve Y3 kopolimerleri ise pH 7,4'te 168 saat sonunda Y1 %15, Y2-%21 ve Y3-%17 salım gösterirken, pH değeri 6,5 olduğunda salım oranı hızla artarak Y4 %82, Y5-%67 ve Y6-%79 oldu. Bu sonuçlardan PEGDA bileşiği kullanılarak sentezlenen Y4, Y5 ve Y6 yıldız kopolimerlerinin diğerlerine göre daha hızlı ilaç salım davranışı gösterdiği görüldü.

Ayrıca kopolimer yapısındaki [ε-CL]:[OH] oranının artması yapıdak PCL bloklarının uzunluğunu arttıracağı için, en hidrofobik olan yapı Y3 kopolimeridir ve yavaş ilaç salım davranışı gösterdiği görüldü. PCL oranı en düşük olan ve PEGDA içeren Y4 kopolimerinde ise en hızlı ilaç salımı gözlendi. İlaç salım davranışları en yavaştan hızlıya doğru sıralandığında Y3 < Y2 < Y1 < Y6 < Y5 < Y4 olduğu görülür.



Şekil 4. 45 Etoposid yüklü yıldız kopolimer misellerin pH 5,0; 6,5 ve 7,4 tampon çözeltilerinden in vitro ilaç salım grafikleri

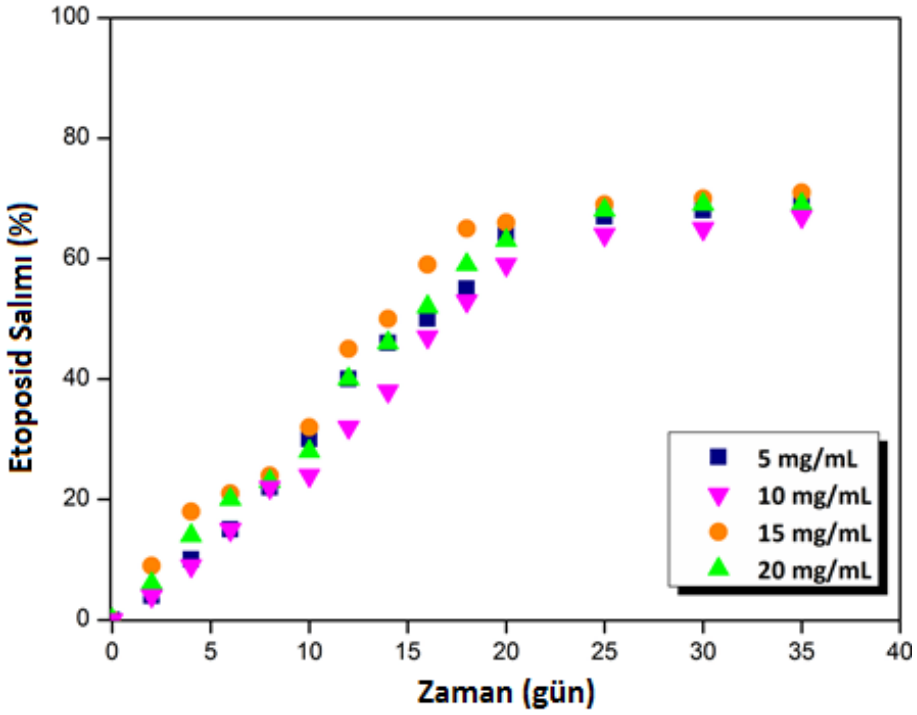
Genel bir sonuç olarak, etoposid salım profilinde ortamın pH değerinin ve kopolimerlerin PCL/PBAE oranının önemli bir rolü olduğu görüldü. pH 7,4'te ilacı çok iyi koruyan sıkı haldeki misel yapısı düşük pH'da PBAE gruplarının iyonlaşmasından dolayı

gevşek hale geldi ve ilaç salımını hızlandırdı. Bu asidik pH hedefli ilaç salım davranışının etoposidin terapötik etkinliğinin kan dolaşımı sırasında korunmasını ve hedef kanser dokusuna başarılı bir şekilde taşınarak hızlı salımını sağlayacağı düşünüldü. Elde edilen tüm sonuçlar göz önüne alındığında hidrofobik PCL ve farklı pH duyarlı PBAE gruplarını içeren kopolimer yapıların etoposidin ani salımını sınırlandırarak yavaş bir salım davranışı gösterdiği görüldü.

4.7.2 Jellerden In Vitro Etoposid Salımı

Sol-jel faz geçiş özelliği gösteren kopolimerlerin etoposid salım davranışlarını belirlemek için, vücut içi sıcaklıkta (37˚C) ve fizyolojik pH'da (pH 7,4) in vitro etoposid salım çalışmaları yapıldı. Jellere ilaç yükleme çalışmaları tüm kopolimer yapıları için jel oluşumunun gözlendiği % 25 kopolimer konsantrasyonunda yapıldı. % 25 konsantrasyonda hazırlanan B1 kopolimerine 5, 10, 15 ve 20 mg/mL etoposid yüklendikten sonra yapılan salım çalışmalarına ait sonuçlar Şekil 4.46'da verildi. Farklı miktarlarda etoposid içeren B1 kopolimer jelinin etoposid salım profilleri arasında önemli bir farklılık gözlenmedi. Bundan dolayı bundan sonraki salım çalışmalarına 10 mg/mL etoposid kullanılarak devam edildi.

Şekil 4.47, Şekil 4.48 ve Şekil 4.49'de verilen grafikler incelendiğinde farklı yapılardaki kopolimer jellerden etoposid salımının iki farklı kademede gerçekleştiği görüldü. Salımın başladığı ilk 20 günde ilaç molekülünün büyük bir kısmı hızlı bir şekilde salınırken, sonraki 15 günde salımın yavaşladığı ve neredeyse artık salımın olmadığı görüldü. Kopolimerlerin jel oluşturması sırasında ilaç molekülü sadece jelin hidrofobik bölgelerine değil hidrofilik kısımlarına da yerleşir. Jel salım ortamına girdiğinde hidrofilik blokların hareketi ile bu kısımlarda bulunan ilacın hemen salınması başlangıçta görülen yüksek salım hızına neden olur. Ayrıca biyolojik olarak bozunabilen jellerden etoposidin salımı sadece ilacın difüzyonu ile gerçekleşmez aynı zamanda jelin parçalanması da ilaç salımını etkiler [170].



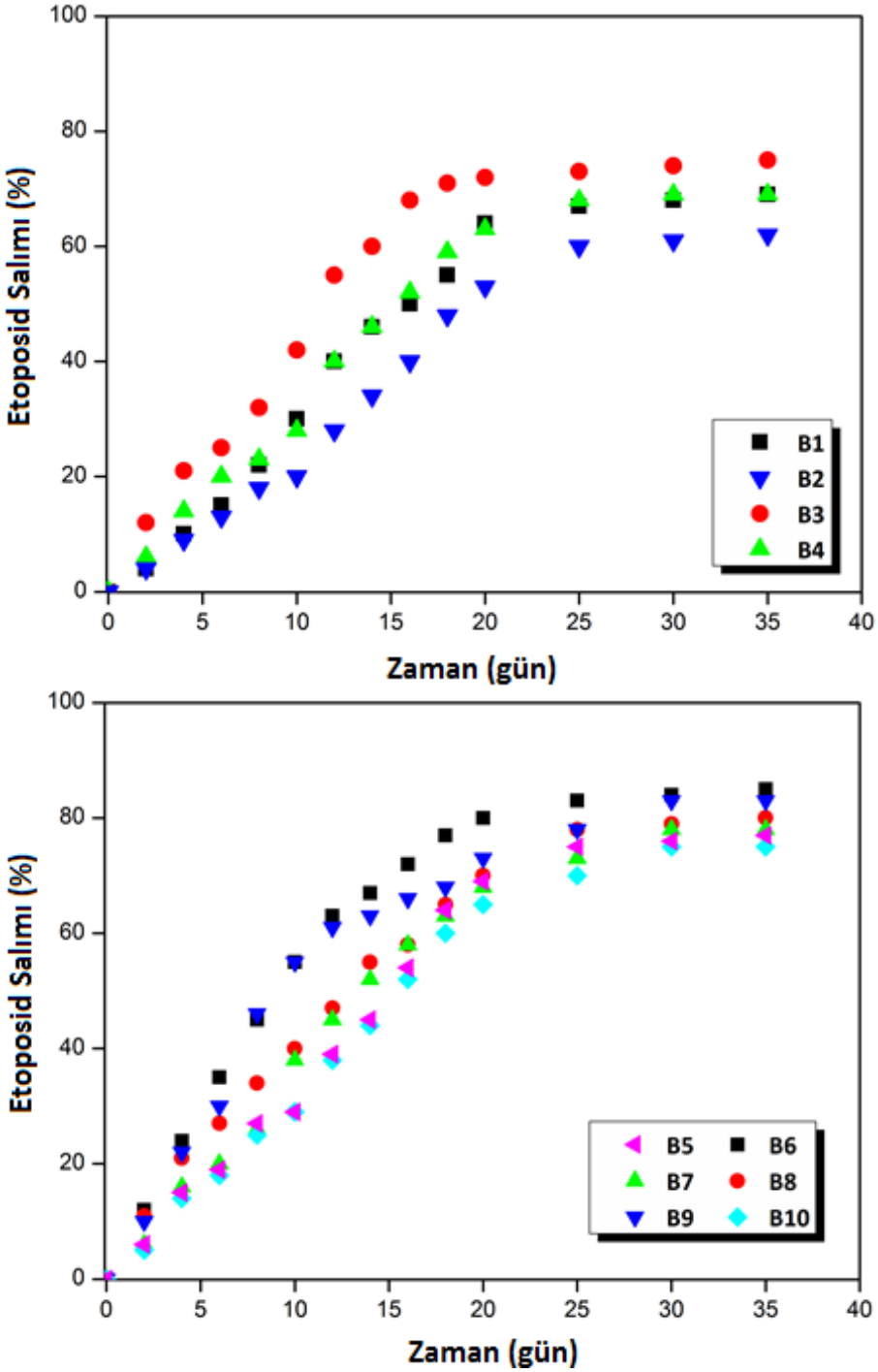
Şekil 4. 46 Farklı miktarlarda etoposid içeren B1 kopolimer jellerinden in vitro etoposid salımı

