

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ


İNSULİN HORMONUNUN KONTROLLÜ SALIMINDA KULLANILMAK ÜZERE
BİYOUYUMLU TAŞIYICI İMPLANTIN HAZIRLANMASI VE UYGULAMASI

HESNA URAL

HAZİRAN 2007

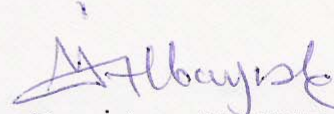
Fen Bilimleri Enstitüsü müdürünün onayı.

29/06/2007


Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

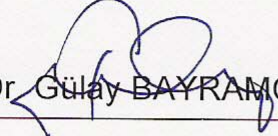
Müdür V.

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.


Prof. Dr. İrfan ALBAYRAK

Ana Bilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.


Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Ortak Danışman


Prof. Dr. M. Yakup ARICA

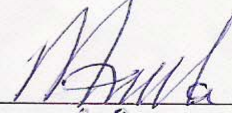
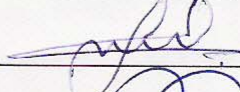
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Meral KARAKIŞLA

Doç. Dr. Elif LOGOĞLU

Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU


ÖZET

İNSULİN HORMONUNUN KONTROLLÜ SALIMINDA KULLANILMAK ÜZERE BİYOUYUMLU TAŞIYICI İMPLANTIN HAZIRLANMASI VE UYGULAMASI

URAL, Hesna

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Ortak Danışman: Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Haziran 2007, 67 sayfa

Bu çalışmanın amacı, yavaş bazal insulin salımını sağlayan sürekli bir sistem tasarlamaktır. pHEMA hidrojelini iyi bir biyoyumluluğa sahiptir. İnsulinin kontrollü salımı ve etkili bir hidrojel implant formülasyonu için su alarak şişebilen poli(2-hidroksietil-metakrilat-metilmetakrilat) kopolimeri UV-başlatıcılı fotopolimerizasyonu yöntemi ile silindirik biçimde hazırlandı. İnsulinin kontrollü salımı için taşıyıcı hidrojel implantının biyoyumluluğunu arttırmak için pHEMA ve/veya p(HEMA-MMA) silindirik yapılarına insan serum albumini ve polietilen glikol eklendi. Farklı monomer oranına

sahip bir seri p(HEMA-MMA) kompozisyonu hazırlandı. İlaç yüklenmesi ve salım çalışmalarında en uygun sonuçlar, HEMA:MMA monomer oranının 1:0.5 (v/v) olduğu kompozisyonda elde edildi. İnsulinin kontrollü salımı için hazırlanan taşıyıcı implant materyalinin karakterizasyonu temas açısı, FTIR, SEM ve DSC çalışmaları ile gerçekleştirildi. Şişebilen hidrojellere çözücü moleküllerinin transferi ile şişme davranışları araştırıldı. İnsulin salım sistemi için taşıyıcı implant yüzeyinde kan protein adsorpsiyonu ve platelet adhezyonu önemli derecede azalmıştır. Fizyolojik fosfat tamponu içeren sürekli akış salım sisteminde insulinin salım kinetiği, üç farklı insulin dozu (25, 50 and 75 U/ml) yüklenmesi ile değerlendirildi. Polimerik silindirlerinden salınan insulin miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak tayin edildi. İnsulin salım mekanizmasını değerlendirebilmek amacı ile power yasası, sıfırıncı-derece ve Higuchi model eşitlikleri kullanıldı.

Anahtar Kelimeler: Kontrollü salım, Hidrojel silindir, poli(HEMA-MMA), İnsulin, Biyomateryal, Temas açısı, Termal analiz, Salım kinetiği.

ABSTRACT

THE PREPARATION AND APPLICATION OF BIOCOMPETIBLE CARRIER IMPLANT FOR USING CONTROL RELEASE OF INSULIN HORMONE

URAL, Hesna

Kırıkkale University

Graduate School Of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. M. Yakup ARICA

Co-Supervisor: Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

June 2007, 67 pages

The purpose of this study was to design sustained release system which provides basal insulin release slowly. pHEMA hydrogel possesses good biocompatibility. For an effective implantable hydrogel formulations and controlled release of insulin, a water swellable copolymer of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-methylmethacrylate) have been prepared via UV-initiated photo-polymerization in rods form. In order to increase biocompatibility of the implantable hydrogel carriers for controlled insulin release, human serum albumin and polyethylene glycol were incorporated into the pHEMA and/or p(HEMA-MMA) rods structures. A series of

p(HEMA-MMA) compositions with different monomers ratios was prepared. Optimum results of the drug loading and release were obtained in case of sample having weight ratio of HEMA: MMA as 1:0.5 (v/v). The implantable carrier materials for controlled insulin release were characterized using contact angle, FTIR, SEM and DSC studies. The swelling behaviour of solute transport in swellable hydrogels was investigated. The blood protein adsorption and platelet adhesion were significantly reduced on the surface of the carrier implant for insulin release system. The release kinetics of insulin with three different doze (25, 50 and 75 U/ml) was evaluated in physiological phosphate buffer in a continuous flow release system and the amount of insulin released from polymeric rods was determined using a spectrophotometric method. In order to evaluate of insulin release mechanism was used via power law, zero order and Hugichi's model equations.

Keywords: Controll release, Hydrogel rods, p(HEMA-MMA), Insulin, Biomaterial, Contact angle, Thermal analysis, Release kinetics

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, tezimin yönlendirilmesi ve yürütülmesi sırasında büyük emeği geçen sayın hocam Prof. Dr. M.Yakup ARICA'ya teőekkürlerimi sunarım. Ayrıca her konuda benden yardımlarını ve bilgilerini hiçbir zaman esirgemeyip, desteğini hep hissettiğim çok kıymetli hocam Doç. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU'a sonsuz őükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans Programına katılmamda ve devamında manevi desteklerini üzerimden hiç eksik etmeyen, Ufuk Üniversitesi Mütevelli Heyet Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Rıdvan EGE'ye, Ufuk Üniversitesi Rektörü çok değerli sayın hocam Prof. Dr. Coőkun İKİZLER'e ve Prof. Dr. Selda DEMİRTAŐ'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Kontrollü Salım Sistemi	4
1.1.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Taşıyıcılar	5
1.1.1.1. Hidrojeller	9
1.1.1.2. Çalışmamızda Kontrollü Salım Sisteminde Kullanılan Biyomateryal Bileşenleri	13
1.1.2. Kontrollü Salım Sistemlerinin Sunduğu Avantaj ve Dezavantajlar	14
1.1.3. Kontrollü İlaç Salım Sisteminde İlaçların Taşıyıcı İmplanttan Salım Mekanizmaları	16
1.1.3.1. Difüzyon- Kontrollü Sistemler	16
1.1.3.1.1. Membrandan Difüzyonla Kontrol	17
1.1.3.1.2. Matriksten Difüzyonla Kontrol	18
1.1.3.2. Kimyasal- Kontrollü Sistemler	18
1.1.3.3. Şişme- Kontrollü Sistemler	19
1.2. İnsulin	19

1.2.1. İnsulinin Biyosentezi ve İşlevi	20
1.2.2. Diabet	22
1.2.2.1. Diabetin Önlenmesi	24
1.2.3. İnsulin Hormonunun Salımı	25
2. MATERYAL VE METOD	27
2.1. Materyaller	27
2.2. Biyomateryallerin Sentezi	27
2.3. Biyomateryalin Karakterizasyonu	28
2.3.1. Temas Açısı ve Yüzey Serbest Enerjisi	29
2.3.1.1. Kritik Yüzey Gerilimi (Zisman Yöntemi)	31
2.3.1.2. Geometrik İfade (Fowkes Yöntemi)	31
2.3.1.3. Harmonik İfade (Wu Yöntemi)	32
2.3.1.4. Asit- Baz (van Oss Yöntemi)	32
2.4. Serum Proteinleri Adsorpsiyonu	33
2.5. Kan Uyumluluk Analizi	33
2.6. İn vitro Salım Çalışmaları	34
2.7. Biyoyumlu Taşıyıcı İmplanttan İnsulinin Salım Mekanizması	34
3. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36
3.1. Biyomateryalin Karakterizasyonu	38
3.2. Biyomateryalin Kan Uyumluluk Analizleri	47
3.3. İnsulin Hormonunun Kontrollü Salımı	50
4. SONUÇ	58
5. KAYNAKLAR	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE

3.1. Farklı MMA Oranlarında Sentezlenen Kompozit Hidrojelinin Mekanik Dayanıklılığına Membran Hazırlama Kompozisyonunun Etkisi	39
3.2. Taşıyıcı İmplant İçin Deneme Sırasıyla Ölçülen Yüzey Temas Açıları	46
3.3. van Oss'a Göre Membranların Yüzey Serbest Enerjisi Parametreleri (mJ/m ²)	47
3.4. pHEMA ve p(HEMA-MMA) Yapısına Adsorplanan Serum Protein Miktarı	50
3.5. pHEMA Hidrojelinin İnsulinin Salım Kinetiği ve Belirlenen Salım Parametreleri	57
3.6. p(HEMA-MMA) Hidrojelinin İnsulinin Salım Kinetiği ve Belirlenen Salım Parametreleri	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL

1.1. Hidrojel Yapısı	10
1.2. Hidrojeller İçindeki Dört Temel Etkileşimi	11
1.3. İnsulin Molekülünün Üç Boyutlu Yapısı	22
3.1. Kontrollü Salım Sisteminde Kullanılan Taşıyıcı İmplantın SEM Görüntüsü	41
3.2. pHEMA Hidrojelinin Farklı Tampon Sistemlerindeki Şişme Davranışı	42
3.3. pHEMA-pHEMA-MMA Hidrojelinin Farklı Tampon Sistemlerindeki Şişme Davranışı	43
3.4. pHEMA (A) ve p(HEMA-MMA) (B) Hidrojelinin DSC Grafisi	44
3.5. pHEMA Hidrojelinin FTIR Spektrumu	45
3.6. pHEMA-pHEMA-MMA Hidrojelinin FTIR Spektrumu	45
3.7. pHEMA Hidrojelinin İnsulin Salım Profili	51
3.8. pHEMA-pHEMA-MMA Hidrojelinin İnsulin Salım Profili	51
3.9. pHEMA Hidrojelinin Yüklenen İnsulinin Zamana Karşı % Kümülatif Salım Grafiği	52
3.10. pHEMA-pHEMA-MMA Hidrojelinin Yüklenen İnsulinin Zamana Karşı % Kümülatif Salım Grafiği	53
3.11. pHEMA Hidrojelinin İnsulin Salımının Zamanın Karakökü ile Değişimi	54
3.12. pHEMA-MMA Hidrojelinin İnsulin Salımının Zamanın Karakökü ile	

Değişimi55

1.GİRİŞ

Polimer kimyası, ülkemizde ileri düzeyde araştırma ve yayınların yapıldığı bir bilim dalıdır. Son yıllarda bu alanda yapılan araştırmalar, polimerlerin biyoloji alanında kullanımlarına yönelmiştir. Biyopolimerler; biyolojik olarak üretilen ve benzersiz fonksiyonel özelliklere sahip olan polimerlerdir. Organizmalarla hücresel düzeyde etkileşebilen materyaller; yani biyomateryaller olarak nitelenebilen pek çok polimer belirlenmiştir.

Günümüzde büyük ilerlemelerin kaydedildiği bilim dallarından biri olan “biyomalzeme bilimi”nde, biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilecek yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. Biyomalzemeler, insan vücudundaki dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan doğal ya da sentetik malzemeler olup, sürekli olarak veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla (örneğin kan) temas ederler. Biyomalzemeler, insan vücudunun çok değişken koşullara sahip olan ortamında kullanılırlar⁽¹⁾.

Son yıllarda biyomedikal alanında ilaçların kullanımında etkili bir teknik olan kontrollü ilaç salım sistemine yönelik biyomateryal geliştirilmesi çalışmalarına yönelik ilgi artmıştır. Kontrollü salım, etkin maddenin bir sistem içerisinden istenilen sürede, belirlenmiş bir hızla ve gereken miktarda salımını sağlayacak şekilde tasarımının yapıldığı bir yöntemdir. Kontrollü salımda iki ana bileşen vardır; bunlar aktif madde ve aktif maddenin salımını düzenleyen polimerik destek madde şeklindedir. Kontrollü ilaç serbestleşmesinde kullanılan polimer (doğal ya da sentetik) ilaç ile birlikte kullanıldığında etken madde önceden tasarlanan biçimde

salınır. Kontrollü salım sistemlerinde kullanılan hidrojeller, genellikle üç boyutlu, ağ yapılı ve çapraz bağlı polimerlerdir. Hidrojeller, hidrofilitesi yüksek, suda çözünmeden önemli ölçüde şişebilen, esnek ve mekanik kararlılığı yüksek polimerlerdir. Hidrojellerin hidrofilitesi derecesi, yapılarındaki polar grupların varlığına bağlıdır ve sağladıkları önemli avantajlar nedeni ile biyolojik uyumluluk göstermektedirler. Hidrojeller biyoteknoloji alanında organik ve inorganik kirleticilerin uzaklaştırılmasında, kromatografik tekniklerle biyolojik moleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde, biyomedikal alanda kontak lens yapımında, farmasotik ve tarım alanında kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve biyotıp alanında doku mühendisliği ve doku geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır⁽²⁾.

Sentetik bir polimer olan poli(hidroksietilmetakrilat) poli(HEMA), mekanik dayanımı yüksek, biyolojik ve kimyasal degradasyona karşı dirençli bir materyaldir. Kitosan, hidrofilik yapıdadır, biyolojik uyumlu ve antibakteriyel özelliğe sahiptir. Akrilat kökenli olan bir diğer sentetik polimer metil metakrilat biyomateryal alanında kullanılan bir destek materyalidir. HEMA ve MMA komonomerlerinden sentezlenen polimer yüzey özellikleri, gözenekliği, hidrofilitesi derecesi, önemli ölçüde değişeceğinden önemli kullanım alanları bulmaktadır. Biyoyumluluk özellikleri nedeni ile polihidroksietilakrilat polimeri; kontakt lens, hemodiyaliz membranı, hemostatik madde ve kontrollü ilaç salım implantı olarak biyomedikal alanlarında oldukça geniş bir uygulama olanağı sunmaktadır.

İlaç salım sistemleri ve biyolojik saflaştırma yöntemleri gibi çeşitli alanlarda sıcaklık, pH, kimyasal yapı gibi çeşitli koşullara duyarlı sistemlerin kullanımı oldukça

etkilidir. Bu nedenle çoğu biyomedikal alandaki biyolojik uygulamalar bu sistemlerin gelişiminin ümit verici olduğu şeklindedir. İlaç taşıyıcı sistemleri tasarımları yapılırken ve sentezlenirken, etkin maddenin vücutta istenen organ veya dokuya taşınarak en kısa zamanda istenen kan konsantrasyonunun sağlanması ve bu bileşimi öngörülen süre içerisinde kontrollü olarak devam ettirebilmesi gibi iki temel hedef göz önünde bulundurulur. Bu doğrultuda, biyolojik uyumlu poli(2-hidroksietil metakrilat), p(HEMA), temelli taşıyıcı implantın silindirik yapıda sentezlenerek elde edilen polimerik materyalin karakterizasyonunun yapılması amaçlanmaktadır.