Şekil 4.47'de amfifilik triblok kopolimer jellerden salınan etoposid miktarları % salım cinsinden verildi. Şekildeki grafiklerden de görüldüğü gibi jellerden etoposid salımı ilk 20 günde çok hızlı gerçekleşip yüklenen ilacın büyük bir kısmı salınmakta ve ardından salım hızı yavaşlamaktadır. Bu blok kopolimer jellerin uzun süreli sürekli etoposid salımında önemli bir rol oynadığını gösterir. Ayrıca bu kopolimerlerin etoposid salım grafikleri incelendiğinde, yapılarına yüklenen ilacın yaklaşık % 62 - % 85'ini 35 günlük bir periyotta saldıkları görüldü. Jel oluşumu sırasında yüklenen etoposidin tamamının salınmamasının sebebi hidrofobik PCL ve PBAE bloklarının neden olduğu güçlü hidrofobik etkileşimlerdir.

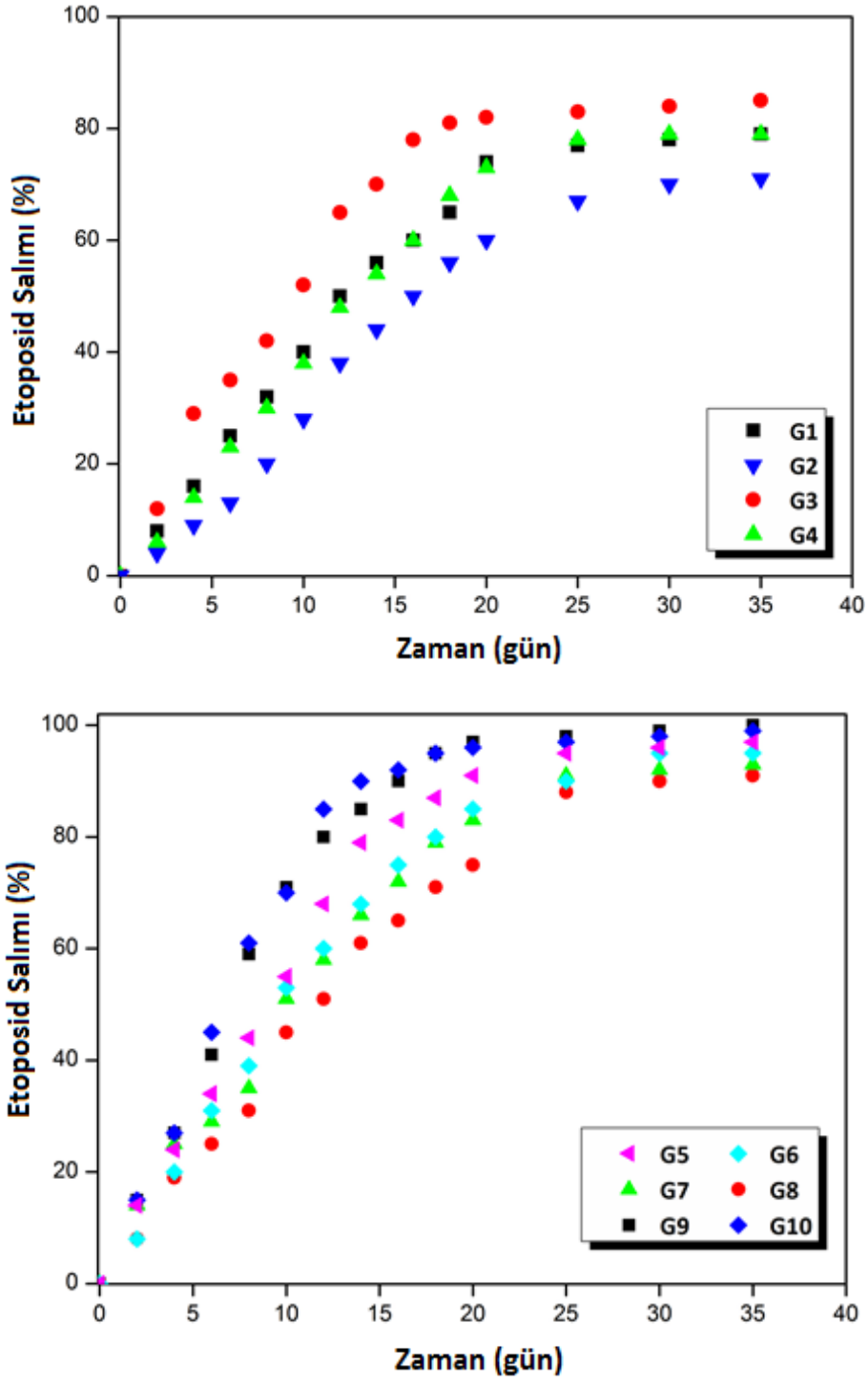
PBAE grubunun hidrofobikliğe katkısı arttıkça misel ve nanotanecik çekirdeğine yüklenen etoposid miktar da artar. Çünkü hidrofobik yapıdaki ilacın etkileşim gösterip tutunabileceği hidrofobik çekirdek daha büyüktür. Çekirdek daha büyük olduğu için ilaç tutma kapasitesi de artacaktır. Genel olarak hidrofobik karakterin baskın olduğu jellerde ilacın daha uzun sürede salındığı görüldü. Örneğin, uzun PCL bloğu ve kısa

mPEG zincirine sahip B2 kopolimer jeline yüklenen ilacın % 62'si salınırken, daha kısa PCL zinciri ve uzun mPEG bloğu içeren B3 jelinden salınan ilaç miktarı % 75'tir. Hidrofobiklik derecesi birbirine yakın olan B1 ve B4 kopolimerlerinin 35 günlük salım sürecinde % 69 etoposid salımı gösterdiği görüldü. 35 gün sonunda B5 (% 83), B6 (% 75), B7 (% 80), B8 (% 78), B9 (%77) ve B10 (%85) kopolimer jellerinin etoposid salım oranlarının birbirine çok yakın oldukları gözlendi.

Şekil 4.48'de graft kopolimerlerden hazırlanan jellerin zamana karşı in vitro ortamda etoposid salım yüzdeleri verildi. Verilen grafikler incelendiğinde, PBAE1 grubuna sahip G1, G2, G3 ve G4 graft kopolimer jellerinin etoposid salım oranlarının sırasıyla % 85, % 79, % 79 ve % 71 olduğu görüldü. Aynı PCL blok uzunluğuna sahip G1, G3 ve G2, G4 jellerinin salım oranlarının farklı olmasının sebebi, G3 ve G4 jelinin daha uzun mPEG bloğuna sahip olmasından dolayı hidrofilik karakterinin daha yüksek olmasıdır. G5, G6, G7, G8, G9 ve G10 jellerinin ilk 15 gün içerisindeki etoposid salım davranışları incelendiğinde, sırasıyla % 83, % 75, % 72, % 65, %90 ve % 92 oranında salım gösterdikleri görüldü. Test edilen 35 günlük zaman aralığında G10 ve G9 graft kopolimer jellerine yüklenen etoposidin tamamı salınırken G5, G6, G7 ve G8 jellerinden salınan etoposid yüzdesinin sırasıyla % 97, % 95, % 93 ve % 91 olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlardan graft kopolimerlerin hidrofilik karakteri arttıkça ilaç salım oranlarının da arttığı görüldü. Ayrıca aynı PBAE grubuna sahip kopolimerlerden PCL bloğu uzun olanının sahip olduğu yüksek hidrofobik karakterden dolayı etoposid ile daha güçlü hidrofobik bağlar oluşturduğundan ilaç daha geç salınır.