Karakterizasyon çalışmaları sonrasında, hazırlayacağımız polimerik implant sistem ile insulin hormonu salımı ve hormon yükleme kapasitesinin salım oranına etkisi sürekli salım sistemi kullanılarak incelenmesi ve salım kinetikleri ile çalışmaların tamamlanması planlanmaktadır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomeri ve metil metakrilat monomerinin olumlu özellikleri bir araya getirilerek sentezlenen kompozit materyal ile yüzey özelliklerinin iyileştirilmesi düşünülmüştür. Bu yolla, biyomedikal ve biyoteknolojik alanda kontrollü salım alanında kullanılmak üzere model hormon insulin taşıyıcı yeni biyoyumlu bir polimerik taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomeri ve/veya metil metakrilatın UV-ışığı fotopolimerizasyonu yöntemi ile kopolimerizasyonu gerçekleştirildi. Kontrollü ilaç salım sisteminde taşıyıcı implant olarak sentezlenen pHEMA ve p(HEMA-MMA) polimerleri FTIR, SEM, yüzey temas açısı ölçüm sistemi, termal analiz (DSC), ve biyoyumluluk testleri gibi cihaz ve yöntemler kullanılarak karakterize edilmiş, kopolimerin biyoyumluluk özellikleri incelenmiştir. Biyoyumluluğunu ve ilaç salım

sisteminde hedeflenen etkin dozlamayı gerçekleştirebilmek amacı ile farklı miktarlarda insan serum albumini ve polietilen glikol yapıya eklenmiş karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

pHEMA ve p(HEMA-MMA) yapılarının kan uyumluluğu, plazma proteinleri adsorpsiyonu ve platelet adezyonu incelenerek belirlenmiştir. Hazırlanan polimerik taşıyıcı destek materyaline farklı oranlarda yüklenen insulinin kontrollü salım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve salım profilleri belirlenmiştir.

1.1. Kontrollü Salım Sistemi

Organizma için gerekli olan etkin maddenin salınım hızını kontrol ederek hedef hücreye ulaştıran sistemlere “*kontrollü salınım sistemler*” adı verilir. Biyomedikal alanda 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 salınım sistemleridir⁽³⁾. Geleneksel tedavi yöntemlerinde, ilaç, hormon veya proteinin plazmada etkili dozda tutulabilmesi için ilgili maddenin sıklıkla alınması gerekmektedir. Kontrollü salım sistemlerinde istenilen dozda ilacın plazma içerisinde derişimi arzu edilen süre kadar sabit kalması sağlanmaktadır. Bu yolla, sürekli ilaç, hormon ve protein alma gereksinimi ortadan kalkmaktadır. Ayrıca sürekli salım sistemi vasıtası ile ilaç tedavisinin istenilen bölgede, organda ve hatta hücrede yapılmasının olası olduğu rapor edilmiştir. Bugün henüz hedefleme işleminde istenilen noktaya gelinmemiş olmasına karşılık

başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kontrollü salım sistemlerinin kullanılması sonucunda toksik etkilerin en az düzeyde görülmesi, günlük sürekli dozlarda ilaç alınımına gereksinim duyulmaması hastaya büyük kolaylık sağladığı çok sayıda araştırmacı tarafında rapor edilmiştir⁽⁴⁾.

Son yıllarda kontrollü salım sistemlerinin büyük bir hızla gelişimi, yalnızca sundukları avantajlara bağlanmamalıdır. Yeni bir ilacın geliştirilmesi ve patentinin alınması 10 yıldan daha uzun süren araştırma ve geliştirme faaliyetlerini gerektirdiğinden, ilaç firmaları araştırmalarını, yeni ilaç geliştirmek yerine, var olan ilaçların kullanım ömrünü ve etkinliğini uzatmaya yöneltirler. Bunun için de kontrollü salım formülasyonları geliştirmektedirler⁽⁵⁾.

Kontrollü salım tıp, eczacılık, kimya, çevre, tarım ve veterinerlik alanlarında gereksinim duyulan ve çeşitli uygulamaları olan önemli bir araştırma konusudur. Tarımda ve çevrenin korunmasıyla ilgili biyoteknolojik uygulamalarda; kontrollü ilaç salım sistemi ile gübreler veya böcek öldürücüler düşük miktarlarda kullanılarak doğaya zarar vermeden, yüksek etkinlikte sonuçlar alınmıştır.

1.1.1. Kontrollü Salım Sistemlerinde Kullanılan Taşıyıcılar

Bugün ilaç araştırmalarında gelinen nokta 21. yüzyılda hücre ve moleküler biyoloji alanlarındaki yeni gelişmelerin protein ve genlerin tedavide kullanımını önemli derecede arttıracığı yönündedir. Özellikle moleküllerin biyolojik aktivitesini bozmadan yapılacak küçük değişimlerle doğrudan vücutta tedavisine gereksinim duyulan yere gönderebileceklerinin ipuçlarını taşımaktadırlar.

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde doğal ve/veya sentetik kökenli polimerik materyaller kullanılmaktadır. Polimer (makromolekül) tarif olarak, küçük ve basit tekrarlanan birimlerden oluşmuş büyük bir moleküldür. Polimer molekülü içerisinde tekrarlayan bu küçük, basit kimyasal birime 'tekrarlayan birim', polimeri elde etmek için başlangıçta kullanılan küçük moleküllü organik maddelere de 'monomer' adı verilir⁽⁶⁾.

Kontrollü salım sistemlerinin en yaygın ve tipik örneklerini, çapları bir mikrometreden bir kaç mikrometreye kadar olan mikropartiküller ve çapları 10-1000 nanometre arasında değişebilen ve nanopartiküller oluşturmaktadır. Etkin maddenin üzerinin biyomalzeme ile kaplanması ile oluşturulan kapsüller de kontrollü salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır⁽⁷⁾.

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. 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. Enzim varlığında yapılarının bozunması, yani biyobozunur oluşlarıysa geçici uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler açısından avantajdır. Biyoyumluluğu yüksek olan malzemeler, bedene yerleştirilebilir cihazların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Ancak halen mükemmel biyoyumluluğa sahip bir malzeme sentezi gerçekleştirilemediğinden bu konudaki çalışmalar devam etmektedir⁽⁸⁾.

Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan ve doğal biyomalzemeler olarak sınıflandırılan sistemlere; protein yapısına sahip albumin, jelatin, kollajen, gluten, kazein, fibrinojen, fibronektin, antikorlar; şeker yapısına sahip aljinat, dekstran, kitin, kitosan, nişasta, selüloz, pektin; lipid yapıya sahip stearik asit, etil stearat, tristearin, hidrojenlenmiş bitkisel yağlar, fosfolipidler (soya veya yumurtadan elde edilen lesitin ve onun türevleri olan posfatidil kolin, fosfatidil etanolamin gibi maddeler); nükleotid yapıya sahip plazmit DNA örnek olarak verilebilir⁽⁹⁾.

Selüloz, nişasta, pektin ve alginat gibi bu doğal biyomalzemeler sınıfında yer alan polimerler bozunabilir, toksisitesi olmayan maliyeti oldukça düşük ham materyallerdir. Bu nedenle çeşitli farmasotik uygulamalarda geniş çapta kullanılmaktadır. Nükleik asitler, proteinler gibi biyolojik polimerler canlı organizmanın hayati fonksiyonlarını yerine getirmede büyük rol oynarlar.

İlaç salım sistemlerinin öncelikli uygulama alanlarından farmasotik alandaki gelişmelerle, bu polimerler ve sağladığı özellikler yetersiz kalmaktadır ve bu alanda yeni, daha spesifik ve uygun polimer arayışı başlamıştır. Bu doğrultuda ümit verici bir strateji olarak doğal polimerlerin kimyasal modifikasyonu (örneğin metil selüloz ya da sodyum karboksimetilselüloz gibi selüloz türevleri) gündeme gelmiştir. Son yıllarda peptit kökenli ilaçların peroral salımında kitosan ve türevleri oldukça önem kazanmıştır. Terapotik peptitlerin oral yolla alınımı uygulamalarda büyük kolaylık ve hasat bakımında rahatlık sağlamaktadır. Fakat sterilitenin sağlanamamasından ve hemolitik etkiden oluşan enfeksiyonların önüne geçilememektedir. Peroral peptit salımında enzimatik bariyer önemli bir kısıtlayıcıdır⁽¹⁰⁾. Pankreatik serin proteazlar,

tripsin, kimotripsin, elastazlar oral olarak alınan peptitlerin metabolizmasından sorumlu enzimlerdir⁽¹¹⁾, insulinin tripsin, kimotripsin, elastazlar tarafından degrade edildiğini rapor etmişlerdir. Bu metabolik etkiden kaçınmak için çeşitli yollar denenmiştir. Lipozomların kullanılması, ilacın mikro ve nano partiküllere hapsedilmesi, enzimatik aktivitenin az olduğu kolonda salım sistemlerinin kullanımı bunlardan bazılarıdır. Enzim inhibitörlerinin kullanımında son yıllarda geniş oranda yaygınlaşmıştır.

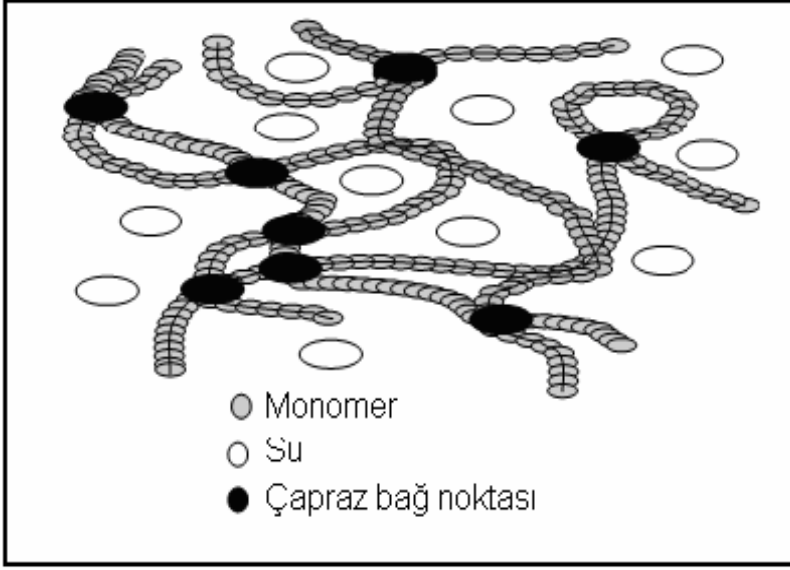
Kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan ve yapay biyomalzemeler ise biyobozunur ve biyobozunur olmayan olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Poli(laktik asit), poli(kaprolakton), poli(α -hidroksi asitler), poli(glikolik asit) gibi biyobozunur polimerler ve poli(hidroksietil metakrilat), poli(metilmetakrilat) bozunur olmayan biyomateryal olarak kontrollü salım sisteminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Biyomateryal olarak kullanılacak polimerde genel olarak aranılan biyolojik özellikler; polimerin biyolojik çevreyle iyi uyumu, dokuyla temas ettiğinden iltihaba yol açmaması, kanserojen veya teratojen etki göstermemesi ve toksik olmaması olarak sıralanabilir. Biyolojik olarak parçalanan polimerlerin birçok yararı olmasına rağmen vücutta uzun süre kalmasından kaynaklanan bazı sakıncaları vardır. Amerikan Gıda ve ilaç Dairesi'nce (FDA) onaylanmış, yapay polimerik taşıyıcıyla hazırlanan ve ilk kontrollü salım yapan peptid ilaç, Lupron Depo, adıyla prostat kanserlerinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Bu ilaçta kullanılan PLGA (poli-laktik-ko-glikolik asit), parçalandığı zaman vücutta şeker metabolizması sırasında bir ara ürün olarak bulunan laktik asite dönüştüğü için toksik etkisi olmayan, insanlarda

kullanılması yasal olarak onaylanmış ticari bir üründür doğal kökenli biyopolimerleri kullanarak kontrollü ilaç salımında kullanmak üzere biyobozunur taşıyıcı polimer implant hazırlamışlardır. Kitosanın poli(N-izopropil akrilamid) ile oluşturduğu aşırı kopolimer sıcaklığa duyarlı oftamolik (göz ile ilgili) ilaçların sürekli salımında kullanılmıştır.

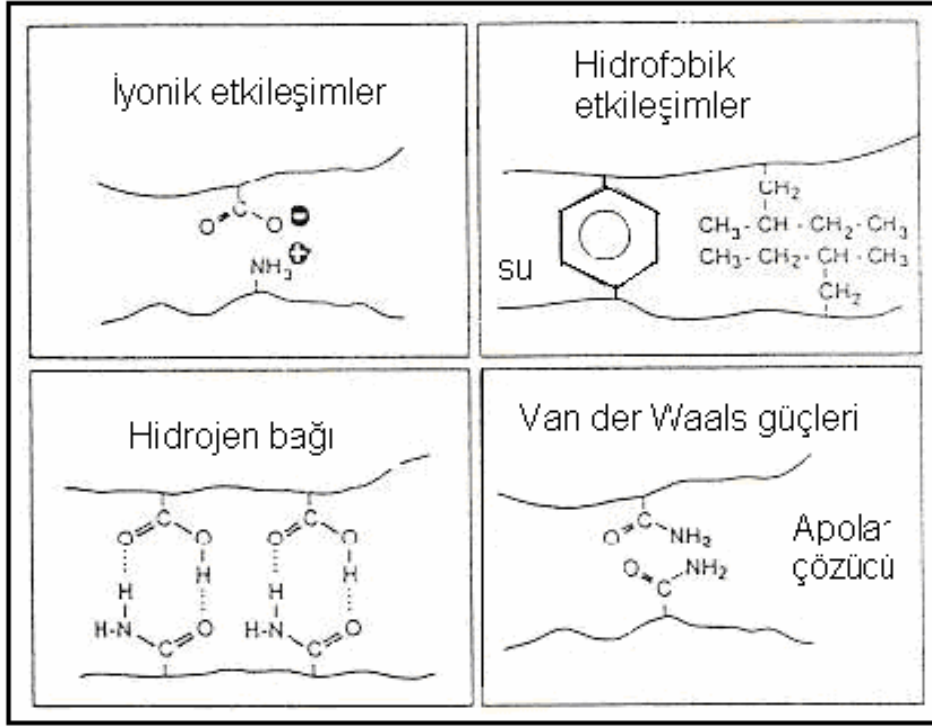
1.1.1.1. Hidrojeller

Hidrojeller, suda çözünmeyip kendi kuru kütlelerinin en az % 20 den fazlası miktarlarda su absorplayabilen, çapraz bağlı, üç boyutlu, hidrofilik ve mekanik karrallığı yüksek olan polimerik yapılardır⁽¹²⁾. Homopolimer veya kopolimerlerden oluşabilirler ve kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel çapraz bağların (kristalinite) varlığı nedeniyle çözünmezdirler (Şekil 1.1). Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir⁽¹³⁾. (Şekil 1.2.).



Şekil 1.1. Hidrojel yapısı

Hidrojeller nötral, anyonik ve katyonik olarak sınıflandırılabilir. Hidrojeller polimer iskeleti boyunca spesifik fonksiyonel gruplarından dolayı fiziksel şartlara çok hassastırlar ve dış çevreye bağlı olarak “şişme-büzüşme” davranışı gösterebilirler. Dış çevrede meydana gelen pH, sıcaklık, iyonik şiddet, çözücü bileşimi ve elektromanyetik radyasyon değişimlerine karşı şişme oranlarında büyük değişimler gösteren bu hidrojeller “uyarı-cevap hidrojelleri” olarak adlandırılırlar⁽¹⁴⁾.



Şekil 1.2. Hidrojeller içindeki dört temel etkileşimin şematik olarak gösterilmesi

Hidrojeller, biyouyumluluklarının yanı sıra sahip oldukları su içeriği, doğal dokulara benzer kauçuğumsu yapıları ve düşük yüzey gerilimlerinden dolayı insan dokusuna benzer yapıda olmaları nedeniyle farklı pek çok uygulama alanı bulmaktadır^(15,16). Hidrojeller biyoteknoloji alanında organik ve inorganik kirleticilerin uzaklaştırılmasında, kromatografik tekniklerle biyolojik moleküllerin ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde, biyomedikal alanda kontak lens yapımında, farmasotik ve tarım alanında kontrollü ilaç salım sistemlerinde ve biyotıp alanında doku mühendisliği ve doku geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek mekanik kararlılık ve oksijen geçirgenliği, uygun kırımım indisine sahip olmaları gibi avantajları dolayısı ile kontak lens; membran tipi biosensörler; yapay kalp, kas ve

tendon materyalleri, yara iyileşmesinde biyoyapışkan madde, yapay böbrek zarları, yapay deri, estetik cerrahi ve deri materyalleri; kontrollü ilaç salım sistemleri ve enzim immobilizasyonları için sentezlenen destek materyalleri bu uygulamalardan bazılarıdır. Kontakt lenslerde kullanılmalarını sağlamıştır. Pek çok glukoz cevaplı hidrojel sistemi, pH'ya duyarlı polimerlerden hazırlanabilmektedir⁽¹⁷⁾. Biyoteknolojik uygulamalarda ise, özellikle biyoaktif proteinlerin ayrılmasında hidrojellerden faydalanılmaktadır.

Tıbbi uygulamalarda en yaygın olarak kullanılan hidrojel, çaprazbağlı pHEMA'dır. Sahip olduğu su içeriği nedeniyle, doğal dokulara büyük bir benzerlik göstermektedir. Normal biyolojik reaksiyonlarda inert'tir. Bozunmaya karşı dirençlidir, vücut tarafından emilmez, ısıyla steril edilebilir, çok değişik şekil ve formlarda hazırlanabilmektedir.

Tıbbi öneme sahip diğer bir hidrojel, poliakrilamid'dir. HEMA ve akrilamid monomerlerinin yanısıra, N vinil 2 piroolidon (NVP), metakrilik asit (MAA), metil metakrilat (MMA) ve maleik anhidrit (MAH) tıp amaçlı hidrojel formulasyonlarında sıklıkla yer alırlar. Örneğin PNVP, yumuşak kontakt lenslerde kullanılmaktadır. Az miktardaki MAA, PHEMA'nın şişmesini büyük ölçüde arttırmakta ve MMAHEMA kopolimerlerinin şişmesiye saf pHEMA'ya nazaran düşük olmaktadır. Ayrıca, istenilen özelliklerin kazandırılması amacıyla hidrojeller çeşitli malzemele birleştirilebilirler.

1.1.1.2. Çalışmamızda Kontrollü Salım Sisteminde Kullanılan Biyomateryal Bileşenleri

Bu çalışmanın amacı, biyolojik olarak uyumlu olan poli(hidroksietilmetakrilat) pHEMA, hidrojel kökenli materyalin kontrollü ilaç salım sisteminde kullanılabilir bir biyomateryal olarak geliştirilmesidir. pHEMA hidroveli, çok sayıda kanla doğrudan temas eden yumuşak doku protezlerinde (kalp kapakçığı dahil) ve biyoteknolojik alanda kullanılan bir biyomateryaldir⁽¹⁸⁾.

Akrilat kökenli polimerler uzun ömürlü sentetik polimerlerdir. Bu grupta yer alan poli(metilmetakrilat), p(MMA), biyoyumlu sentetik bir polimer olmasından dolayı biyomedikal ve biyoteknolojik alanda çok sayıda uygulamada kullanılmaktadır. Ayrıca, akrilik ve metakrilik polimerler yapay damar, kontakt lens, ilaç salınım sistemleri gibi uygulama alanlarına sahiptir. Bu tür materyallerin uzun süreli biyoyumluluğu ve fonksiyonelliği canlı dokulardaki in vivo etkileşimleri ile kontrol edilmektedir. Bu materyal mekanik olarak güçlü olmasından dolayı, enzim immobilizasyonu ve protein saflaştırılmasında da yaygın olarak kullanılmaktadır⁽¹⁹⁾.

Konrollü ilaç salım sistemlerinde yaygın bir kullanım alanına sahip olan -CH₂CH₂O-, tekrarlayan birimlerinden oluşan poli(etilen oksit), PEO, biyoyumlu olması, hidrofilik özellik sergilemesi ve çok yönlü kullanılabilirliği özellikleri nedeni ile önemli bir biyomateryaldir. Poli(etilen glikol), PEG, olarak da bilinen bu biyomateryal gerçekte poli(etilen oksittir) fakat her molekülün uç kısmında bir de hidroksil grubu mevcuttur. PEG'ün, sudaki çözünürlüğünün yüksek olması, toksik etki göstermemesi, biyolojik sistemde ortam pH'sına karşı duyarsız olması ve canlı sistemi özellikle

insanlarda güvenle kullanılabilmesi gibi özellikleri sunduğu diğer avantajlardır. Ayrıca, bu biyomateryal, basit, suda çözünebilen, düzlemsel bir polimer, yapısındaki etilen oksit gruplarıyla birleşerek ve istenilen özellikleri kaybetmeden kimyasal etkileşimle suda çözünmeyen fakat suda şişen hidrojeller oluşturmak amacıyla modifiye edilebilir. Tan ve arkadaşları bu olumlu özellikleri dolayısı ile polimerik taşıyıcı olarak poli(etilen oksit) (PEO) kullanarak kafeinin kontrollü salımı gerçekleştirilmişlerdir ⁽²⁰⁾.

Sunulan tez çalışması kapsamında biyomateryal olarak kullanılacak pHEMA'nın mekanik dayanımını artırmak amacı ile metil metakrilat ile kopolimerleştirildi. Biyolojik uyumluluğunu artırmak için hidrojel matriks içerisine, PEG ve insan serum albumini matriks içi tutuklama yöntemiyle yerleştirildi. pHEMA, ve PEG içeren p(HEMA-MMA) kopolimeri silindirik şekilde hazırlandı ve biyomateryallerin kan uyumluluk deneyleri, yüzey özellikleri detaylı olarak çalışıldı. Polimerlerin, taramalı elektron mikroskobu analizleri, kan proteinleri ile etkileşimleri sulu ortamlarda ve insan serumunda incelendi. Biyomateryallerin hemolitik aktiviteleri ve kan hücrelerinin yapışması deneyleri ayrıntılı olarak incelendi. Kontrollü ilaç salımında taşıyıcı implant olarak hazırlanan albumin ve PEG içeren pHEMA ve p(HEMA-MMA) biyomateryalinin insülin salınım özellikleri sürekli salınım sisteminde incelendi. İnsülin yükleme ve ilaç salınım oranı farklı koşullar altında karşılaştırıldı.

1.1.2. Kontrollü Salınım Sistemlerinin Sunduğu Avantajlar ve Dezavantajlar

Kontrollü salım sistemleri ile tek uygulamada ilacın kanda uzun süre etkin düzeyde kalması sağlanır, fizyolojik ortamda proteinler gibi kolay parçalanan ilaçlar

enzimlerin yıkıcı etkisinden korunur, hedeflemeyle hasta bölge yerine, bütün vücudun etkilenmesi önlenir, doz sayısı azaldığı için hasta uyumu artar ve hastanın bakımı kolaylaşır. Bu sistemlerin sakıncalı yanıysa, istenildiği zamanlarda tedavinin durdurulamaması olarak belirtilmiştir. Kontrollü Salım sisteminin sunduğu avantajlar; *i)* tedavi edici oranda ilaç düzeyinin sürekli korunması, *ii)* ilaç salımın belirli hücre tipi ya da dokuya hedeflenebilmesi nedeniyle zararlı etkilerin azaltılması, *iii)* gereksinim duyulan ilaç miktarının azaltılabilmesi, *iv)* önerilen ilaç rejimine hastanın uyumunu geliştirecek şekilde dozaj miktarının azaltılabilmesi ve *v)* kısa yarılanma ömrüne sahip ilaçlar (örneğin proteinler ve peptid ilaçlar) için ilaç yönetiminin kolaylaştırılması şeklinde sıralanabilir⁽²¹⁾. Ancak yinede bu tür sistemler geliştirilirken ilacı taşıyan malzemelerin ya da bozunma ürünlerinin toksitesi, hızlı ilaç salımı gibi diğer güvenlik hususları, sistemin kendisinden veya vücuda yerleşiminden kaynaklanan rahatsızlık, ilaç taşıyıcı malzemeler yada üretim süreci nedeniyle sistem maliyetinin artışı gibi noktalar göz önünde bulundurulmalıdır.

Kontrollü salım sistemlerinden birçoğunun yapıtaşı polimerlerdir ve ilaç salım hız ve süreleri polimerlerle ayarlanır. Kullanılış şekline yoluna, amacına ve ilacın özelliklerine göre bir veya birkaç polimer kullanarak sistem hazırlanır. Bazen polimerlerin sorun çıkarma ihtimali vardır. İmalat sırasında veya sonra oluşmuş çatlaklar dolayısıyla sistemin güvenilirliği de garanti edilemez. Bu çatlaklar sistem vücuda verildikten sonra istenilen anda salımın durdurulamamasına neden olurlar.

Her ilacın kontrollü salım sistemi hazırlanamayacağı gibi, her ilaca uygun tek bir hazırlama yöntemi de yoktur. Kullanılan etkin maddenin yapısına ve özelliklerine

göre hazırlama yöntemi belirlenir. Örneğin, dozu fazla olan etkin maddelerin (sülfonamidler) kontrollü salım sistemi hazırlanamaz. Yarılanma ömrü çok kısa olan ilaçlar için uygun bir dozlama şekli değildir. Yarılanma ömrü çok uzun olan ilaçların da zaten kontrollü salım şeklini hazırlamaya gerek yoktur. Yarılanma ömrü 4 saat civarında olan ilaçlar en uygun olanlarıdır.

1.1.3. Kontrollü İlaç Salım Sisteminde İlaçların Taşıyıcı İmplanttan Salım Mekanizmaları

1.1.3.1. Difüzyon- Kontrollü Sistemler

Rezervuar ya da zar kontrollü olarak adlandırılan ilaç salım cihazları ilacın ince bir polimerik zar (membran) ile çevrelendiği bir çekirdek görünümündedir. İlaç salımı zardan difüzyonla gerçekleşir.

Salınım hızı önceden programlanan ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin maddenin salım hızı, etkin maddenin suda çözünmeyen bir polimerden difüzyonuyla kontrol edilir. Etkin maddeyi içeren çekirdek, suda çözünmeyen bir membranla kaplanmıştır. Bu sistemlere *polimerik membrandan difüzyonla* salınım hızının kontrol edildiği sistemler denir. Eğer etkin madde inert polimerik bir matriksten çözündürülmüş veya dağıtılmışsa, bu sistemlerde salım hızı matriksten difüzyonla kontrol edilir.

1.1.3.1.1. Membrandan Difüzyonla Kontrol

İlaç taşıyıcı sistemin etrafı suda çözünmeyen polimer bir membranla kaplanmıştır. Etkin madde, membranın içinde dağılır. Sonra membrandan sistemi çevreleyen ortama difüze olur. Bu sistemlere '*rezervuardan difüzyonla*' salım hızını kontrol eden sistemlerde denir. Etkin maddenin şişme davranışı gösteren hidrojellerden difüzyon ile salımı, en iyi şekilde Stefan-Maxwell⁽²²⁾ veya Fick⁽²³⁾ yasası ile tanımlanmaktadır.

$$J = - D \frac{dC_m}{dx} \quad (1.1)$$

Eşitlikte J, etkin maddenin azalan konsantrasyon yönünde membrandan salımını $g.cm^{-2} / sn$ (miktar/yüzey. zaman); D, membrandan difüze olan etkin maddenin difüzyon katsayısını cm^2 / sn (alan/zaman) ve dC_m / dx ise membran içindeki ilaç konsantrasyonunun x uzaklığındaki değişimini göstermektedir.

Kontrollü salım sağlayan membrandan difüzyonla etkin madde salımının kontrol edildiği bu sistemlerde; etkin maddenin dağılıma ve difüzyon katsayıları, membranın kalınlığı saptanarak salım hızı önceden belirlenebilir. Membrandan difüzyonla salım kontrol eden sistemler sıfırıncı dereceden salım sağlarlar. Sıfırıncı dereceden salımdan saptamanın iki yolu vardır. Birinci neden, etkin maddenin membran düzeyinden uzaklaştırılması yavaş olup, etkin madde konsantrasyonu zamanla membran yüzeyinde artar. Suda çözünürlüğü sınırlı olan etkin maddeler membran yüzeyindeki doyum konsantrasyonuna ulaşarak bu noktada difüzyonu durdururlar.

Kontrollü salım sistemlerinde salım mekanizmasının açıklanmasında kullanılan bir diğer ampirik eşitlik ise Peppas ve arkadaşları tarafından fonksiyonun zamana

bağlı olduğu varsayılarak geliştirilen eşitlikdir⁽²⁴⁾.

$$M_t / M_\infty = k t^n \quad (1.2)$$

Bu eşitlikte, M_t t süresinde salınan molekülün miktarını, M_∞ salınan molekülün ortamdaki bakiye miktarı, k belirli bir system için yapısal/geometrik sabiti ve n ise salım mekanizmasını gösteren üstel büyüktür.

1.1.3.1.2. Matriksten Difüzyonla Kontrol

Etkin madde kristal yüzeyinden tekdüze matriksin içine geçer, buradan basit difüzyon işlemi ile ekstre edilir. Tamamen sink koşullardaki (etkin maddenin herhangi bir t anındaki konsantrasyonunun, doyumluk konsantrasyonundan %15 kadar daha düşük olduğu koşullar) matriksi çevreleyen sıvıya geçer. Matriksi çevreleyen sıvı, porlardan ve granüller arası boşluklardan matriksin içine geçerek ilacı çözer. Çözünen ilaç difüzyonla matriksin dışına çıkar. Granül içi difüzyonun, ihmal edilebilir düzeyde olduğu varsayılmaktadır. Salımı kontrol eden matriks homojen ve granüler yapıda olabilir.

1.1.3.2. Kimyasal-Kontrollü Sistemler

Kimyasal-kontrollü salım, salınan molekülün tanımlanması için taşıyıcı matriksin içinde oluşan reaksiyon ile kullanılır. Bu sistemlerde, polimer ile salınacak ilaç arasında gerçekleşen tersinir veya tersinmez reaksiyonların sonucunda hidrolitik veya enzimatik yolla polimer zinciri parçalanır. Kimyasal-kontrollü salımlar ilacın salımı sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyona bağlı olarak sınıflandırılabilirler.