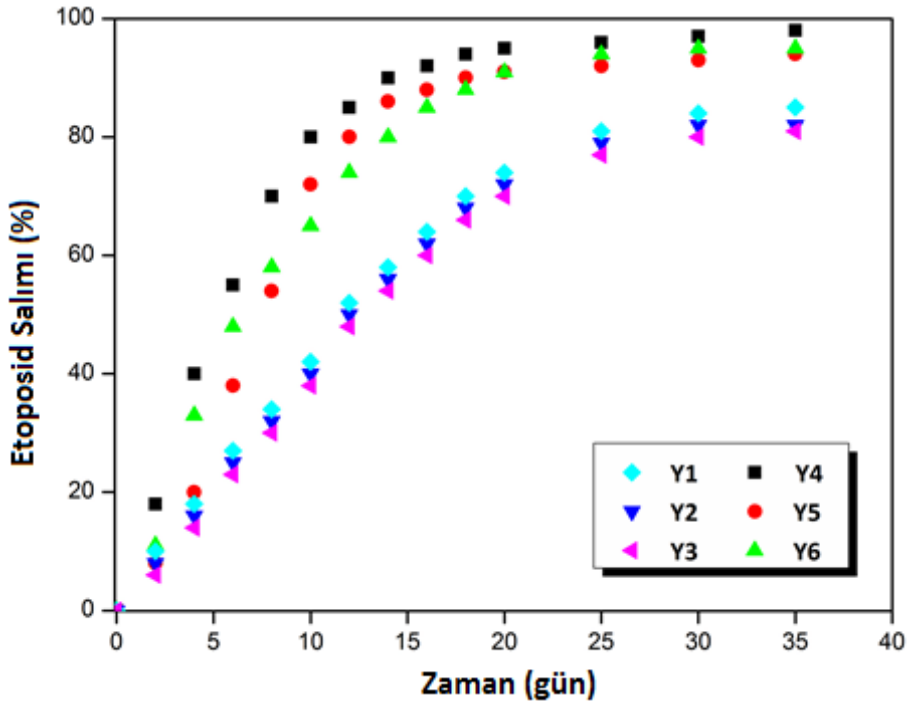
Şekil 4. 47 Amfifilik triblok kopolimerlerden hazırlanan jellerin in vitro etoposid salım grafikleri



Şekil 4. 48 Amfifilik graft kopolimerlerden hazırlanan jellerin in vitro etoposid salım grafikleri

Yıldız kopolimerlerden elde edilen jellerin salım grafikleri incelendiğinde Y1, Y2 ve Y3 yıldız kopolimer jellerinden yaklaşık 25. günde, Y4, Y5 ve Y6 yıldız kopolimer jellerinden ise 20. günde etoposid salımının dengeye ulaştığı görüldü. Y1 jelinden salım yaklaşık % 85, Y2 jelinden salım yaklaşık % 82 ve Y3 jelinden salım yaklaşık % 81'dir. PBAE bloğunda PEGDA bileşiğini içerdiğinden dolayı hidrofilik karakteri yüksek olan Y4, Y5 ve Y6 kopolimerlerinin sırasıyla % 98, % 94 ve % 95 olmak üzere daha yüksek oranda etoposid salımı gösterdikleri görüldü.

Sol-jel faz geçiş özelliği gösteren kopolimerlerin in vitro salım çalışmaları elde edilen jel yapılarının fizyolojik koşullar altında etoposidin kontrollü salımını sağladığını ve etoposidin 35 günlük süre boyunca jellerden sürekli bir şekilde salındığını gösterdi. Elde edilen sonuçlar kopolimer jellerin uzun süreli sürekli salımın istendiği uygulamalarda kullanılabilme potansiyeli olduğunu gösterir.



Şekil 4. 49 PEO kaplı yıldız kopolimerlerden hazırlanan jellerin in vitro etoposid salım grafiği

4.8 Genel Değerlendirme ve Öneriler

- ✓ Sunulan tez çalışmasında, ilk olarak biyobozunur özellikte, pH ve sıcaklık duyarlı mPEG-b-PCL-b-PBAE triblok kopolimerleri, PBAE-g-PCL-b-mPEG graft kopolimerleri ve PEO kaplı 4 kollu PCL-b-PBAE yıldız kopolimerleri olmak üzere 3 farklı yapıda amfifilik kopolimer sentezlendi. Bu kopolimerlerin yapıları, bileşimleri, molekül ağırlıkları ve polidispersiteleri FTIR, ^{1}H-NMR ve GPC kullanılarak karakterize edildi. Bu kopolimerlerin FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumlarında mPEG, PCL ve farklı yapıdaki PBAE gruplarına ait tüm pikler gözlendi ve bu yapıların başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlandı. PEO ile kaplanan yıldız kopolimerlerin yüzey analizi XPS ile yapıldı ve C1s spektrumunun eter (-C-O-) sinyalindeki artış Pluronik'in PEO zincirlerinin nanotanecik yüzeyine etkili bir şekilde bağlandığını doğruladı.
- ✓ Farklı yapılarda sentezlenen kopolimerlerin sahip oldukları pH duyarlı blokların asit baz titrasyon yöntemi ile pH tamponlama özellikleri belirlendi. Üç farklı yapıya sahip kopolimerlerin pK_b değerleri; blok kopolimerler için 5,7-6,8 arasında; graft kopolimerler için 6,6-7,2 arasında ve yıldız kopolimerler için 5,7-6,2 olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar, monomerlerin alkil gruplarını ve hidrofilikliğini değiştirerek kopolimerlerin pK_b değerlerinin ayarlanabileceğini gösterdi.
- ✓ Triblok ve graft kopolimerlerin misel oluşturabilme özelliklerini belirlemek amacıyla CMC değerleri belirlendi. Kopolimerlerin hepsi hidrofilik-hidrofobik denge açısından çok farklı yapılara sahip olmadıkları için yakın CMC değerleri elde edildi. Lineer yapıdaki blok kopolimerlerin CMC değerlerinin (0,001-0,038 arasında) dallanmış yapıdaki graft kopolimerlerin CMC değerlerinden (0,009-0,068 aralığında) daha düşük olması dallanmış yapının misel oluşumunu güçleştirdiğini gösterdi. Elde edilen düşük CMC değerleri, vücutta sistemik dolaşım sırasında karşılaşılan büyük hacim artışının neden olduğu aşırı

seyrelmeden sonra bile blok kopolimerlerden oluşan misellerin çözelti içinde iyi bir denge sağlayacağını gösterdi.

- ✓ Yapılan tanecik boyutu ölçümlerinden, blok kopolimerlerin misel boyutunun 60 nm ile 92 nm arasında, graft kopolimerlerin misel boyutunun 95 nm ile 121 nm arasında ve yıldız kopolimerlerin tanecik boyutunun 110 nm ile 160 nm arasında olduğu saptandı. Dallanmış yapıdaki graft kopolimerlerin oluşturduğu misellerin ve 4 kollu yıldız kopolimerlerin oluşturduğu nanotaneciklerin boyutlarının doğrusal yapıdaki triblok kopolimerlere göre daha yüksek olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlardan misel boyutu üzerinde kopolimerin düz zincirli ve dallanmış yapısının etkili olduğu görüldü. Sentezlenen kopolimerlerden elde edilen misel ve nanotaneciklere etoposid yüklenmesi ile tanecik boyutunun yaklaşık iki katına çıktığı saptandı. Polidispersite değerlerine bakıldığında ise boyut dağılımının dar olduğu ancak dallanmış yapının kopolimerlerin PDI değerlerini genellikle arttırdığı saptandı. Yapılan ölçümler sonucu ortalama büyüklüğü 160 nm'nin altında bulunan nanotaneciklerin, sahip olduğu küçük tanecik boyutları nedeni ile etkin bir şekilde tümör dokusuna hedeflendirilmeye uygun olacağı düşünülmektedir.
- ✓ Elde edilen tüm zeta potansiyeli değerlerinden, blok ve yıldız kopolimerlerdeki pozitif yüklenmenin bu kopolimerlerin PBAE bloğunun sentezinde iki –NH grubuna sahip diamin bileşiklerinin kullanılmasından dolayı daha fazla olduğu görüldü. Bu kopolimerlerin pH 5,5 ve pH 7,0 aralığında yani hücre dışı ortamda zeta potansiyellerinin pozitif değerde olması bu kopolimerlerin sahip oldukları pozitif yükten dolayı kanserli hücreler tarafından hücresel alımının artmasını sağlar.
- ✓ Polimerik misellerin ve nanotaneciklerin morfolojisi SEM ile belirlendi. Triblok kopolimerlerin küresel ve boyutları 40-200 nm arasında değişen genellikle polidispers miseller oluşturdukları görüldü. Graft kopolimerlerde ise morfolojinin epeyce değiştiği ve genellikle tam olarak küresel özellik

göstermeyen yapıların gözlendiği söylenebilir. Yıldız kopolimer taneciklerin SEM görüntülerinde blok ve graft kopolimerlerde gözlenen düzgün şekilli taneciklerin yanı sıra küresel ya da küresele yakın şekilsiz taneciklerin mevcut olduğu görüldü.

- ✓ Fosfat tampon çözeltisinde fizyolojik koşullarda gerçekleştirilen biyobozunurluk deneylerinde kopolimer yapıların yaklaşık % 50'sinin 2-3 gün içerisinde hidrolitik olarak bozunduğu görüldü.
- ✓ Kopolimerlerin farklı sıcaklık ve pH değerlerinde sol-jel faz geçiş özellikleri tüp ters çevirme yöntemi ile incelendi. Kopolimerlerin blok uzunlukları ayarlanarak kopolimer çözeltisinin oda sıcaklığında enjekte edilebilmesi, fizyolojik koşullarda ise jel oluşturabilmesi için gereken koşullar belirlendi. % 25 kopolimer konsantrasyonunda sentezlenen tüm kopolimerlerin jel oluşturabildikleri görüldü.
- ✓ Çalışmamızda, etkin madde olarak oral biyoyararlanımı düşük ve oldukça hidrofobik bir antikanser ilacı olan etoposid kullanıldı. Etoposidin polimerik misellere ve jellere yüklenme kapasitesi araştırıldı ve polimerik misellerin % enkapsülasyon etkinliğinin yaklaşık % 50 olduğu bulundu.
- ✓ Hazırlanan etoposid yüklü polimerik misellerin ve nanotaneciklerin enkapsülasyon etkinliğinin % 10,43 ile % 58,41 arasında değişkenlik gösterdiği yükleme kapasitesinin ise % 3,47-11,49 arasında değiştiği saptandı. Tüm sonuçlar incelendiğinde etoposidin misellere başarılı bir şekilde yüklendiği ve en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olanın ise B2 kopolimerinden hazırlanan miseller olduğu belirlendi. Farklı oranlarda etoposid yüklü misel ve nanotaneciklerin % enkapsülasyon etkinlikleri karşılaştırıldığında en yüksek değerin 10 mg/mL etoposid yüklü örneklerde bulunmasından dolayı, optimum etoposid yükleme içeriği 10 mg/mL olarak bulundu ve bundan sonraki etoposid salım çalışmalarında bu değer kullanıldı.