İlaçların suda çözünebilen taşıyıcı implanta kimyasal olarak bağlanması, ilaçlara “dokuya hedefleme” ve “bağışıklık eksikliğini azaltılması” gibi yeni özellikler sağlamaktadır.

1.1.3.3. Şişme-Kontrollü Sistemler

İlacın difüzyonu hidrojelın şişme derecesinden daha hızlı olduğu durumlarda, salım sistemi şişme kontrollü salım mekanizması ile açıklanabilmektedir. Hidroksipropilmetilselüloz hidrojel tabletinden pek çok küçük ilaç molekülünün salımı genellikle bu mekanizma kullanılarak modellenmektedir⁽²⁴⁾.

1.2. İnsulin

Pankreasın β hücrelerinden salgılanan insülin, birbirine iki adet disülfid bağı ile tutunmuş 21 aminoasitli A ve 30 aminoasitli B zincirlerinden oluşmuş bir polipeptittir. 10-15 dakika içinde dolaşımdan ayrılmaktadır. Karaciğer ve daha az olarak da böbrekte parçalanmaktadır⁽²⁵⁾.

Biyokimyasal olarak en önemli hormon insülinidir. **İnsülin**, moleküler ağırlığı 5.8 kilodalton (kDa) olan, polipeptit yapılı ve vücuttaki karbonhidrat metabolizmasının regülasyonunda rol alan bir hormondur. Pankreasın Langerhans adacıklarından salgılanan insülinin adı da Latince'de "ada" anlamına gelen "*insula*" sözcüğünden türetilmiştir.

1.2.1. İnsulinin Biyosentezi ve İşlevi

Proinsulin; enoplazmik retikulumun üzerindeki ribozomlarında önce pre-proinsulin şeklinde sentezlenir; pre-proinsulin endoplazmik retikulum'un membranını geçerek redikulum lümenine gelir ve sinyal peptidini kaybeder, meydana gelen proinsülin golgi aparatında proteazların etkisi ile C peptid segmentini kaybeder. C peptidini kaybeden insulin, çinko iyonu ile veziküllerde depolanır. Uygun uyarı geldiğinde ise olgun moleküller plazma zarı ile birleşerek içeriklerini hücre dışına salarlar.

İnsulin salgılanması enerji gerektirmektedir. En önemli fizyolojik düzenleyicisi plazma glukoz seviyesinin artmasıdır⁽²⁶⁾.

Hücresel düzeyde insulin etkisinin başlamasında ilk basamak hormonun hücre reseptörüne bağlanmasıdır. İnsulin reseptörünün kendisi, hücrenin plazma membranında bulunan 2α 2β subünitinden meydana gelen tetramerik proteindir. Alfa subünitleri insulinin bağlanma noktasını oluşturan bölümdür. Alfa ve beta subünitleri birbirine disülfid bağı ile bağlıdır. Beta subünitinin transmembran bölümü sinyal iletiminden, intraselüler bölümü ise tirozin kinaz aktivitesinden sorumludur. İnsulinin bağlanmasıyla, beta subünitine bağlı tirozin kinaz aktive olur.

İnsulin başlıca anabolik hormon olup toklukta glikojen, protein ve yağ dokusu şeklinde enerji birikimini sağlar. İnsulin miktarı düşük olduğunda bu depolardan substratlar meydana gelir, dokuların glukoz alması bozulur ve kan şekeri yükselir.

İnsulinin en önemli etkisi karbohidrat metabolizması üzerinde olmaktadır. Beslenme ile kan dolaşımına katılan karbohidratlar, insulin mevcudiyetinde tüm vücut

dokularınca hızla alınıp depolanmakta ve kullanılmaktadır. Beyin dokusu diğer dokulardan farklı olarak glukozu insulin aracılığı olmadan kullanmaktadır. Beyin dokusu için kan glukoz değerinin kritik değerinin üzerinde tutulması çok önemlidir⁽²⁵⁾.

Hastalarda insulin seviyesi normal veya yüksek olabilir. Bununla birlikte kan şekeri seviyesi de yüksek olabilir. Bu durum β hücrelerinin fonksiyonunun normal olduğunu gösterir⁽²⁷⁾. Hastalarda insulin salgılanması kusurludur ve insulin direnci vardır. İnsulin direnci kilo azalması veya hipergliseminin tedavisi ile düzelebilir⁽²⁸⁾. Bunun sonucunda kan şekeri düzeyi artar. Bu hastalıkta kan şekeri, hücrelerin içine giremez ve değişik bozukluklar meydana gelebilir.

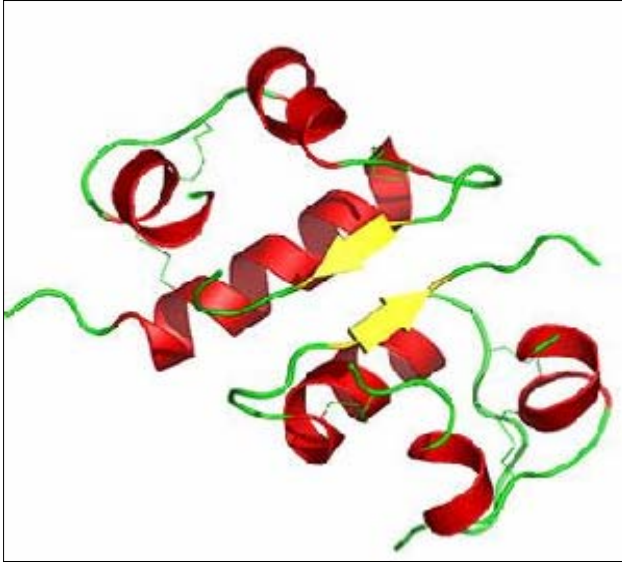
Böbrek glukoz eşliğinin azalması ile (yaklaşık 180mg/dL) glukozüri, poliüri ve elektrolit kayıpları olur. İnsulin eksikliğinin yanı sıra stres hormonlarının artışı (epinefrin, büyüme hormonu, kortizol, glukagon) metabolik bozukluğu artırır. İnsulin eksikliği sonucunda glukozun hücre içine girmesi azaldığından ve glukoz enerji için kullanılmadığından hücreler protein ve yağları kullanır. Tip I diabetin lezyonlarından biri de lipogenezin (yağ asidi sentezi) inhibe oluşudur.

Kandaki şekeri artışı kalp atış hızı artışı, kalp hastalığı, böbrek hastalığı ve sinir fonksiyonlarının azalması gibi birçok hastalığa neden olmaktadır. Hastalığın seyri sırasında retinopati, nefropati, nöropati ve ateroskleroz gibi spesifik komplikasyonlar gelişmekte ve dünyada her yıl binlerce kişi diabet komplikasyonlarından ölmektedir.

İnsulinin, karbonhidrat metabolizmasının birincil dengeleyicisi olmanın yanında, karbonhidrat metabolizması ile ilişki halinde bulunan yağ ve protein metabolizmaları üzerinde de rolü vardır ve kandaki insulin konsantrasyonu değişikliklerinin tüm bedende yaygın etkileri bulunur. Bu hormonun mutlak yokluğu, şekeri hastalığının

1. tipine; görece azlığı veya insuline karşı direnç ya da her ikisinin birlikte olması ise 2. tip şeker hastalığına yol açar. Bu doğrultuda, endüstriyel olarak üretilmiş olan insulin, 1. tip şeker hastalığında ve başka ilaçların yetersiz kaldığı 2. tip şeker hastalığı vakalarında ilaç olarak da kullanılır.

İnsulinin yapısı hayvanlar arasında göreceli küçük farklara bağlı bir çeşitlilik gösterir ve insan insulinine en benzer yapıdaki insulin, arada tek bir aminoasit biriminin farklı oluşuyla, domuz insulinidir. İnsulinin karbonhidrat metabolizması üzerindeki düzenleyici işlevinin etkinliği de insandan insana değişkenlik gösterebilmektedir.



Şekil 1.3. İnsulin molekülünün üç boyutlu yapısı

1.2.1. Diabet

Diabetes mellitus (DM) uzun dönemde ciddi komplikasyonlara yol açan, insulin

salgılanmasındaki yetersizlik ve hedef dokularda, insulinin metabolik etkisine karşı gelişen direnç hali ile karakterize edilen, belirgin biyokimyasal özelliği hiperglisemi olan, genetik kökenli kronik bir hastalıktır⁽²⁹⁾. İnsulin salgısındaki veya etkisindeki yetersizlik; karbohidrat, yağ ve protein metabolizmalarının bozulmasına yol açar. Kandaki glukoz düzeyi normalin üstündedir ve genelde ~120 mg glukoz / dL den daha yüksek olduğu bu durumda; *i*) glukozun hücre dışı sıvılardan hücre içi sıvılara geçişi kısıtlanmış *ii*) hücre içinde glukoz kullanma hızı artmış; *iii*) karaciğerde glikoneogenesis mekanizması hızlanmıştır. Uluslar arası Diabet Federasyonu verilerine göre günümüzde 150 milyon olarak hesaplanan diabetik hasta sayısının 2010 yılında 220 milyona, 2025 yılında ise 300 milyona yükseleceği öngörülmektedir. Diabet prevalansı ülkeler arasında ve etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir. Eskimolar'da veya Çin'de %1 oranında gözlenirken Arizona'daki Pima Kızılderili'lerinde %20-45'e oranına kadar çıkmaktadır. Ülkemizde TURDEP (Turkish Diabetes Epidemiology Study) çalışma verilerine göre 20 yaş ve üzeri erişkinlerde diyabet %7.2 oranında ve bozulmuş glukoz toleransı %6.7 oranında saptanmıştır⁽³⁰⁾. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir çalışmada kişinin yaşamı boyunca diyabet gelişim riski erkeklerde %33, kadınlarda %39 olarak tahmin edilmektedir⁽³¹⁾.

Kronik diabetin birçok yan etkileri olduğu rapor edilmiştir. Bunlar içinde mikroanjiopati, böbrek glomerülü ve retinada partikülizasyon, nöropati ve atherosklerozun hızlanması sayılabilir⁽³²⁾. Diabetes Mellitus genel olarak iki gruba ayrılır. Birinci grubu, pankreasın β hücrelerinin primer hasarına bağlı tam ve kısmi insulin eksikliği, ikinci grubu ise doku seviyesinde insulin direncidir. Diabetin bu iki formu genetik, patolojik, ve klinik yönleri ile birbirinden farklıdır⁽³³⁾.

Kan glukozu göreceli olarak yüksek olduğunda glukozu ait böbrek eşiği azalır ve böbreklerde düzenleyici etki gösterir. Glukoz, glomerüllerden sürekli olarak süzülürse de normalde renal tübüllerden tümüyle geri emilir. Glukozun bir derişim gradiyentine karşı geri emilmesi tübül hücrelerine ATP sağlanmasına bağlıdır.

Tübüler sistemin glukozu geri emme hızı yaklaşık 850 mg/dak'dır. Kan glukoz düzeyi yükseldiğinde glomerül süzüntüsüne emilebileceğinden daha fazla glukoz geçer. Buna glukozüri denir. Glukozüri, DM varlığının göstergesidir⁽²⁶⁾.

Diabetin uzun dönem komplikasyonlarından biri olan nefropati, diabetteki ölüm nedenleri arasında miyokard enfaktüsünden sonra ikinci sırada gelmektedir. Nefropati gelişiminde böbrekte glomerüllerde bazal membran kalınlaşması, mezangiyal hücre proliferasyonu, mezangiumda konsantrik tabakalar şeklinde matriks depolanması olur. Bunun sonucunda glomerüler yapılarda bozulma ve albuminüri görülür.

1.2.2.1. Diabetin Önlenmesi

Tip 1 diabet genetik faktörlerin varlığında çevresel etkilerle başlayan β hücre harabiyeti sonucu gelişmektedir⁽³⁴⁾. Diabetin ortaya çıkmasında bir tek genin etkili olmadığı, hastalığın birden fazla genle ilgili olduğu düşünülmektedir. Her yaşta başlayabileceği biliniyorsa da genellikle erken yaşlarda görülür. Bu tipte insülin salgılanması yetersizdir. Hastaların yaşamlarını sürdürebilmeleri ve ketozisten korunabilmesi için insülin gereksinimleri vardır. İnsülin eksikliğinin yanı sıra stres hormonlarının artışı (epinefrin, büyüme hormonu, kortizol, glukagon) metabolik bozukluğu artırır. İnsülin eksikliği sonucunda glukozun hücre içine girmesi

azaldığından ve glukoz enerji için kullanılmadığından hücreler protein ve yağları kullanır. Tip I diabetin lezyonlarından biri de lipogenezin (yağ asidi sentezi) inhibe oluşudur⁽²⁶⁾.

Bozulmuş insülin sekresyonu ya da insülin direnci tip 2 DM gelişiminin altında yatan temel sebeptir⁽³⁵⁾. İnsülin direnci; eksojen ve endojen insülinin etkilerine biyolojik yanıtın bozukluğu anlamına gelir ve tip 2 DM'nin patofizyolojisinde sebeplerden biri olarak yer alır ve dünyada en sık rastlanan diabet formudur. İnsülinin sentez, salgı ve depolanmasında bir problem olmadığı halde periferik dokularda insüline karşı bir direnç mevcuttur⁽³⁶⁾. Tip 2 diabetin tedavisi için yapılan araştırmalar halen devam etmekle birlikte günümüzde kullanılan en önemli yöntemler; egzersiz, ilaç teavisi ve kilo kaybıdır. 2001 yılında yapılan Finnish Diabetes Prevention Study (DPS) sonuçlarında diyet ve egzersiz uygulanan BGT bulunan 522 kişi ortalama 3,2 yıl takip edilmiştir. Sonuçta bu kişilerin %58'inde diabet riskinin azaldığı gözlenmiştir.

1.2.3. İnsülin Hormonunun Salımı

Glukoz, aminoasit ve lipidler gibi besin maddelerinin hücre içinde depolanmasını ve kullanılmasını sağlayan anabolik bir hormon olan insülin salımı olduğunda; plazma karbonhidrat, protein, yağ ve K^+ düzeyini düşürür. İnsülinin salınımında en önemli faktör; ATP- bağımlı K^+ kanallarıdır. İnsülin salımı için ATP' nin varlığı önemlidir. GLUT-II (glukoz transporter II aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyon) aracılığıyla beta-hücreleri içine giren glukoz glukokinaz enzimi ile yıkılır ve hücre içinde ATP düzeyi yükselir. Bu durum ATP- bağımlı K^+ kanallarını kapatarak depolarizasyona neden olur. Depolarizasyon membrandaki voltaj- bağımlı Ca kanallarını açarak, dışarıdan

içeriye giren Ca^{++} aracılığıyla insulin salgılanmasını artırır.