- ✓ Polimerik misel ve nanotaneciklerden etoposidin in vitro salım çalışmaları asidik pH (5,0 ve 6,5) ve fizyolojik pH (7,4) değerlerine sahip üç farklı fosfat tampon çözelti ortamında yapıldı ve etoposid salımının yaklaşık 168 saatte denge değerine ulaştığı bulundu. Hemen hemen bütün yapılarda 100 saat sonunda salınan etoposid miktarının ise % 80 ile % 100 arasında olduğu görüldü. Hidrofilik karakteri daha yüksek olan graft kopolimerlerin genel olarak blok kopolimerlerden daha hızlı etoposid salımı gösterdikleri görüldü.
- ✓ Jellere ilaç yükleme çalışmaları tüm kopolimer yapıları için jel oluşumunun gözlendiği % 25 kopolimer konsantrasyonunda yapıldı. Sol-jel faz geçiş özelliği gösteren kopolimerlerin in vitro salım çalışmaları pH 7,4'de incelendi ve jel yapılarının fizyolojik koşullar altında etoposidin kontrollü salımını sağladığı ve etoposidin 35 günlük süre boyunca jellerden sürekli bir şekilde salındığı gösterildi. Elde edilen sonuçlar kopolimer jellerin uzun süreli sürekli salımın istendiği uygulamalarda kullanılabilme potansiyeli olduğunu gösterir.
- ✓ Yapılan çalışmada farklı tipteki biyobozunur polimerik taşıyıcılar ilaç salımındaki etkinlikleri yönünden bir taramaya tabi tutuldu. Bu çalışma ile suda çözünmeyen, toksik olan ve çoğunlukla akciğer kanseri tedavisinde yaygın kullanımı olan etoposid için yeni polimerik taşıyıcılar geliştirildi ve in vitro ilaç salım davranışları belirlendi.
- ✓ Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak sentezlenen amfifilik kopolimer yapılarının hem oral kontrollü ilaç salımında hem de fizyolojik koşullarda enjekte edilebilir sistemler olmak üzere iki farklı taşıyıcı olarak kullanılabilme potansiyelleri belirlendi.
- ✓ Kısa süreli ilaç salımının istendiği uygulamalarda kopolimerlerin polimerik misel veya nanotanecik şeklinde uygulanabileceği, uzun süreli salım gereken uygulamalarda ise kopolimerlerin jel formlarının kullanılabileceği görüldü.

- ✓ Ayrıca, tez çalışmasında sentezlenen kopolimerlerin yalnız bu çalışmada kullanılan antikanser madde olan etoposid için değil, başta antikanser özellik gösteren hidrofobik ekin maddeler olmak üzere farklı pek çok bileşik için de uygun bir sistem olabileceği düşünülmektedir.

[1] Jain, K.K., (2008). Drug Delivery Systems, First Edition, Humana Press, USA.

[2] Chien, Y.W., (1992). Novel Drug Delivery Systems, Second Edition, Taylor& Francis, New York.

[3] Gürsoy, A., (2014). Kontrollü Salım Sistemleri, 2. Baskı, Aktif Matbaa, İstanbul.

[4] Sood, A. ve Panchangnula, R. (2003). "Design of Controlled Release Delivery Systems Using a Modified Pharmacokinetic Approach: A Case Study For Drugs Having A Short Elimination Half-life and Narrow Therapeutic Index, International Journal of Pharmaceutics, 261: 27-41.

[5] Singh, A., Iyer, A.K., Amiji, M. (2013). Multifunctional Nanosystems for Cancer Therapy Biomaterials for Cancer Therapeutics: Diagnosis, Prevention and Therapy, Woodhead Publishing, USA.

[6] Du, J., Tang, L.Y., Song W.J., Shi Y., Wang, J. (2009). "Evaluation of Polymeric Micelles From Brush Polymer with Poly(ε-caprolactone)-b-Poly(ethylene glycol) Side Chains as Drug Carrier", Biomacromolecules, 10: 2169-2174.

[7] Chen, J., Ouyang, J., Kong, J., Zhong, W., Xing, M.M. (2013). "Photo-cross-linked and pH-Sensitive Biodegradable Micelles for Doxorubicin Delivery", Applied Materials&Interfaces, 5: 3108-3117.

[8] Ko, J., Park, K., Kim, Y.S., Kim, M.S., Han, J.K., Kim, K., Park, R.W., Kim, I.S., Song, H.K., Lee, D.S., Kwon, I.C. (2007). "Tumoral Acidic Extracellular pH Targeting of pH-Responsive MPEG-Poly(β-amino ester) Block Copolymer Micelles for Cancer Therapy", Journal of Controlled Release, 123: 109-115.

[9] Jones, M.C. ve Leroux, J.C. (1999). "Polymeric Micelles-A New Generation of Colloidal Drug Carriers", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 48: 101-111.

[10] Agrawal, S.K., Sanabria-Delong, N., Coburn, J.M., Tew, G.N., Bhatia, S.R. (2006). "Novel Drug Release Profiles from Micellar Solutions of PLA-PEO-PLA Triblock Copolymers", Journal of Controlled Release, 112: 64-71.

[11] Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., Amiji M. (2008). “A Review of Stimuli-Responsive Nanocarriers for Drug and Gene Delivery, Journal of Controlled Release, 126: 187-204.

[12] Gohy, J.F. (2005). “Block Copolymer Micelles Advances in Polymer Science”, 190: 65-136.

[13] Riess, G. (2003). “Micellization of Block Copolymers”, Progress in Polymer Science, 28: 1107-1170.

[14] Tang, Y., Liu, S.Y., Armes, S.P., Billingham, N.C. (2003). “Solubilization and Controlled Release of a Hydrofobic Drug Using Novel Micelle-Forming ABC Triblock Copolymers”, Biomacromolecules, 6(4): 1636-1645.

[15] Overstreet, D.J., Mclemore, R.Y., Doan, B.D., Farag, A., Vernon, B.L. (2013). “Temperature-Responsive Graft Copolymer Hydrogels for Controlled Swelling and Drug Delivery”, Soft Materials, 11: 294-304.

[16] Nguyen, M.K. ve Lee, D.S. (2010). “Injectable Biodegradable Hydrogels”, Macromolecular Bioscience, 10: 563-579.

[17] Peppas, L.B. (1997). “Polymers in Controlled Drug Delivery”, Medicinal Plastics and Biomaterials, 4: 34-44.

[18] Weia, X.W., Gonga, C.Y., Goua, M., Fua, S., Guoa, Q., Shia, S., Luoa, F., Guoa, G., Qiub, L., Qiana, Z.Y. (2009). “Biodegradable Poly(ε-caprolactone)–Poly(ethylene glycol) Copolymers as Drug Delivery System”, International Journal of Pharmaceutics 381: 1-18.

[19] Kim, M.S. ve Lee, D.S. (2010). “In Vitro Degradability and Stability of Hydrophobically Modified pH-Sensitive Micelles Using MPEG-Grafted Poly(β-amino ester) for Efficient Encapsulation of Paclitaxel”, Journal of Applied Polymer Science, 118: 3431-3438.

[20] Shuaia, X., Aia, H., Nasongklab, N., Kima, S., Gaoa, J. (2004). “ Micellar Carriers Based on Block Copolymers of Poly(ε-caprolactone) and Poly(ethylene glycol) for Doxorubicin Delivery”, Journal of Controlled Release, 98: 415-426.

[21] Otsuka, H., Nagasaki, Y., Kataoka, K. (2003). “PEGylated Nanoparticles for Biological and Pharmaceutical Applications”, Advanced Drug Delivery Reviews, 55: 403-419.

[22] Woodruff, M.A. ve Hutmacher, D.W. (2010). “The Return of a Forgotten Polymer-Polycaprolactone in the 21st Century Progress in Polymer Science, 35: 1217-1256.

[23] Lynn, D.M. ve Robert Langer, R. (2000). “Degradable Poly(β-amino esters): Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA”, Journal of American Chemical Society, 122: 10761-10768.

[24] Min, K.H., Kim, J.H., Bae, S.M., Shin, H., Kim, S., Park, S., Lee, H., Park R.W., In-San Kim, I.S., Kim, K., Kwon, I.C., Jeong, S.Y., Lee, D.S. (2010). "Tumoral Acidic PH-Responsive MPEG-poly(β-amino ester) Polymeric Micelles for Cancer Targeting Therapy", Journal of Controlled Release, 144: 259-266.