İnsulin bifazik bir salınımı gösterir: Önce hızlı ve kısa süren bir salınım (→ depo insulin) ve sonra ise salınım hızı azalır. Daha sonra bu azalmayı takiben uzun süreli bir yeniden salınım gerçekleşir (→ yeni sentezlenen insulin). Bazal durumda, normal bir kişide (16 saat açlıkta) plazma insulin konsantrasyonu: 5- 15 μ U/ml'dir. İnsulin parsiyel eksositoz ile salınırken beraberinde; çinko, proinsulin ve C-peptid de salınır. C-peptidin varlığı endojen insulini eksojenden ayırt etmek için önemlidir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyaller

2-Hydroxyethylmetakrilat (HEMA), metil methacrylate (MMA), N,N methilen bisakrilamit, polietilenglikol (PEG) and α - α' -azobisisobutyronitrile (AIBN) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) firmasından temin edildi. İnsan serum albumini, fibrinojen, γ -globulin, sığır serum albumini Sigma-Aldrich'dan elde edildi. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi.

Çalışmamızın her aşamasında kullanılan su, Barnstead (Dubuque, IA, USA) ROpure LP marka ters ozmoz, Barnstead D3804 NANOpure organik/kolloid uzaklaştırıcı yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) üniteleri ve iyon-değişimi dolgulu yatak kolonundan oluşan ultra-saf su sisteminden elde edildi.

2.2. Biyomateryallerin Sentezi

Monomer oranınının 1:0 – 0:1 (v/v) olarak kullanıldığı HEMA ve MMA monomerleri, N,N,metilenbisakrilamit çapraz bağlayıcısı (10 mg) ve amonyum persülfat başlatıcısı (5 mg) varlığında hazırlanan polimerizasyon karışımına, sentezlenecek taşıyıcı implantın biyouyumluluk özelliğini iyileştirmek amacı ile, 5 mg HSA ve 10 mg polietilen glikol yapıya eklendi ve polimer çözeltisinden 2 dakika süresince azot gazı geçirildi. Hızlandırıcı olarak %10'luk TEMED eklenen polimerizasyon karışımı içerisinde 1 dakika süresi boyunca azot gazı geçirilerek, 0.3 cm çapındaki ve 5.0 cm uzunluğundaki silindir kalıplara dökülerek, oda sıcaklığında UV ışığı

fotopolimerizasyonu yöntemi ile sentezlendi.

Kontrollü ilaç salım sisteminde kullanılmak üzere polimerik taşıyıcı implantın (biyomateryalin) farklı miktarda insulin hormonu yüklü eşlenikleri, yukarıda verilen aynı koşullarda UV ışığı fotopolimerizasyonu ile sentezlendi. Polimerizasyon sonucunda oluşan silindirik biçimdeki polimerik taşıyıcılar damıtık su ile yıkanarak kullanılana kadar 4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

2.3. Biyomateryalin Karakterizasyonu

Biyolojik olarak aktif protein, hormon veya ilaçların kontrollü salımı için tasarlanan sistemler, uygun yüzey morfolojisine sahip olmalıdır. Yüzey alanı ilaç salım oranını belirleyen önemli faktörlerden biridir⁽³⁷⁾. Gözeneksiz biyomateryaller ile geliştirilen sistemlerde ilaç salım oranının oldukça düşük olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda geliştirdiğimiz salım sisteminin yüzey morfolojisini incelemek için, taşıyıcı sistemlerinin SEM mikrografları JEOL marka (Model, JSM 5600, Japonya) Taramalı Elektron Mikroskobu ile elde edildi.

Spesifik yüzey alanı ve gözenekliliği, BET yöntemi ile belirlendi. Yoğunluğu polimerin çözünmediği bir sıvı içerisinde piknometre ile belirlendi. Hidrojelin ıslak durumdaki kalınlığı ise dijital kumpas ile ölçüldü.

Taşıyıcı polimerlerin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi kullanılarak alındı. Kuru hidrojel, KBr ile karıştırılarak pelet hale getirildi ve FTIR spektrumları elde edildi. MMA'in yapıya katılması, spektrumunda kontrol amaçlı kullanılan PHEMA

spektrumundan oluşan farklı fonksiyonel gruplara ait bandlar sayesinde tespit edildi.

p(HEMA-MMA) membranların ıslak durumdaki kalınlığı dijital kumpas yardımı ile belirlendi.

Silindir biçimindeki hidrojelın yoğunluğu piknometre yardımıyla membranlar için çözücü olmayan bir sıvı (n-dekan) kullanılarak yapıldı.

pHEMA ve p(HEMA-MMA) taşıyıcı implantlarının mekanik dayanımı DSC (Differential Scanning Calorimetry) (Model DSC-60-DTG-60H, Shimadzu, Japan) analiz ile belirlendi.

Hidrojel yapıdaki biyomateryalin şişme özelliği tuz çözeltisi (% 0.85, NaCl) içerisinde oda sıcaklığında tampon sistemi içerisinde (pH 2.5-7.5) gravimetrik yöntemle belirlendi. Çözelti pH'sı direkt olarak ölçülerek ve iyonik şiddet 0.2'ye ayarlanarak sabit tutuldu. İlk olarak örnekler şişme ortamına yerleştirilerek denge anından sonra ortam değiştirildi. Biyomateryalin şişme oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ Denge su içeriği (w/w)} = [(W_d - W_k) / W_k] \times 100 \quad (2.1)$$

Burada, W_k kuru hidrojel ağırlığı, W_d ise denge su içeriğine ulaşmış hidrojelın ağırlığıdır.

2.3.1. Temas Açısı ve Yüzey Serbest Enejisi

Temas açısı ölçümleri test edilen biyomateryalin serbest yüzey enerjisini ve

polariteyi tanımlamak için kullanılmaktadır. Hidrojel örnekleri kurutulduktan sonra, farklı test sıvılarının (su, gliserol ve diiyodometan) temas açısı değerleri, 25°C'de durgun damla yöntemiyle, dijital optik temas açısı ölçer cihazı CAM 200 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finlandiya) kullanılarak belirlendi. Polimer yüzeyinde, mikro şırınga yardımı ile bir damla oluşturularak sağ ve sol temas açıları ve damla boyut parametreleri dijital görüntüden otomatik olarak hesaplandı. Ölçümler, en az 15 temas açısının ortalaması alınarak değerlendirildi.

Katı yüzeyinin bir sıvıyla ıslatılması ve temas açısı (θ) kavramı, ilk olarak Young tarafından formüle edilmiştir⁽³⁸⁾.

$$\gamma_l \cos \theta = \gamma_s - \gamma_{sl} \quad (2.2)$$

Burada γ_l sıvının yüzey enerjisi, γ_{sl} katı/sıvı arayüzeyinin, arayüzey enerjisi ve γ_s katının yüzey enerjisidir. Temas açısı verilerinden yüzey enerjisinin (bazen katı yüzey gerilimi olarak tanımlanır) belirlenmesi için kararlaştırılmış tek bir yaklaşım yoktur⁽³⁹⁾.

Bu sonuçlar, dört yöntemle göre analiz edilirler⁽⁴⁰⁻⁴³⁾.

- (a) Zisman'ın kritik yüzey gerilimi
- (b) Fowkes'un geometrik ifadesi
- (c) Wu'nun harmonik ifadesi
- (d) van Oss'un asit-bazı

2.3.1.1 Kritik Yüzey Gerilimi (Zisman Yöntemi)

Kritik yüzey gerilimini (γ) belirlemek için, Zisman tarafından geliştirilen, deneysel bir yöntemdir. Bu yöntemde, farklı sıvıların temas açısının θ kosinüsü ölçülür ve eşitlik 2.3'e göre sıvıların yüzey gerilimine karşı grafiğe geçirilir.

$$\cos \theta = 1 - b (\gamma_l - \gamma_s) \quad (2.3)$$

Burada b, korrelasyon çizgisinin eğimidir.

Verilerin, verilen γ değerinde, $\cos \theta = 1$ 'e yaklaşan bir doğru verdiği bulunmuştur. Bu çoğunlukla, bir sıvının, katı yüzeyini tamamen ıslatan, en yüksek yüzey gerilimi değeri olarak tanımlanır. Bu teorik "sıvı" yüzey gerilimi, γ 'ya eşittir ve katının yüzeyini karakterize etmek için kullanılır.

2.3.1.2. Geometrik İfade (Fowkes Yöntemi)

Bu yaklaşım yüzey enerjisini dispersif ve polar olarak, iki bileşene böler ve bunların katkılarının birleştirilmesi için geometrik bir yaklaşım kullanır.

Young eşitliği ile birleştirildiğinde, sonuç eşitlik şu şekildedir:

$$\gamma_l (1 + \cos \theta) = 2 [(\gamma_l^p \gamma_s^p)^{1/2} + (\gamma_l^d \gamma_s^d)^{1/2}] \quad (2.4)$$

Burada, θ temas açısıdır, γ_l ve γ_s sırasıyla, sıvı ve katı yüzey gerilimi ya da serbest yüzey enerjisidir. Üst indisteki d ve p, her birinin dispersif ve polar bileşenlerini göstermektedir. Katı yüzey geriliminin bileşenleri, Owens ve Wendt'e göre, $(\gamma_l^p)^{1/2} / (\gamma_l^d)^{1/2}$ 'ye karşı $\gamma_l (1 + \cos \theta) / (\gamma_l^d)^{1/2}$ 'nin grafiğe geçirilmesi ile eğimden, $(\gamma_s^p)^{1/2}$ ve kayma değerinden de, $(\gamma_s^d)^{1/2}$ parametreleri hesaplanır. Toplam serbest enerji (γ_s), iki bileşen kuvvetinin toplamıdır [$\gamma_s = (\gamma_s^d + \gamma_s^p)$].

2.3.1.3. Harmonik İfade (Wu Yöntemi)

Bu yöntem benzer bir yaklaşım kullanır fakat dispersif ve polar katkıların toplamı için harmonik bir ifade eşitliği kullanır. γ^d ve γ^p değerleri bilinen iki sıvı için temas açıları ölçülür ve her bir deneyin değeri, aşağıdaki eşitlikte yerine konulur.

$$\gamma_l (1 + \cos \theta) = 4 \left[\frac{(\gamma_l^d - \gamma_s^d)}{(\gamma_l^d + \gamma_s^d)} + \frac{(\gamma_l^p - \gamma_s^p)}{(\gamma_l^p + \gamma_s^p)} \right] \quad (2.5)$$

Yüzey polaritesi, X^p , şu şekilde verilir:

$$X^p = \gamma_s^p / \gamma_s \quad (2.6)$$

2.3.1.4. Asit-Baz (van Oss Yöntemi)

Bu yöntemde, γ^d , γ^+ ve γ^- değerleri bilinen en az üç sıvı için temas açısı ölçülür. Burada üst indisler (d), (+) ve (-) sırasıyla, dispersif, Lewis asit ve baz bileşenlerini ifade eder. Her deneyin değerleri, aşağıdaki eşitlikte yerine konulur.

$$(1 + \cos \theta) \gamma_l = 2 \left[(\gamma_s^{LW} \times \gamma_l^{LW})^{1/2} + (\gamma_s^+ \times \gamma_l^-)^{1/2} + (\gamma_s^- \times \gamma_l^+)^{1/2} \right] \quad (2.7)$$

Toplam yüzey enerjisi γ_s , Lifshitz- van der Walls ve Lewis asit ve baz bileşenlerinin toplamı olarak verilir.

$$\gamma_s = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (2.8)$$

Burada, γ_s^{LW} , uzun mesafeli etkileşimleri gösteren (dispersif etkileşim, dipol-dipol etkileşim ve dipol-indüklenmiş dipol etkileşimini içerir, dispersiyon baskın durumdadır) diiyodometan (DIM) ile temas açısının ölçülmesinden hesaplanan Lifshitz-van der Walls etkileşimini belirtir, γ_s^{AB} ise hidrojen bağları gibi asit-baz etkileşimlerini belirtir ve γ^+ ve γ^- sırasıyla, proton ve elektron veren karakteri

göstermektedir.

2.4. Serum Proteinleri Adsorpsiyonu

Kan örnekleri, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesinden günlük olarak temin edildi. Kan örneklerinden, kan hücreleri, 3000 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilerek ayrıştırıldı. pHEMA ve p(HEMA-MMA) biyomateryallerinin kan uyumluluğunu saptamak için, 1/5 oranında fosfat tamponunda seyreltilmiş insan kan serumu içerisine aktarıldı (7.5 ml, 50 mM, pH 7.4) ve 37°C'de 120 dakika manyetik karıştırmalı hücrelerde kan serumu ile temasları sağlandı. Serum proteinlerinin adsorpsiyonu kesikli sistemde çalışıldı. Her bir protein için belirli başlangıç konsantrasyonunda çalışıldı. Taşıyıcı implanta adsorplanan protein miktarı flurosans spektrofotometre kullanılarak (Jasco, FP-750, Tokyo, Japonya) belirlendi⁽⁴⁴⁾.

2.5. Kan Uyumluluk Analizi

pHEMA, p(HEMA-MMA) taşıyıcı implantları, 0.5 cm boyunda kesilerek, %0.85 NaCl çözeltisi içinde dengeye getirildi. Sağlıklı bir bireyden alınan venöz kan örneği, 1/9 oranında olacak şekilde, sodyum sitratla karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek, plazması elde edildi. Sodyum sitratlı plazmadan, 300 µl alınarak, polimer tüpleriyle temas ettirildi ve 1 saat inkübe edildi. Kontrol olarak, polimerlerle temas etmemiş plazma kullanıldı⁽⁴⁵⁾.

2.6. İnvitro Salım Çalışmaları

Taşıyıcı destek materyaline insulin hormonunun kontrollü salımının incelenmesi için hazırlanan matriks içi tutuklama yolu ile insulin yüklendi. Bu amaçla, PEO ve albumin içeren farklı monomer oranlarına sahip taşıyıcı polimerik implantlara farklı oranda insülin (25, 50 ve 75 U/ml) yüklemesi yapılarak sistem parametrelerinin salım profiline ve kinetiğine etkisi araştırıldı. Taşıyıcı implanta yüklenen insulin miktarı, standart BSA kalibrasyon eğrisinin elde edildiği Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. İnsulin hormonu yüklü biyomateryaller sürekli sistem reaktörüne yerleştirilerek sisteme sabit akış hızında, peristaltik pompa ile (Ismatec, IPG Model, Almanya) fizyolojik tampon çözeltisi girişi sağlandı. Belirli zaman aralıklarında alınan örneklerle salınan hormon miktarı spektrofotometre ile (Shimadzu, Model 1601, Japonya), 280 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak takip edilerek belirlendi.

2.7. Biyouyumlu Taşıyıcı İmplanttan İnsulinin Salım Mekanizması

Çalışmamızda pHEMA ve p(HEMA-MMA) taşıyıcı implantlarından salınan insulin hormonunun salım kinetiği ve mekanizması aşağıda verilen eşitliklerden elde edilen verilerle açıklanmaya çalışıldı.

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde ilacın salım kinetiğinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılan matematiksel modelleme 2.9 eşitliği ile gösterilen birinci derece eşitliğidir⁽²⁴⁾.

$$D_t = k_0 t \quad (2.9)$$

Bu eşitlikte D_t , t anında salınan ilacın kütlesini; k_0 , birinci derece salım hız sabitini göstermektedir.

Kontrollü ilaç salım sistemlerinde salım mekanizmasının aydınlatılmasında kullanılan bir diğer kinetik eşitlik Kuvvet Yasasıdır^(46,47).

$$M_t = M_\alpha k_p t^n \quad (2.10)$$

Eşitlikte M_t , salınan ilacın kütlesini; M_α , denge ye ulaşılan zamanda salınan ilacın kütlesini; k_p , yasanın kinetik sabitini ve n , salım bileşenini oluşturmaktadır.