[25] Montecucco, A. Ve Biamonti, G. (2007). "Cellular Response to Etoposide Treatment", Cancer Letters, 252: 9-18.

[26] Park, K. (2014). "Controlled Drug Delivery Systems: Past Forward and Future Back", Journal of Controlled Release, 190: 3-8.

[27] Biondi, M., Francesca, U., Quaglia, F., Netti, P.A. (2008). "Controlled Drug Delivery in Tissue Engineering", Advanced Drug Delivery Reviews, 60: 229-242.

[28] Robinson, J. ve Lee, V.H.L. (1987). Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications, Second Edition, CRC Press USA.

[29] Kim, S., Kim, J.H., Jeon, O., Kwon, I.C., Park, K. (2009). "Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 71: 420-430.

[30] Siepmann, J., Siegel, R.A., Rathbone M.J. (2012). Overview of Controlled Release Mechanisms, Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery, Springer, USA.

[31] Nair, L.S. ve Laurencin, C.T. (2007). "Biodegradable Polymers as Biomaterials", Progress in Polymer Science, 32: 762-798.

[32] Kishida, A., Ikada, Y., Dumitriu, S. (2001). Polymeric Biomaterials, Second Edition, Dekker, New York.

[33] Lloyd, AW. (2002). "Interfacial Bioengineering to Enhance Surface Biocompatibility". Medicinal Device Technology, 13: 18-21.

[34] Li, S. (1999). "Hydrolytic Degradation Characteristics of Aliphatic Polyesters Derived from Lactic and Glycolic Acids." Journal of Biomedical Materials Research, 48: 342-53.

[35] Laouini, A., Maalej, C.J., Blouza, I.L., Sfar, S., Charcosset, C., Fessi, H. (2012). "Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art", Journal of Colloid Science and Biotechnology, 1: 147-168.

[36] Laouini, A., Maalej, C.J., Sfar S., Charcosset C., Fessi H. (2011). "Liposome Preparation Using a Hollow Fiber Membrane Contactor-Application to Spironolactone Encapsulation", International Journal of Pharmaceutics, 415: 53-61.

[37] Fang, J.Y., Hong, C.T., Chiu, W.T., Wang, Y.Y. (2001). "Effect of Niosomes and Liposomes on Skin Permeation of Enoxacin", International Journal of Pharmaceutics, 219: 61-72.

[38] Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H. (2011). “The EPR Effect: Unique Features of Tumor Blood Vessels for Drug Delivery, Factors Involved, and Limitations and Augmentation of The Effect”, Advanced Drug Delivery Reviews, 63: 136-151.

[39] Torchilin, V. (2011). “Tumor Delivery of Macromolecular Drugs Based on The EPR Effect”, Advanced Drug Delivery Reviews, 63: 131-135.

[40] Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S. (2004). “Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs”, International Journal of Pharmaceutics, 274: 1-33.

[41] Şahin, S., Selek, H., Ponchel, G., Ercan, M.T., Sargon, M., Hincal, A.A., Kas, H.S. (2002). “Preparation, Characterization and In Vivo Distribution of Terbutaline Sulfate Loaded Albumin Microspheres”, Journal of Controlled Release, 82: 345-358.

[42] Narayani, R. ve Rao, K.P. (1995). “pH Responsive Gelatin Microspheres for The Oral Delivery of Anticancer Drug Methotrexate”, Journal of Applied Polymer Science, 58(10): 1761-1769.

[43] Freiberg, S. ve Zhu, X.X. (2004). “Polymer Microspheres for Controlled Drug Release”, International Journal of Pharmaceutics, 282(1-2): 1-18.

[44] Park, S.J., Lee, Y.M., Hong, S.K. (2006). “Release Behaviors of Porous Poly(Butylene Succinate)/Poly(-Caprolactone) Microcapsules Containing Indomethacin”, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 47: 211-215.

[45] Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P. (2008). “Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery”, Advanced Drug Delivery Reviews, 60: 1638-1649.

[46] De Jong, W.H. ve Borm, P.J. (2008). “Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards”, International Journal of Nanomedicine, 3: 133-149.

[47] Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C. (2010). “Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems”, Colloids Surface B:Biointerfaces, 75: 1-18.

[48] Hillaireau, H. ve Couvreur, P. (2009). “Nanocarriers Entry into The Cell: Releva nce to Drug Delivery”, Cellular and Molecular Life Sciences, 66: 2873-2896.

[49] Chen, H.B., Khemtong, C., Yang, X.L., Gao, J.M. (2011). “Nanonization Strategies for Water Soluble Drugs”, Drug Discovery Today, 16: 354-360.

[50] Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J.T., L’Alloret, F. (2004). “Nanoemulsions: a New Vehicle for Skincare Products”, Advanced Colloid Interface Science, 108: 145-149.

[51] Lu, Y. ve Park, K. (2013). “Polymeric Micelles and Alternative Nanonized Delivery Vehicles for Poorly Soluble Drugs”, International Journal of Pharmaceutics, 453: 198-214.

[52] Gaucher, G., Dufresne, M.H., Sant, V.P., Kang, N., Maysinger, D., Leroux, J.C. (2005). "Block Copolymer Micelles: Preparation, Characterization and Application in Drug Delivery, Journal of Controlled Release, 109: 169-188.

[53] Martin, A.N., Sinko, P.J., Singh, Y. (2011). Martin's Physical Pharmacy Pharmaceutical Sciences: Physical Chemical Biopharmaceutical Principles in the Pharmaceutical Sciences, 6th Edition, Lippincott Williams, Wilkins, Baltimore MD.

[54] Tadros, T.F. (2006). Applied Surfactants: Principles and Applications, First Edition, John Wiley & Sons.

[55] Owen, S.C., Chan, D.P.Y., Shoichet, M.S. (2012). "Polymeric Micelle Stability", Nano Today, 7: 53-65.

[56] Jones, M.C. ve Leroux, J.C. (1999). "Polmeric Micelles- a New Generation of Colloidal Drug Carriers", European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 48: 101-111.

[57] Torchillin, V.P. (2001). "Structure and Design of Polymeric Surfactant-Based Drug Delivery Systems", Journal of Controlled Release, 73: 137-172.

[58] Torchilin, V.P. (2005). "Block Copolymer Micelles as a Solution for Drug Delivery Problems", Expert Opinio on Therapeutic Patents, 15: 63-75.

[59] Kakizawa, Y. ve Kataoka, K. (2002). "Block Copolymer Micelles for Delivery of Gene and Releated Compounds", Advanced Drug Delivery Reviews, 54: 203-222.

[60] Mourya, V.K., Inamdar, N., Nawale, R.B., Kulthe, S.S. (2011). "Polymeric Micelles: General Considerations and Their Applications Indian", Journal of Pharmaceutical Education and Research, 45(2): 1258-138.

[61] Fukumine, Y., Inomata, K., Takano, A., Nose, T. (2000). "Micellization Behavior of Diblock Copolymers in Solution Near The Critical Micelle Temperature", Polymer, 41(14): 5367-5374.

[62] Gohy, J.F. (2005). "Block Copolymer Micelles", Advanced Polymer Science, 190: 65-136.

[63] Allen, C., Maysinger, D., Eisenberg, A. (1999). "Nano-Engineering Block Copolymer Aggregates for Drug Delivery", Colloidal Surfaces B: Biointerface, 16: 1–35.

[64] Luo, L. ve Eisenbrg, A. (2001). "Thermodynamic Stabilization Mechanism of Block Copolymer Vesicles", Journal of American Chemical Society, 123: 1012-1013.

[65] Luo, L. Ve Eisenbrg, A. (2001). "Thermodynamic Size Control of Block Copolymer Vesicles in Solution", Langmuir, 17: 6804-6811.

[66] Zhang, L. ve Eisenberg, A. (1995). "Multiple Morphologies of Crew-Cut Aggregates of Polystyrene-b-Poly(Acrylic Acid) Block Copolymers", Science, 268: 1728-1731.

[67] Deng, C., Jiang, Y., Cheng, R., Meng, F., Hong, Z. (2012). "Biodegradable Polymeric Micelles for Targeted and Controlled Anticancer Drug Delivery: Promises, Progress and Prospects", Nano Today, 7: 467-480.

[68] Torchilin, V.P. (2004). "Targeted Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Soluble Drugs", Cell Mol Life Sci, 61: 2549-2559.

[69] Mourya, V.K., Inamdar, N., Nawale, R.B., Kulthe, S.S. (2011). "Polymeric Micelles: General Considerations and Their Applications", Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 45(2): 128-138.

[70] Kwon, G.S. (2003). "Polymeric Micelles for Delivery of Poorly Water Soluble Compounds", Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 20: 357-403.

[71] Nishiyama, N. ve Kataoka, K. (2006). "Current State, Achievements and Future Prospects of Polymeric Micelles as Nanocarriers for Drug and Gene Delivery", Pharmacology & Therapeutics, 112: 630-648.

[72] Gaucher, G., Dufresne, M.H., Sant, V.P., Kang, N., Mayssinger, D. ve Leroux, J.C. (2005). "Block Copolymer Micelles: Preparation, Characterization and Application in Drug Delivery", Journal of Controlled Release, 109, 169-188.

[73] Rapoport, N.Y., Christensen, D.A., Fain, H.D., Barrows, L., Gao, Z. (2004). "Ultrasound-Triggered Drug Targeting of Tumors In Vitro and In Vivo", Ultrasonics, 42: 943-950.