Çözünmeyen ve biyolojik olarak bozunmayan matrislerden ilaçların difüzyon kontrollü salımı için Higuchi Eşitliği kullanılmaktadır. Matrisin homojen veya heterojen oluşu ve matrisin geometrisi gibi koşullara bağlı olarak Higuchi Eşitliğinin farklı formülasyonları kullanılmaktadır⁽⁴⁸⁾. Homojen matrikse sahip olan düzlemsel bir sistemden aktif maddenin salımına ilişkin Higuchi eşitliği aşağıda ifade edildiği şekli ile veya daha basitleştirilmiş olarak 2.12 eşitliği ile verilmektedir.

$$Q = (DC (2A-C)t)^{1/2} \quad (2.11)$$

$$Q = k_H t^{1/2} \quad (2.12)$$

Eşitlikte yer alan Q , t anında birim yüzey alanı başına salınan ilaç miktarı (mg cm^{-2}); D , matrisdeki maddenin difüzyon katsayısı (cm^2/zaman); C , matrisdeki maddenin çözünürlüğü (mg cm^{-3}); A , birim hacim başına başlangıçta yüklenen madde miktarı (mg); t , zaman (gün); k_H , Hugichi salım hız sabitidir ($\text{mg cm}^{-2} \text{ t}^{1/2}$).

3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kontrollü ilaç salım kavramı, çeşitli hastalıkları etkili bir şekilde kontrol etme ihtiyacından ortaya çıkmıştır. Lokal-spesifik kontrollü salınım sistemi, klasik ilaç dağılım sisteminden daha farklı avantajlar sağlar. Bunlardan bazıları ilacın vücudun belirli bölümlerine lokalize dağılımı, noktural fazda tedavinin devamlılığında güvenilirlik, ilaç karalılığı, tedavinin tamamlanmasındaki ihtiyacın azalması ve optimum ilaç adsorpsiyonudur⁽⁴⁹⁾.

Son yıllardaki en önemli uygulamalar arasında eczacılık alanında, kontrollü ilaç salım sistemleri çalışmalarıdır. Kontrollü salım sistemlerinde istenilen dozda ilacın plazma içerisinde düzeyi istenilen süre kadar sabit kalması sağlanmaktadır. Bu yolla, sürekli ilaç, hormon ve protein alma gereksinimi ortadan kalkmaktadır. Kontrollü salım sistemlerinden birçoğunun yapıtaşı polimerlerdir ve ilaç salım hız ve süreleri polimerik implantın dizaynı ile ayarlanır. Kullanılış şekli, amacı ve ilacın özelliklerine göre bir veya birkaç polimer kullanarak kompozit sistem hazırlanabilir. Bu doğrultuda, akrilat kökenli hidrojel yapıları polimerik materyaller yumuşak doku implantasyonları, salım sistemleri (hormon, protein ve ilaç) için taşıyıcı implant olarak kullanılmaktadır. Örnek olarak insülin salımı verilebilir. Şeker hastalarında, kandaki glukoz seviyesine göre insülin salımını kontrol eden sistemler en önemli uygulamadır. İnsulin salımının kontrolü, glukoz seviyesinde artma olduğunda daha fazla insulin salabilen akıllı hidrojellerin yardımıyla başarılabilmektedir. Pek çok glukoz-cevaplı hidrojel sistemi, pH'a duyarlı polimerlerden hazırlanmaktadır⁽⁵⁰⁾.

Tıbbi uygulamalarda en yaygın olarak kullanılan hidrojel, çapraz-bağlı pHEMA'dır. Sahip olduğu su içeriği nedeniyle, doğal dokulara büyük bir benzerlik gösterir. Normal biyolojik reaksiyonlarda inert'tir. Bozunmaya dirençlidir, vücut tarafından emilmez, ısı ile steril edilebilir, çok değişik şekil ve biçimlerde hazırlanabilir^(15,19,44). Tıbbi öneme sahip diğer hidrojel, poliakrilamid'dir. HEMA ve akrilamid monomerlerinin yanısıra, N-vinil-2-pirolidon (NVP), metakrilik asit (MAA), metil metakrilat (MMA) ve maleik anhidrit (MAH) tıp amaçlı hidrojel formülasyonlarında sıklıkla yer alırlar. Ayrıca, istenilen özelliklerin kazandırılabilmesi amacıyla hidrojeller çeşitli malzemele birleştirilebilirler.

Bu tez kapsamında, protein adsorpsiyonuna karşı dirençli ve kan uyumluluk özelliği artırılarak insülin hormonunun kontrollü salımında kullanılmak üzere pHEMA temelli yeni bir taşıyıcı implant sisteminin geliştirilmesi tasarlandı. İnsülin, karın içinde bulunan pankreas bezinden salgılanan ve kan şekerinin normal seviyeler içinde kalmasını sağlayan hormon olup yeterli salgılanmadığında ileride tedavisi ve geri dönüşümü mümkün olmayan kusurlara neden olmaktadır. İnsülin hormonu seviyeleri arttığında hipertansiyon gelişme riskinin ve damarlarda pıhtı oluşma riskinin arttığı bilinmektedir. Polimerizasyon işleminin optimizasyonu sonucunda sentezlenen salım sistemi taşıyıcı implantının karakterizasyonu ve farklı oranlarda yüklenilecek insülin hormonunun salım kinetiği ve mekanizmasının aydınlatılması çalışmalarını tamamlanması hedeflenmektedir.

Membran yapıdaki taşıyıcı destek materyalinin hazırlanışında, polimerin kontrollü ilaç salım sisteminde kullanılabilecek özelliklere sahip olması gerekliliği ön planda tutulmalıdır. Polimerler doğal olabilir ya da uygun özellikler kazandırılarak sentetik ve/veya kompozit materyal olarak hazırlanabilir.

Çalışmamızda bu özellikleri taşıması hedeflenen hidrojel yapıdaki pHEMA temelli kompozit membranları, UV fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlendi⁽¹⁹⁾. Kontrollü salım sisteminde taşıyıcı olarak sentezlenen pHEMA ve p(HEMA-MMA) hidrojelinin biyouyumluluğunu ve ilaç salım sisteminde hedeflenen etkin dozlamayı gerçekleştirebilmek amacı ile insan serum albumini ve polietilen glikol yapıya eklendi.

Yeni hazırlanacak bu biyomateryalin hazırlanmasında herhangi bir aktivasyon ve/veya modifikasyon gerektirmeksizin kısa sürede ve dolayısı ile düşük işlem maliyeti gerektirmesi prensibi temel hedef olarak düşünüldü. Polimerizasyon işleminin kısa sürede ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi, kompozit hidrojele yüklenecek insulin hormonu biyoaktif maddesinin yapısında herhangi bir deformasyon gerçekleşmemesi ve dolayısı ile aktifliğini koruması bu çalışmanın sunacağı diğer avantajlar olarak planlandı.

3.1. Biyomateryalin Karakterizasyonu

Kontrollü salım sisteminde kullanılacak taşıyıcı implantın polimerizasyonun ilk aşamasında çapraz bağlayıcı olarak kullanılan bisakrilamit oranı ve redoks başlatıcısı olarak kullanılan amonyum persülfat miktarlarının optimizasyonu yapıldı. Sonraki aşamada ise, elde edilen optimize değerler varlığında kopolimer membranı oluşturan HEMA:MMA komonomer oranı 0:1 ile 1:0 (v/v) arasında değiştirilerek hidrojel oluşumu, hazırlanan kompozisyondaki membranların yeterli mekanik güce etkisi deneysel işletim koşulları altında incelendi. Çalışmamızda sentetik bir polimer olan p(HEMA-MMA) membranının mekanik gücünün komonomer oranına bağlı olarak

değiştii gözlendi (Çizelge 3.1). Monomer oranını 1:1 olan p(HEMA-MMA büyük harf C ile simgelenen membran kompozisyonu yeterli mekanik dayanıma sahip olduğundan çalışmanın bundan sonraki aşamalarında kullanıldı.

Çizelge 3.1. Farklı MMA oranlarında sentezlenen kompozit hidrojinin mekanik dayanıklılığına membran hazırlama kompozisyonunun etkisi

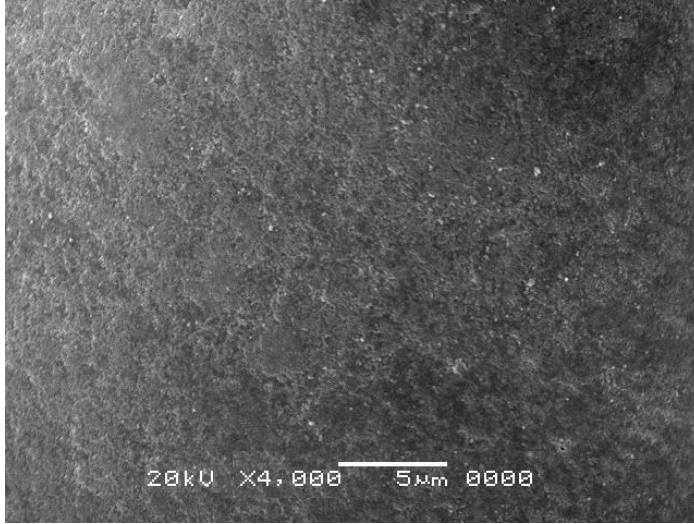
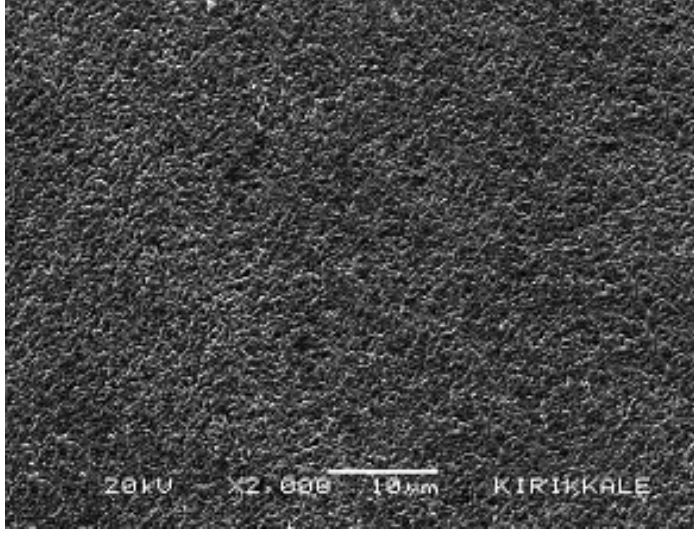
HEMA:MMA oranı (v/v)	Polimerizasyon	Mekanik dayanıklılık
A)1.00:0.00	+	Orta
B) 1.00:0.25	+	Orta
C) 1.00:0.50	+	Yeterli
D) 1.00:1.00	+	Yeterli
E) 0.00:1.00	-	Yetersiz
F) 0.25:1.0	-	Yetersiz
G) 0.5:1.0	-	Yetersiz

Destek Materyalinin ıslak durumdaki kalınlığı dijital kumpas yardımı ile 2.63 mm olarak kaydedildi. Membran yapıdaki taşıyıcı implantın yoğunluğu Gay Lussac piknometresi yardımıyla materyal için çözücü olmayan bir sıvı (n-dekan) kullanılarak yapıldı. Hidrojin yoğunluğunun 1.06 g/cm³ olduğu bulundu.

30 °C sıcaklıktaki vakum etüvünde kurutulan kompozit hidrojel azaltılmış

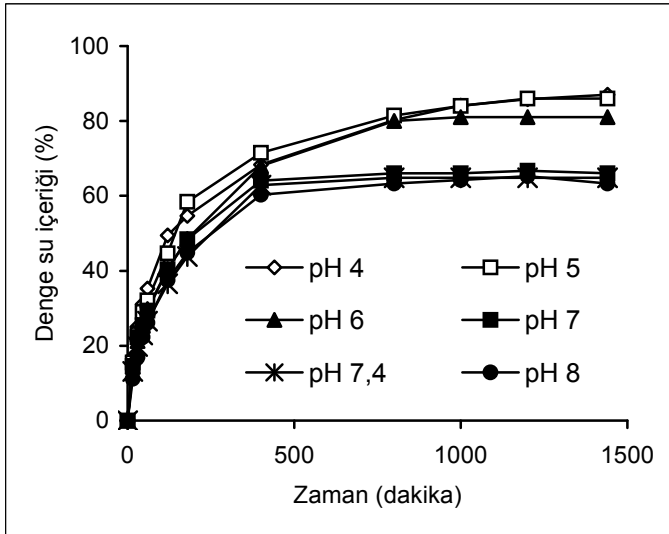
basınç altında altın ile kaplandı ve membranların elektron mikrografları JEOL (JSM 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi. Kompozit membranın bileşenlerinden biri olan 2-hidroksietilmetakrilat monomeri materyalin yeteri mekanik güce sahip olmasını sağlamanın yanısıra polimerizasyon karışımına eklenen gözenek ayarlayıcı ajanlarının konsantrasyonu tarafından da gözenek boyutları ayarlanabilir bir özellik sunmaktadır.

Başarılı bir kontrollü salım taşıyıcı sistem tasarımında biyomateryal yüzeyinin uygun morfolojide olması gerekmektedir. Hidrojel yapıdaki taşıyıcı implantın SEM mikrograflarından düzgün bir yüzeye sahip olduğu görülmektedir (Şekil 3.1). 4000 büyütme görüntüsünden de gözeneksiz düz bir yapıya sahip olduğu görüldü. Bu özellik biyomateryalin ilaç salım hızının oldukça yavaş ve kontrollü olmasını sağlayacaktır. Kompozit membrana ilaç yüklemeyen sonra deformasyon ve dolayısı ile pürüzlü bir yüzey kazandırmıştır.



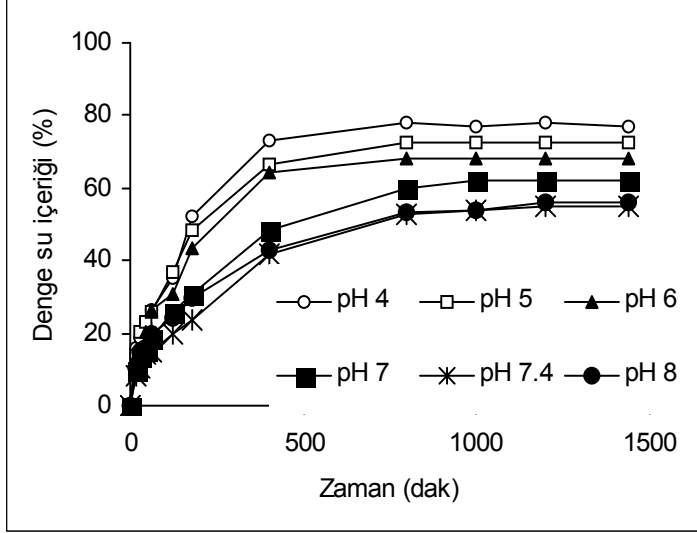
Şekil 3.1. Kontrollü salım sisteminde kullanılan taşıyıcı implantın SEM görüntüsü

Son yıllarda hem bilimsel hem de teknolojik açıdan önemi gittikçe artan hidrojel, suda şişebilen, üç boyutlu hidrofilik ağ yapılarıdır. Hidrojeller, yapılarında çok fazla miktarda su içermeleri, yumuşak ve esnek yapıları gibi sahip oldukları birçok fiziksel özellikleri açısından canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük benzerlik göstermektedir. İnsülin salımında kullanılmak üzere hazırlanan pHEMA ve p(HEMA-MMA) hidrojelinin 25 °C'da, farklı ortam tampon sistemleri içerisindeki denge şişme yüzdesi görülmektedir (Şekil 3.2, Şekil 3.3). p(HEMA-MMA) kopolimer hidrojelinin fizyolojik fosfat tamponu içerisinde denge su içeriğinin pHEMA ile kıyaslandığında düşük olduğu gözlenmiştir.



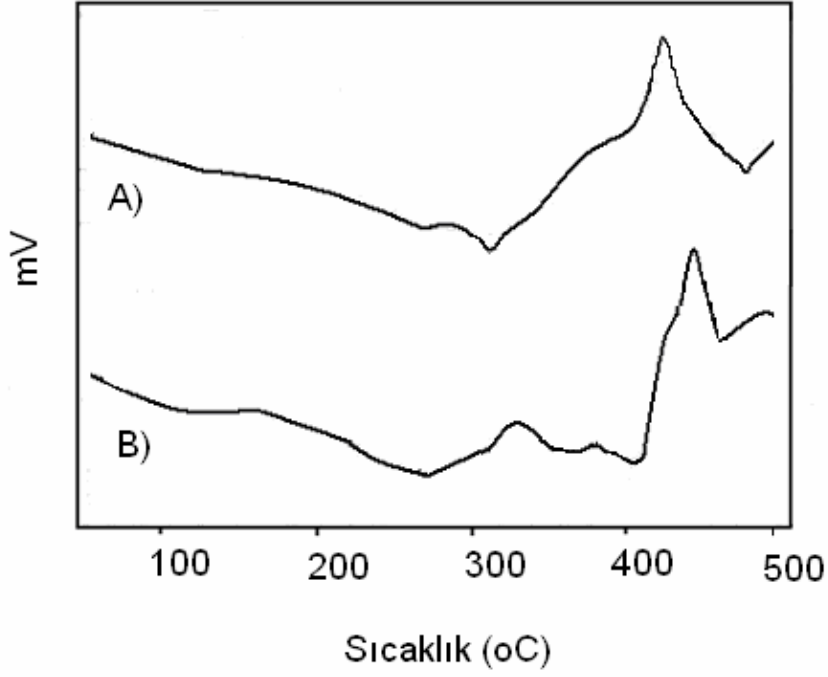
Şekil 3.2. pHEMA hidrojelinin farklı tampon sistemlerindeki şişme

Davranışı



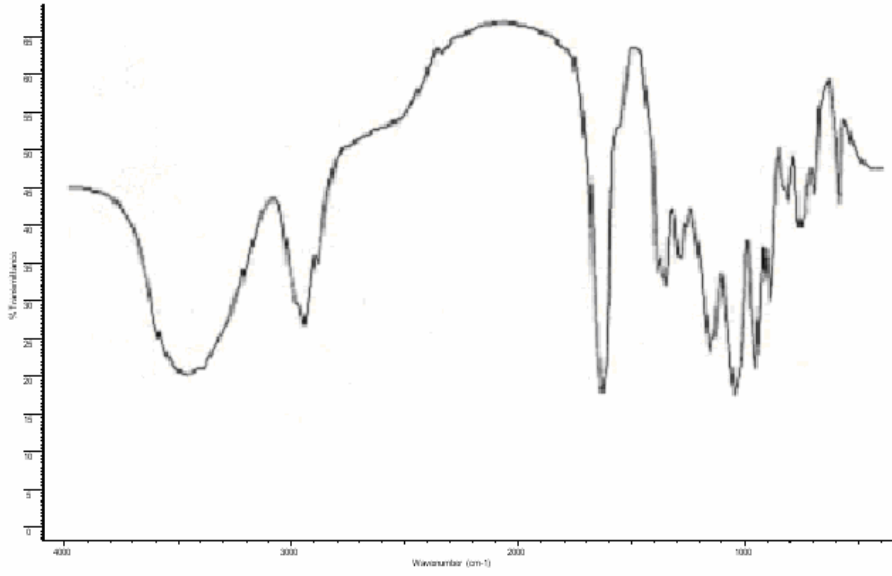
Şekil 3.3. pHEMA-MMA hidrojelinin farklı tampon sistemlerindeki şişme davranışı

İlaçların kontrollü salınımı, polimerin yapısına ve polimer esnekliğine bağlı bir parametre olan camsı geçiş sıcaklık (T_g) değerine bağlı olarak değişmektedir. Polimerde polar grupların olması T_g değerini yükseltir çünkü ana zincir etrafındaki hareket azalmaktadır. Polimerin T_g değeri DSC ve DTA analizleri ile ölçülmektedir⁽⁵¹⁾. DSC analizleri azot atmosferi altında $10^\circ\text{C}/\text{dk}$ ısıtma oranında, elde edilen veriler, kopolimerizasyonunun termal kararlılıkları üzerine etkisinin değerlendirilmesinde kullanıldı. pHEMA hidrojelinin yapısına MMA komonomerinin katılması ile termal kararlılığın azaldığı görülmüştür (Şekil 3.4).

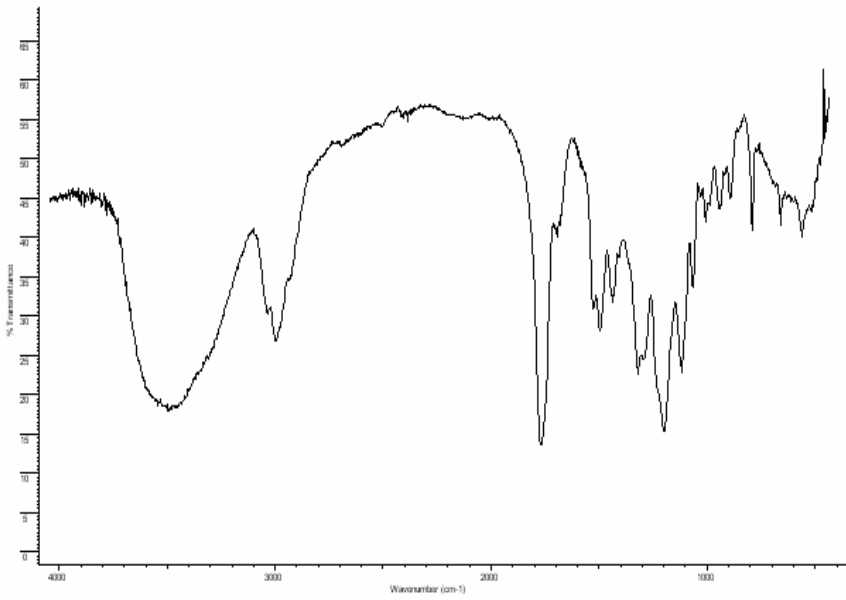


Şekil 3.4. pHEMA (A) ve p(HEMA-MMA) (B) hidrojenlerinin DSC grafiği

pHEMA ve p(HEMA-MMA) membranı için elde edilen FTIR spektrumu Şekil 3.5 ve 3.6'da sunuldu. Spektrumdan görüldüğü gibi, $\sim 2945 \text{ cm}^{-1}$ de görülen metilen titreşimleridir. 1720 cm^{-1} 'de görülen titreşim hidroksietil metakrilat ve metil metakrilat'ın ester konfigürasyonunu ifade eden absorpsiyon pikleridir. $3550, 1720 \text{ cm}^{-1}$ deki absorpsiyon bantları C=O piki, 1275 cm^{-1} deki C-O karakteristik piki, 1450 'deki C-H gerilim ve titreşim bantlarına ait piklerdir. 3550 cm^{-1} ve 1720 cm^{-1} 'deki pikler sırası ile, biyomateryalin sahip olduğu O-H grubunun ve ester gruplarından ileri gelen C=O gerilme titreşimine ait karakteristik bantlardır. 1600 ve 1200 cm^{-1} aralığındaki bazı bantlar PEG ait parmak izi bölgesi pikleridir.



Şekil 3.5. pHEMA hidrojelinin FTIR spektrumu



Şekil 3.6. p(HEMA-MMA) hidrojelinin FTIR spektrumu

Islatma gücünün değişimi, yüzey tabakası kalınlığındaki (en az 10Å) ve sıvı fazla doğrudan temasındaki, fonksiyonel grupların etkisini yansıttığından yüzey karakteristiklerine, oldukça fazla hassastır. pHEMA ve p(HEMA-MMA) poliremik yapılarına farklı test sıvısı (su, gliserol, diiyodometan) damlatılarak, ölçülen temas açısı değerleri, durgun damla metoduyla belirlendi ve Çizelge 3.2’de verildi. Young eşitliğine göre, daha küçük yüzey gerilimli deneme sıvıları ile ölçülen temas açısı, daha küçük olmalıdır.

Çizelge 3.2. Taşıyıcı implant için deneme sıvılarıyla ölçülen yüzey temas açıları

	Test sıvısı ve yüzey gerilimleri (γ)		
	Su (γ =71.3) (θ°)	Gliserol (γ =64.0) (θ°)	Diiodometan (γ =50.8) (θ°)
	61.5	54.6	34.3
PHEMA			
p(HEMA-MMA)	58.4	59.7	35.9

γ_{erg} : Test sıvılarının yüzey gerilimi

Polimerik yapıların serbest yüzey enerjisi parametreleri, araştırılan sıvıların temas açıları kullanılarak hesaplandı. Membran örneklerinin Fowkes Wu yöntemlerine göre hesaplanan yüzey enerjilerinin birbirlerine yakın olduğu, fakat Wu

yönteminin Fowkes göre, daha düşük bir yüzey enerjisi polar bileşenine (γ^p) sahip olduğu gözlemlendi. Her iki yöntemde de, bütün test edilen membranlar için, dispersif bileşenler, toplam yüzey serbest enerjisine ana katkıyı yaptığı görüldü.

Belirlenen toplam yüzey serbest enerjisi (γ^{Toplam}), van Oss yöntemi kullanılarak hesaplandı. van Oss yöntemi, araştırılan bütün membranlara farklı değerlerde uygulanan, Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}) ve asit-baz bileşenlerinin (γ^{AB}) toplamıdır. Membranların baz bileşenlerinin (γ^-), membranın asit bileşenlerine (γ^+) kıyasla daha yüksek olduğu görüldü (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. van Oss'a göre membranların yüzey serbest enerjisi parametreleri (mJ/m^2)

	γ^{LW} [mN/m ²]]	γ^+ [mN/m ²]]	γ^- [mN/m ²]]	γ^{AB} [mN/m ²]]	γ^{Toplam} [mN/m ²]]	Polarite (%)
PHEMA	41.5	0.4	4.2	3.7	45.2	8.2
p(HEMA-MMA)	43.7	0.2	4.6	5.2	48.9	10.6

3.2. Biyomateryalin Kan Uyumluluk Analizleri

Hazırlanan taşıyıcı implanta kan proteinlerinin adsorpsiyonu, hazırlanan biyomateryalin biyolojik uyumluluğunu açısından önemlidir. Kanın ana bileşenini

hücreler ve sıvı kısım oluşturur. Plazmanın % 90'ı sudur. Geri kalan % 10'luk kısım büyük ve küçük moleküler yapılı, maddelerden oluşur ve % 7'sini proteinler, % 0.9'unu inorganik tuzlar teşkil eder. Arta kalan kısım ise amino asitler, vitaminler ve hormonlar gibi farklı kaynaklardan gelen organik bileşiklerdir. Genel olarak plazmanın yapısı hücre dışı doku sıvısının bir göstergesi olarak kabul edilir. Temel plazma proteinleri albümin, alfa, beta ve gama globülinler ile fibrinojendir. Albümin plazmanın esas proteini olup, kanın ozmotik basıncının ayarlanmasından sorumludur. Gama globülinler immünoglobülinler olarak da isimlendirilen antikorlardır. Fibrinojen kanın pıhtılaşmasının son kademesinde gereken proteindir⁽¹⁸⁾.

İnsulin kontrollü salımında kullanılmak üzere sentezlenen pHEMA ve/veya p(HEMA-MMA) taşıyıcı implant sistemlerine albumin adsorpsiyonu, hazırlanan biyomateryalin biyolojik uyumluluğunu arttırması açısından önemlidir. Bunun yanında, biyomateryal yüzeyine fibrinojen adsorpsiyonu hazırlanan biyomateryalin biyolojik uyumluluğunu azaltmaktadır. Albumin trombo dirençli bir özelliğe sahiptir ve bu nedenle trombositlerin biyomateryal yüzeyine yapışmasını engeller. Fibrinojen, biyomateryal yüzeyine trombositlerin yapışmasını başlatıcı özelliğe sahiptir. Bu nedenle, hazırlanan biyomateryale matriks içi tutuklama yöntemiyle albumin ve polietilenglikol yerleştirilerek, biyomateryalin kan uyumluluğunda bir artış sağlanması amaçlandı⁽⁴⁵⁾.

Polimerik materyallerin performansı çeşitli sistem parametreleri tarafından önemli derecede etkilenmektedir. Genel olarak materyalde aranılan biyolojik özellikler, polimerin biyolojik çevreyle iyi uyuşması, dokuyla temas ettiğinden iltihaba yol açmaması, kanserojen etki göstermemesi ve toksik olmamasıdır. Ayrıca taşıyıcı

matriks yüzeylerinin minimum protein adsorpsiyonu göstermesi kan uyumlu implantların dizaynında oldukça önemlidir. Membran yüzeyinin hidrofilik özelliğinin artırılması ile protein adsorpsiyonu azaltılabilmekte ve kan uyumluluk özelliği artırılabilir. Çeşitli modifikasyon yöntemleri ile uygun hidrofilik ve anti-fouling yüzeylerinin oluşturulması mümkündür. Bu yöntemlerden anti-fouling özellikteki monomerlerin, polimerik yapının yüzeyine aşılması geniş kullanım alanı bulmuştur. Yüzeyinde PEO taşıyan polimerik desteklerin düşük protein adsorpsiyonu ve hücre adezyonu özelliği sergilediği belirlenmiştir⁽²⁰⁾. PEO'in yüksek hidrofilik özelliği ve sulu ortamda su molekülleri ile organizasyonu sonucu protein adsorpsiyonuna karşı direnç gösterdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte PEO'nun yapıya ilave edilmesiyle polimerin yüzey geriliminde bir azalma bekleneneceği de çalışmamızda göz önünde bulundurulmuştur.

Han ve arkadaşları farklı moleküler ağırlıkta PEO ile aşılınmış poliüretan membranları ile çalışmışlardır ve PEO zincir uzunluğundaki artış ile membran yüzey hidrofilitesinde ve hareketliliğinde önemli derece bir artış ile biyouyumluluğunun arttığını bildirmişlerdir⁽⁵²⁾.