[74] Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., Kadam, V. (2010). "Advances in Polymeric Micelles for Drug Delivery and Tumor Targeting", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 6: 714-729.

[75] Amiji, M.M. (2007). Nanotechnology for Cancer Therapy, First edition 315-477, CRC Press.

[76] Lipinski, C. (2000). "Drug Like Properties and The Causes of Poor Solubility and Poor Permeability", Journal of Pharmacology Toxicology Methods, 44: 235-249.

[77] Kawabata, Y., Wada, K., Nakatani, M., Yamada, S., Onoue, S. (2011). "Formulati on Design for Poorly Water-Soluble Drugs Based on Biopharmaceutics Classification System: Basic Approaches and Practical Applications", International Journal of Pharmacy, 420: 1-10.

[78] Shuai, X., Ai, H., Nasongkla, N., Kim, S., Gao, J. (2004). "Micellar Carriers Based on Block Copolymers of Poly(q-Caprolactone) and Poly(Ethylene Glycol) for Doxorubicin Delivery", Journal of Controlled Release, 98: 415-426.

[79] Lin, W.J., Juang, L.W., Lin, C.C. (2003). “Stability and Release Performance of a Series of Pegylated Copolymeric Micelles”, Pharmaceutical Research, 20: 668-673.

[80] Taegarden, D.L. ve Baker, D.S. (2002). “Practical Aspects of Lyophilization Using Non-Aqueous Co-Solvent Systems”, European Journal of Pharmaceutical Science, 15: 115-133.

[81] Fournier, E., Dufresne, M.H., Smith, D.C., Ranger, M., Leroux, J.C. (2004). “A Novel One-Step Drug-Loading Procedure for Water Soluble Amphiphilic Nanocarriers”, Pharmaceutical Research, 21: 962-968.

[82] Elhasi, S., Astaneh, R., Lavasanifar, A. (2007). “Solubilization of an Amphiphilic Drug by Poly(Ethylene Oxide)-Block-Poly(Ester) Micelles”, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 65: 406-413.

[83] Sant, V.P., Smith, D., Leroux, J.C. (2004). “Novel pH-Sensitive Supramolecular Assemblies for Oral Delivery of Poorly Water Soluble Drugs: Preparation and Characterization”, Journal of Controlled Release, 97: 301-312.

[84] Vangeyte, P., Gautier, S., Je´roˆme, R. (2004). “About The Methods of Pre paration of Poly(Ethylene Oxide)-b-Poly(-Caprolactone) Nanoparticles in Water, Analysis by Dynamic Light Scattering”, Colloids and Surfaces, 242: 203-211.

[85] Pepic, I., Lovric, J., Grcic, J.F. (2013). “How do Polymeric Micelles Cross Epitheli al Barriers?”, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 50: 42-55.

[86] Wilhelm, M., Zhao, C.C.L., Wang. R.L., Xu. R.L., Winnik. M.A., Mura, J.L., Riess, G., Croucher, M.D. (1991). “Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study”, Macromolecules, 24: 1033-1040.

[87] Ray, G.B., Chakraborty, I., Moulik, S.P. (2006). “Pyrene Absorption can be a Convenient Method for Probing Critical Micellar Concentration (CMC) and Indexing Micellar Polarity”, Journal of Colloidal and Interface Science, 294: 248-254.

[88] Domeselaar, G.H.V., Kwon, G.S., Andrew, L.C., Wishart, D.S. (2003). “Colloids and Surfaces B: Biointerfaces”, 30: 323-334.

[89] Zhao, C.L. ve Winnik, M.A. (1990). “Fluorescence Probe Techniques Used to Stu dy Micelle Formation in Water Soluble Block Copolymers”, Langmuir, 6: 514-516.

[90] Yokoyama, M., Satoh, A., Sakurai, Y., Okano, T., Matsumara, Y., Kakizoe, T., Kataoka, K. (1998). “Incorporation of Water Insoluble Anticancer Drug into Polymeric Micelles and Control of Their Particle Size”, Journal of Controlled Release, 55: 219-229.

[91] Feng, S.S. (2004). “Nanoparticles of Biodegradable Polymers for New-Concept Chemotherapy ”, Expert Review of Medical Devices, 1: 115-125.

[92] Brookhaven Instruments Corporation, (2003). Zeta Potential Analyzer Instructi on Manual, New York.

[93] Zeta Potential an Introduction in 30 Minutes, Zetasizer Nano Series Technical Note, Malvern, United Kingdom.

[94] Torchilin, V.P. (2008). “Cell Penetrating Peptide-Modified Pharmaceutical Nanocarriers for Intracellular Drug and Gene Delivery” Peptide Science, 90(5): 604-610.

[95] Gaucher, G., Dufresne, M.H., Sant, V.P., Kang, N., Maysinger, D., Leroux, J.C. (2005). “Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery” Journal of Controlled Release, 109: 169-188.

[96] Ranger, M., Jones, M.C., Yessine, M.A., Leroux, J.C., (2001). “From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies”, Journal of Polymer Science A: Polymer Chemistry, 39: 3861-3874.

[97] Peppas, N.A. ve Owens, D.E. (2006). “Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles”, International Journal of Pharmaceutics, 307: 93-102.

[98] Lee, J.Y., Cho, E.C., Cho, K. (2004). “Incorporation and release behavior of hydrophobic drug in functionalized poly(d,l-lactide)-block–poly(ethylene oxide) micelles”, Journal of Controlled Release, 94: 323-335.

[99] Yamamoto, Y., Nagasaki, Y., Kato, Y., Sugiyama, Y., Kataoka, K. (2001). “Long-Circulating Poly(Ethylene Glycol)–Poly(d,l-lactide) Block Copolymer Micelles with Modulated Surface Charge”, Journal of Controlled Release, 77: 27-38.

[100] Yamamoto, Y., Yasugi, K., Harada, A., Nagasaki, Y., Kataoka, K. (2002). “Temperature-Related Change in The Properties Relevant to Drug Delivery of Poly(Ethylene Glycol)-Poly(d,l-Lactide) Block Copolymer Micelles in Aqueous Milieu”, Journal of Controlled Release, 82: 359-371.

[101] Cha, E.J., Kim, J.E., Ahn, C.H. (2009). “Stabilized Polymeric Micelles by Electrostatic Interactions for Drug Delivery System”, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 38(4): 341-346.

[102] Feng, S.S. (2006). “New-Concept Chemotherapy by Nanoparticles of Biodegredable Polymers: where are we now?”, Nanomedicine, 1: 297-309.

[103] Goodwin, J. (2004). Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers-An Introduction, First Edition, John-Wiley and Sons, London.

[104] Agarwal S. (2012). “Biodegradable Polyesters”, Polymer Science: A Comprehensive Reference, 5: 333-361.

[105] Piao, L., Deng, M., Chen, X., Jiang, L., Jing, X. (2003). "Ring-Opening Polymerization of ε-Caprolactone and L-Lactide Using Organic Amino Calcium Catalyst", Polymer, 44(8): 2331-2336.

[106] Woodle, M.C., Engbers, C.M., Zalipsky, S. (1994). "New Amphipatic Polymer Lipid Conjugates Forming Long-Circulating Reticuloendothelial System-Evading Liposomes", Bioconjugate Chemistry, 5: 493-496.

[107] Yu, K., Zhang, L., Eisenberg, A. (1996). "Novel Morphologies of 'crew-Cut' Aggregates of amphiphilic Diblock Copolymers in Dilute Solutions", Langmuir, 12: 5980-5984.

[108] Alakhov, V.Y. ve Kabanov, A.V. (1998). "Block Copolymeric Biotransport Carriers as Versatile Vehicles for Drug Delivery", Expert Opinion on Investigational Drugs, 7: 1453-1473.

[109] Kim S.Y., Shin I.G., Lee Y.M., Cho C.S., Sung Y.K. (1998). "Methoxy Poly(ethylene glycol) and ε-caprolactone Amphiphilic Block Copolymeric Micelle Containing Indomethacin. II. Micelle Formation and Drug Release Behavours", Journal of Controlled Release, 51: 13-22.

[110] Chen D., Liang H., Yang Y., Yuan Z., Ding P., Deng Y. (2011). "Effects of pH-Sensitive Groups on Poly(ethylene oxide)-block-Poly(ε-caprolactone) Block Copolymer Micelles Used as Drug Carriers", Macromolecular Chemistry and Physics, 212: 2511-2521.

[111] Liggins, R.T. ve Burt, H.M. (2002). "Polyether-Polyester Diblock Copolymers for The Preparation of Paclitaxel Loaded Polymeric Micelle Formulations", Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 191-202.

[112] Zhu C., Jung S., Luo S., Meng F., Zhu X., Park T.G., Zhong Z. (2010). "Co-delivery of siRNA and Paclitaxel into Cancer Cells by Biodegradable Cationic Micelles Based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA Triblock Copolymers", Biomaterials, 31: 2408-2416.

[113] Hwang S.J., Kim M.S., Han J.K., Lee D.S. (2007). "pH-Sensitivity Control of PEG-Poly(β-amino ester) Block Copolymer Micelle", Macromolecular Research, 15(5): 437-442.

[114] Choi, Y. K., Bae, Y. H., Kim, S. W. (1998). "Star-Shaped Poly(ether−ester) Block Copolymers: Synthesis, Characterization, and Their Physical Properties", Macromolecules, 31: 8766-8774.

[115] Dong P.W., Wang X.H., Gu Y.C., Wang Y.J., Wang Y.J., Gong C.Y., Luo F., Guo G., Zhao X., Wei Y.Q., Qian Z.Y. (2010). "Self-assembled Biodegradable Micelles Based on Star-Shaped PCL-b-PEG Copolymers for Chemotherapeutic Drug Delivery", Colloids and Surfaces A: Physicochemicel and Engineering Aspects, 358: 128-134.

[116] Wolschek, M.F., Thallinger, C., Kursa, M., Rössler, V., Allen, M., Lichtenberger, C., Kircheis, R., Lucas, T., Willheim, M., Reinisch, W., Gangl, A., Wagner, E., Jansen, B. (2002). "Specific Systemic Nonviral Gene Delivery to Human Hepatocellular Carcinoma Xenografts in SCID Mice", Hepatology, 36(5): 1106-1114.

[117] Zhu, W.P., Xie, W.H., Tong, X.W., Shen, Z.Q. (2007). "Amphiphilic Biodegradable Poly(CL-b-PEG-b-CL) Triblock Copolymers Prepared by Novel Rare Earth Complex: Synthesis and Crystallization Properties", European Polymer Journal, 43: 3522-3530.

[118] Zhang, C.Y., Yang, Y.Q., Huang, T.X., Zhao, B., Guo, X.D., Wang, J.F., Zhang, L.J. (2012). "Self-Assembled pH-Responsive MPEG-b-(PLA-co-PAE) Block Copolymer Micelles for Anticancer Drug Delivery", Biomaterials, 33: 6273-6283.

[119] Zugates, G.T., Little, S.R., Anderson, D.G., Langer, R. (2005). "Poly(β-amino ester)s for DNA Delivery", Israel Journal of Chemistry, 45: 477-485.

[120] Zugates, G.T., Peng, W., Zumbuehl, A., Jhunjhunwala, S., Huang, Y.H., Langer, R., Sawicki, J.A., Anderson, D.G. (2007). "Rapid Optimization of Gene Delivery by Parallel End-Modification of Poly(β-amino ester)s", The American Society of Gene Therapy, 15(7): 1306-1312.

[121] Song, W., Tang, Z., Li, M., Lv, S., Yu, H., Ma, L., Zhuang, X., Huang, Y., Chen, X.,(2012). "Tunable pH-Sensitive Poly(β-amino ester)s Synthesized from Primary Amines and Diacrylates for Intracellular Drug Delivery", Macromolecular Bioscience, 12: 1375-1383.

[122] Gu, J., Cheng, W.P., Liu, J., Lo, S.Y., Smith, D., Qu, X., Yang, Z. (2009). "pH-Triggered Reversible "Stealth" Polycationic Micelles", Biomacromolecules, 9: 255-262.

[123] Torchilin, V.P. (2007). "Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives", Pharmaceutical Research, 24: 1-16.

[124] Hawkins, A.M., Milbrandt, T.A., Puleo, D.A., Hilt, J.Z. (2011). "Synthesis and Analysis of Degradation, Mechanical and Toxicity Properties of Poly(β-Amino Ester) Degradable Hydrogels", Acta Biomaterialia, 7: 1956-1964.

[125] Xu, P., Van Kirk, E.A., Zhan, Y., Murdoch, W.J., Radosz, M., Shen, Y. (2007). "Targeted Charge-Reversal Nanoparticles for Nuclear Drug Delivery", Angewandte Chemie International Edition, 46: 4999-5002.

[126] Gao, G.H., Park, M.J., Li, Y., Im, G.H., Kim, J.H., Kim, H.N., Lee, J.W., Jeon, P., Bang, O.Y., Lee, J.H., Lee, D.S. (2012). "The Use of pH-Sensitive Positively Charged Polymeric Micelles for Protein Delivery", Biomaterials, 33: 9157-9164.

[127] Sunshine, J.C., Akanda, M.I., Li, D., Kozielski, K.L., Green, J.J. (2011). "Effects of Base Polymer Hydrophobicity and End-Group Modification on Polymeric Gene Delivery", Biomacromolecules, 12: 3592-3600.

[128] "Amines and Quaternary Ammonium Compounds", Principles of Drug Action 1, Spring 2005, Amines, Auborn University Lesson Notes.

[129] Gu, J., Cheng, W.P., Liu, J., Lo, S.Y., Smith, D., Qu X., Yang, Z. (2008). "pH-Triggered Reversible "Stealth" Polycationic Micelles", Biomacromolecules, 9: 255-62.

[130] Qui, Y. ve Park, K. (2001). "Environment-Sensitive Hydrogels for Drug Delivery", Advanced Drug Delivery Reviews, 53: 321-339.

[131] Philippova, O.E., Hourdet, D., Audebert, R., Khokhlov, A.R. (1997). "pH Responsive Gels of Hydrophobically Modified Poly(Acrylic Acid)", Macromolecules, 30: 8278-8285.

[132] Gil, E.S. ve Hudson, S.M. (2004). "Stimuli-Responsive Polymers and Their Bioconjugates", Progress in Polymer Science, 29: 1173-1222.

[133] Xu, W., Ling, P., Zhang, T. (2013). "Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs", Journal of Drug Delivery, 2013: 1-15.

[134] Jeong, B., Kim, S.W., Bae, Y.H. (2002). "Thermosensitive Sol-Gel Reversible Hydrogels", Advanced Drug Delivery Reviews, 54: 37-51.

[135] Bromberg, L. (2008). "Polymeric Micelles in Oral Chemotherapy," Journal of Controlled Release, 128(2): 99-112.

[136] Pinkrah, V.T., Snowden, M.J., Mitchell, J.C., Seidel, J., Chowdhry, B.Z., Fern, G.R. (2003). "Physicochemical Properties of Poly(N-Isopropylacrylamideco- 4-Vinylpyridine) Cationic Polyelectrolyte Microgels", Langmuir, 19: 585-590.

[137] Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G. (2001). "Poly(ethylenimine)-Mediated Gene Delivery Affects Endothelial Cell Function and Viability", Biomaterials, 22(5): 471-480.

[138] Feil, H., Bae, Y.H., Feijen, J., Kim, S.W. (1993). "Effect of Comonomer Hydrophilicity and Ionization on The Lower Critical Solution Temperature of N-isopropylacrylamide Copolymers", Macromolecules, 26: 2496-2500.

[139] Bokias, G., Staikos, G., Illiopoulos, I. (2000). "Solution Properties and Phase Behaviour of Copolymers of Acrylic Acid with N-isopropylacrylamide: The Importance of The Intrachain Hydrogen Bonding", Polymer, 41: 7399-7405.

[140] Liu, B., Yang, M., Li, R., Ding, Y., Qian, X., Yu, L., Jiang, X. (2008). "The Anti Tumor Effect of Novel Docetaxel-Loaded Thermosensitive Micelles", European Journal of Pharmaceuticals Biopharmaceuticals, 69: 527-34.

[141] Zrinyi, M. (2000). “Intelligent Polymer Gels Controlled by Magnetic Fields”, Colloid Polymer Science, 278: 98-103.

[142] Wei, X., Champ, S., Huglin, M.B. (2000). “Observations on Some Polymerisations Involving N-Isopropylacrylamide”, Polymer, 41: 7575-7581.

[143] Shim, W.S., Sung, W.K., Lee, D.S. (2006). “Sulfonamide-Based pH- and Temperature-Sensitive Biodegradable Block Copolymer Hydrogels”, Biomacromolecules, 7: 1935-1941.

[144] Jeong, B.M., Lee, D.S., Shon, J., Bae, Y.H., Kim, S.W. (1999). “Thermoreversible Gelation of Poly(Ethylene Oxide) Biodegradable Polyester Block Copolymers”, Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry, 37: 751-760.

[145] Huynh, D.P., Nguyen, M.K., Kim, B.S., Lee, D.S. (2009). “Molecular Design of Novel pH/Temperature-Sensitive Hydrogels”, Polymer, 50: 2565-2571.

[146] Shim, W.S., Yoo, J.S., Bae, Y.H., Lee, D.S. (2005). “Novel Injectable pH and Temperature Sensitive Block Copolymer Hydrogel”, Biomacromolecules, 6: 2930-2934.

[147] Weiss, R.G. ve Terech, P. (2005). Gel Formation: Phase Diagrams Using Tabletop Rheologyand Calorimetry, Molecular Gels: Materials with Self-Assembled Fibrillar Networks, First Edition, Springer, Netherlands.

[148] Dimonte, G., Nelson, D., Weaver, S., Schneider, M., Flower-Maudlin, E., Gore, R., Baumgardner, J.R., Sahota, M.S. (1998). “Comparative Study of Viscoelastic Properties Using Virgin Yoğurt”, Journal of Rheology, 42: 727-742.

[149] Montecucco, A. ve Biamonti, G. (2007). “Cellular Response to Etoposide Treatment”, Cancer Letters, 252: 9-18.

[150] Hande, K.R. (1998). "Etoposide: Four Decades of Development of a Topoisomerase II Inhibitor", European Journal of Cancer, 34(10): 1514-21.

[151] Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. (2010). "DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs", Chemistry&Biology, 17(5): 421-33.

[152] Saadatia, R. Ve Dadashzadeha, S. (2014). “Marked Effects of Combined TPGS and PVA Emulsifiers in The Fabrication of Etoposide-Loaded PLGA-PEG Nanoparticles: In vitro and In Vivo Evaluation”, International Journal of Pharmaceutics, 464: 135-144.

[153] Park, E.K., Lee, S.B., Lee, Y.M. (2005). “Preparation and Characterization of Methoxy Poly (Ethylene Glycol) /Poly (ε-Kaprolactone) Amphiphilic Block Copolymeric Nanospheres for Tumor-Specific Folate-Mediated Targeting of Anticancer Drugs”, Biomaterials, 26: 1053-1061.

[154] Choi, J., Kim, I.K., Kwak, S.Y. (2005). “Synthesis and Characterization of a Series of Star-Branched Poly(ε-Caprolactone)s with The Variation in Arm Numbers and Lengths”, Polymer, 46(23): 9725-9735.

[155] Choi, J. ve Kwak, S.Y. (2003). “Synthesis and Characterization of Hyperbranch ed Poly(ε-Caprolactone)s Having Different Lengths of Homologous Backbone Segments”, Macromolecules, 36: 8630-8637.

[156] Claesson, H., Malmström, E., Johansson, M., Hult, A. (2002). “Synthesis and Characterisation of Star Branched Polyesters with Dendritic Cores and the Effect of Structural Variations on Zero Shear Rate Viscosity”, Polymer, 43(12): 3511-3518.

[157] Shenoy, D.B. ve Amiji, M.M. (2005). “Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly(Epsi lon-Caprolactone) Nanoparticles for Targeted Delivery of Tamoxifen in Breast Cancer”, International Journal of Pharmaceutics, 293: 261-270.

[158] Jablonski, A. ve Powell, C.J. (2002). “Comparisons of Practical Attenuation Lengths Obtained from Different Algorithms for Application in XPS”, Surface Science, 520(1-2): 78-96.

[159] Shenoy, D., Little, S., Langer, R., Amiji, M. (2005). “Poly(Ethylene Oxide)-Modified Poly(β-Amino Ester) Nanoparticles as a pH-Sensitive System for Tumor-Targeted Delivery of Hydrophobic Drugs: Part I, In Vitro Evaluations”, Molecular Pharmaceutics, 2(5): 357-366.

[160] Kim, M.S., Lee, D.S., Choi, E.K., Park, H.J., Kim, J.S. (2005). “Modulation of Poly (β-Amino Ester) pH-Sensitive Polymers by Molecular Weight Control”, Macromolecular Research, 13(2): 147-151.

[161] Kim, M.S., Hwang, S.J., Han, J.K., Choi, E.K., Park, H.J., Lim, J.S., Lee, D.S. (2006). “pH-Responsive PEG-Poly(β-Amino Ester) Block Copolymer Micelles with a Sharp Transition”, Macromolecular Rapid Communications, 27: 447-451.

[162] Chung, T.W., Cho, K.Y., Lee, H.C., Nah, J.W., Yeo, J.H., Akaike T., Cho, C.S. , (2004). “Novel Micelle-Forming Block Copolymer Composed of Poly (ε-Caprolactone) and Poly(Vinyl Pyrrolidone)”, Polymer, 45: 1591-1597.

[163] Xue, Y.N., Huang, Z.Z., Zhang, J.T., Liu, M., Zhang, M., Huang, S.W., Zhuo, R.X. (2009). “Synthesis and Self-Assembly of Amphiphilic Poly(Acrylic Acid-b-DL-Lactide) to Form Micelles for pH-Responsive Drug Relivery”, Polymer, 50: 3706-3713.

[164] Hu, Y., Zhang, L., Cao, Y., Ge, H., Jiang, X., Yang, C. (2004). “Degradation Behavior of Poly(Epsilon-Caprolactone)-b-Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(Epsilon Caprolactone) Micelles in Aqueous Solution”, Biomacromolecules, 5(5): 1756-1762.

[165] Wu, C.B., Hao, J.Y., Deng, X.M., Li, X.H. (2008). “Copolymer of Tetraethylenepentamine and Ethylene Glycol Diacrylate: Synthesis and Degradation”, Polymer Degradation and Stability, 93: 932-940.

[166] Huynh, D.P., Nguyen, M.K., Pi, B.S., Kim, M.S., Chae, S.Y., Lee, K.C. (2008). “Functionalized Injectable Hydrogels for Controlled Insulin Delivery”, Biomaterials, 29: 2527-2536.

[167] Shim, M.S., Lee, H.T., Shim, W.S., Park, I., Lee, H., Chang, T., Kim, S.W., Lee, D.S. (2002). “ Poly(D,L-Lactic Acid-co-Glycolic Acid)-b-Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly (D,L-Lactic Acid-co-Glycolic Acid) Triblock Copolymer and Thermoreversible Phase Transition in Water”, Journal of Biomedical Materials Research, 61: 188-196.

[168] Dayananda, K., He, C., Park, D.K., Park, T.G., Lee, D.S. (2008). “pH- and Temperature-Sensitive Multiblock Copolymer Hydrogels Composed of Poly(Ethylene Glycol) and Poly(Amino Urethane)”, Polymer, 49: 4968-4973.

[169] Bae, S.J., Suh, J.M., Sohn, Y.S., Bae, Y.H., Kim, S.W., Jeong, B. (2005). “Thermogelling Poly(Caprolactone-b-Ethylene Glycol-b-Caprolactone) Aqueous Solutions”, Macromolecules, 38: 5260-5265.

[170] Gong, C., Shi, S., Wu, L., Gou, M., Yin, Q., Guo, Q., Dong, P., Zhang , F., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y., Qian, Z. (2009). “Biodegradable In Situ Gel-Forming Controlled Drug Delivery System Based on Thermosensitive PCL–PEG–PCL Hydrogel, Part 2: Sol–Gel–Sol Transition and Drug Delivery Behavior”, Acta Biomaterialia, 5: 3358-3370.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Yasemin TAMER

Doğum Tarihi ve Yeri : 17-04-1984/İstanbul

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ybalcik@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Fizikokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2008
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2007
Lise	Fen Bilimleri	Orhan Cemal Fersoy Lisesi	2002

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2012-Devam Ediyor	Yıldız Teknik Üniversitersi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Bildiri

1) E. Hilal Mert, Yasemin Balçık, Hale Berber, Hüseyin Yıldırım,"Doymamış Poliester Reçinesinden, HIPE Yöntemi Kullanılarak Çapraz Bağlı Ve Gözenekli Polimerlerin Sentezi Ve Karakterizasyonu" 21. Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, 23-27 Ağustos, 2007, Malatya.
2) Y.Balçık, E.H. Mert, H.Berber, M.A. Kaya, H.Yıldırım, "Synthesis Of Highly Porous PolyHIPE Materials And Removing Petroleum Wastes", 48th Microsymposium Polymer Colloids: From Design to Biomedical and Industrial Applications, July 20-24 2008, Prague.
3) Balçık Y., Mert E.H., Berber H., Yıldırım H., "HipeYöntemi İle Sentezlenen Çaprazbağlı Ve Gözenekli Poliester-StirenPolimerlerinin Özellikleri Üzerine Polimerizasyon Koşullarının Etkilerinin İncelenmesi", 2. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan–2 Mayıs 2008, Urfa, Türkiye.
4) Balçık Y., Mert E.H., Berber H., Kaya M.A., Yıldırım H, "Yüksek Gözenekli Polihıpe Malzemelerin Sorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi" 22. Ulusal Kimya Kongresi, 6-10 Ekim 2008, Gazi Magosa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti.
5) Yasemin Balçık, Hale Berber, Hüseyin Yıldırım, "Çaprazbağlı ve Yüksek Gözenekli PoliHİPE Malzemelerinin Sentezi ve Ağır Metallerin Uzaklaştırılmasında Kullanımı", 23. Ulusal Kimya Kongresi 16-20 Haziran 2009, Sivas.
6) Yasemin Tamer, Hüseyin Yıldırım, "Biyoparçalanabilir Özellikteki pH Duyarlı Nanotaneciklerin Sentezi ve Karakterizasyonu", 25. Ulusal Kimya Kongresi, 27 Haziran-2 Temmuz 2011, Erzurum.
7) Yasemin Tamer, Hüseyin Yıldırım, " Çekirdek-Kabuk Yapısındaki Polimerik Misellerin Sentezi ve Karakterizasyonu", 4. Ulusal Polimer Bilimi ve Teknolojisi Kongresi, 5-8 Eylül 2012, Çanakkale.
8) Yasemin TAMER, Hüseyin YILDIRIM, "Synthesis and Characterization of Biodegradable and pH Sensitive Triblock Copolymers", POLYCHAR 20, Mart 2012, Dubrovnik, Hırvatistan.
9) Yasemin TAMER, Hüseyin YILDIRIM, "Self-assembled pH-responsive Micelles From Amphiphilic Triblock Copolymers", UIPAC, 2013, İstanbul, Türkiye.

Proje

1."Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Hidrojellerin Sentezi ve Karakterizasyonu" 2011-01-02-DOP07 Nolu Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı, 2011-Devam ediyor.

2.“Doymamış Poliester Esaslı Çaprazbağlı ve Yüksek Gözenekli Kopolimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Adsorbsiyon Özelliklerinin İncelenmesİ” 107T843 Nolu TÜBİTAK Projesi, Araştırmacı, 2010-2012.

Ödüller

TÜBİTAK-BİDEB Yurt İçi Doktora Burs Programı: 2008–2013.