Çalışmamızda, pHEMA ve p(HEMA-MMA) yapısında albumin ve PEG varlığının taşıyıcı implant yüzeyine adsorplanan kan serum protein miktarlarının ihmal edilebilir düzeyde olduğunu gösterdi (Çizelge 3.4). Elde edilen sonuçlar literatürde rapor edilen sonuçlarla uyum sağlamaktadır. PEG ile modifiye edilebilen taşıyıcı implantların yapısında bulunan PEG ilaçlara veya lipitlere kovalent bağlandığında oluşan konjugant misel yapısı oluşturulabilmektedir. Bu yol ile ilacın immünojenik özellikleri azalmakta, dolaşımında kalış süresi artarak dağılım hacmi küçülerek, ilacın

yarı ömrü uzadığı rapor edilmiştir⁽⁵³⁾.

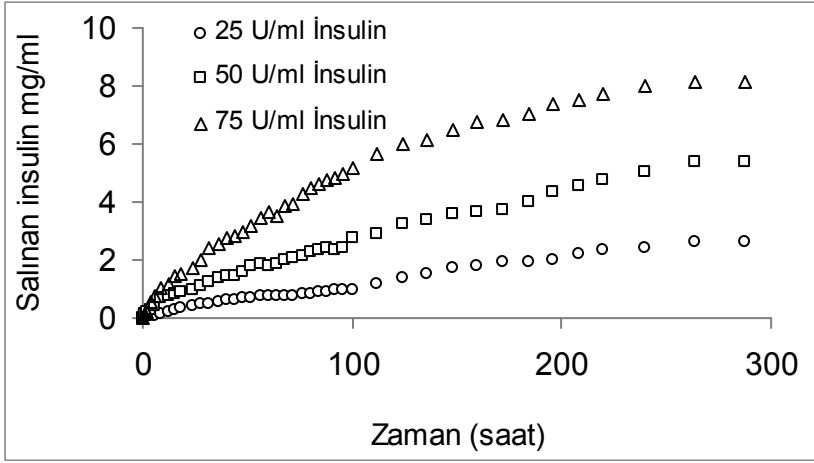
Çizelge 3.4. pHEMA ve p(HEMA-MMA) yapısına adsorplanan serum protein

Miktarları

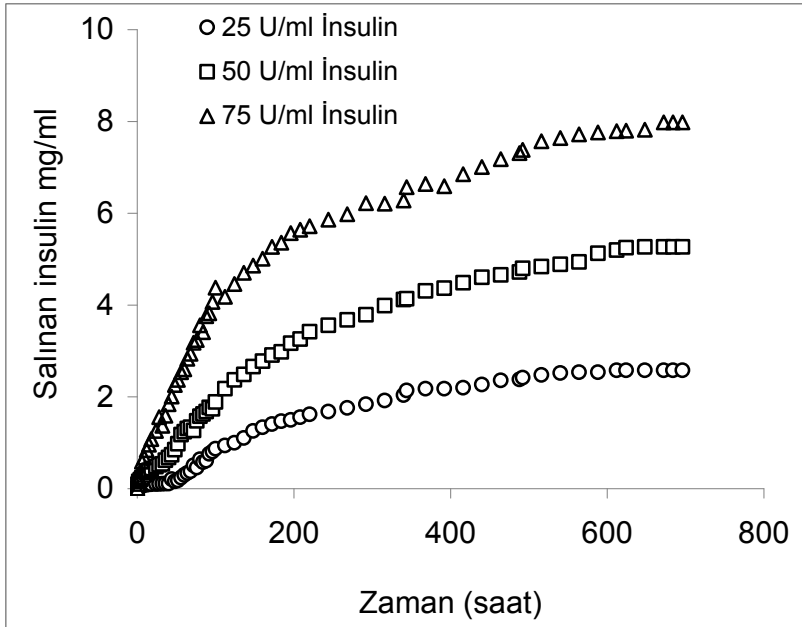
	Plazma proteinleri		
	HSA (ng/cm ²)	γ -globulins (ng/cm ²)	Fibrinojen (ng/cm ²)
pHEMA	362	201	106
p(HEMA-MMA)	204	137	48

3.3. İnsulin Hormonun Kontrollü Salımı

pHEMA ve p(HEMA-MMA) hidrojellerine yüklenen insulinin salımı, 21 gün süresi boyunca kontrollü salım sisteminde belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin analizi ile belirlenmiştir. pHEMA ve p(HEMA-MMA) taşıyıcı implantlarından insulinin kümülatif salım profili zamana bağlı olarak çalışılmış ve sırası ile Şekil 3.7 ve 3.8'de verilmiştir.

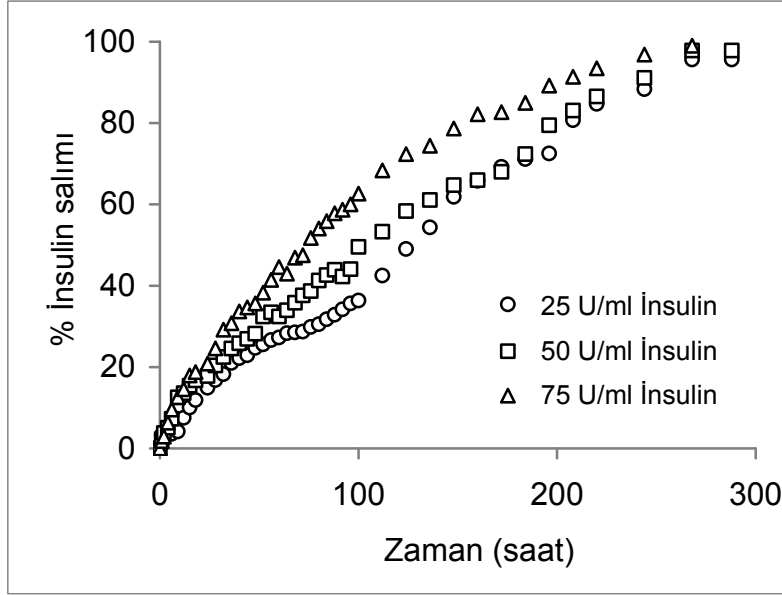


Şekil 3.7. pHEMA hidrojelinden insulinin salım profili

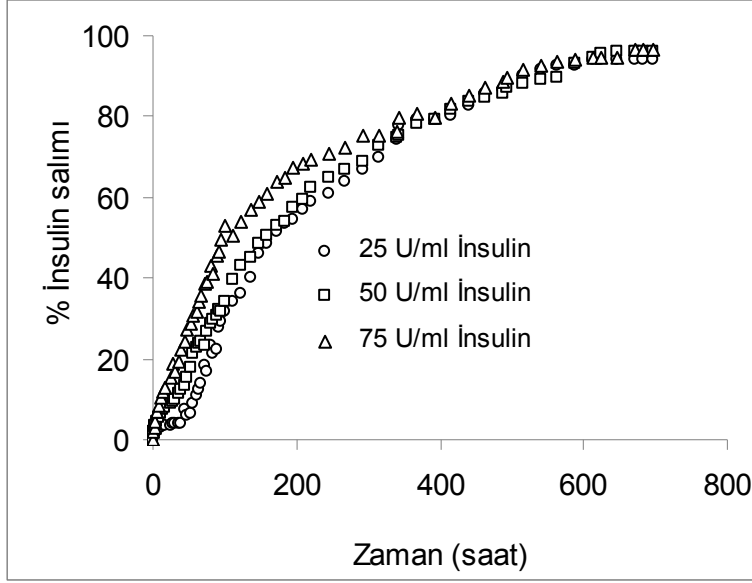


Şekil 3.8. pHEMA-MMA hidrojelinden insulinin salım profili

pHEMA ve p(HEMA-MMA) hidrojelileri için zamana bağılı kümülatif salım yüzdesi profilleri ise Şekil 3.9 ve 3.10'da sunulmuştur. Bu taşıyıcı implantlara farklı oranlarda yüklenen insulinin salım periyodunun amaçlandığı gibi uzun sürede gerçekleşti.



Şekil: 3.9. pHEMA hidrojelinden yüklenen insulinin zamana karşı % kümülatif salım grafiği



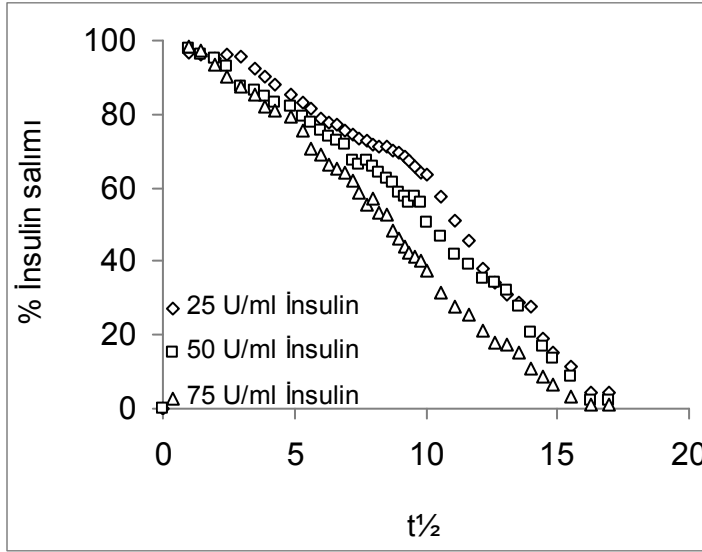
Şekil: 3.10. p(HEMA-MMA) hidrojelinden insulinin zamana karşı % kümülatif salım grafiği

Salınım özelliğini etkilediği düşünülen diğer bir parametre ilaç:polimer oranıdır. Bu çalışmada hazırlanan taşıyıcı implant hidrojel yapıda olması insulinin destek materyalinin içinden dış ortama difüzyonunu kısıtlayan bir engel yoktur. Salım çalışmalarında, yavaş insülin salımının, taşıyıcı implanttaki ilaç: polimer oranına, gözeneksiz yüzey yapısına bağlı olduğu görüldü.

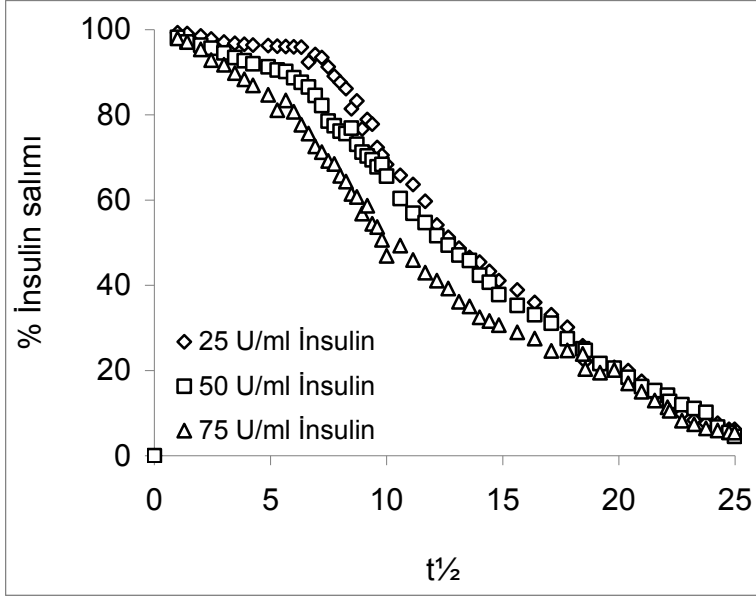
Etken maddenin salım hızı ve profili, araştırmacılar tarafından istenilen yüzey özelliğine sahip taşıyıcı implant sistemlerinin sentezlenmesi ile mümkün olmuştur. Bu doğrultuda, kısa sürede veya daha uzun sürede ilacın salımına olanak tanıyan çok çeşitli materyaller ile çalışılmıştır. Kitosan ve türevleri, ve N-isopropilakrilamidin, vinil pirolidon, butil akrilat, hidroksietilmetakrilat komonomerlerinin kullanıldığı kompozit

materyaller bu amaç doğrultusunda kullanılmıştır yaygın olarak kullanılmaktadırlar^(15,54). Coviello ve arkadaşları Scleroglucan matriksi ile Theophylline (TPH) salınımı çalışmışlardır ve 24 saat içerisinde %80'lik salınım değerine ulaşmışlardır⁽⁵⁵⁾. Frank ve arkadaşları poli(lactide-co-glycolide) (PLGA) taşıyıcı matriksi sentezleyerek lidocaine salınımı çalışmışlardır⁽⁵⁶⁾. 35 günlük salınım çalışması sonrasında %100' e yakın salınım değerine ulaşmışlardır.

İnsulinin kontrollü salımında kullanılan pHEMA ve p(HEMA-MMA) taşıyıcı implantlarının salım profilinin zamanın karekökü ile değişimi Şekil 3. 11 ve 3.12 da verilmiştir.



Şekil 3.11. pHEMA-MMA hidrojelinde insülin salımının zamanın karekökü ile değişimi



Şekil 3.12. p(HEMA-MMA) hidrojelinden insülin salımının zamanın karekökü ile değişimi

Salım mekanizmaları genellikle Fick difüzyon yasaları ile değerlendirilir. Başlangıçta etken madde taşıyıcı implant içerisinde dağılmış ve çözülmüş olarak bulunur. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde taşıyıcı implant olarak kullanılan polimerik materyallerdeki etkili salım, sistemin sıcaklığına ve termodinamik davranışına bağlı olarak; Fick, Fick olmayan (anormal), Durum II veya Süper Durum II ile karakterize edilebilmektedir. Polimerik materyal içerisinden çözücü difüzyonu ile aynı anda fakat ters yönde oluşan etken madde salımı, Eşitlik 2.10 eşitliği ile ifade edilmektedir. Eşitlikteki n üstelinin alabileceği değerler ve bu değerlerle ilişkili salım mekanizmaları kontrollü salım sistemlerinin kinetik incelemesinde kullanılmaktadır.

İnsülin salım mekanizmasının aydınlatılması amacı ile farklı salım kinetik modelleri deneysel verilere uygulandı ve salım kinetik modelini en iyi tanımlayabilecek model araştırıldı (Çizelge 3.5, 3.6). Biyouyumlu taşıyıcı implanttan

insulinin kontrollü salım kinetiğinin mekanizması, Korsmeyer-Peppas tarafından verilen yarı logaritmik model kullanılarak değerlendirildi⁽⁴⁷⁾. İnsulinin kontrollü salım sisteminde elde edilen deneysel veriler bu modele uygulanarak n değeri belirlendi ve silindirik geometriye sahip pHEMA ve p(HEMA-MMA) hidrojeli için elde edilen bu değerler Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da verildi. Kontrollü ilaç salımında kullanılan taşıyıcı implantların silindir geometrisine sahip olduğu salım sistemlerinde n parametresinin aldığı değerlere göre salım mekanizmaları belirlenmektedir. Bu modele göre n parametresinin 0.45 olması Fick'in difüzyon mekanizması ile, 0.45 - 0.89 aralığındaki değerlere sahip olması Fick olmayan, 0.89'e eşit olması Durum II (relaksasyonall) taşınımına ve 0.89 dan büyük olması durumunda ise super Durum II aktarım mekanizmaları ile tanımlanmaktadır^(24,46).

Çalışmamızda elde ettiğimiz n ve k salım parametreleri değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görüldü. İnsulin hormonunun kontrollü salımında kullanılmak üzere hazırlanan biouyumlu pHEMA ve p(HEMA-MMA) hidrojelleri için sırası ile 0.66-0.73 ve 0.6-0.81 arasında hesaplanan n parametresi değerleri salım sisteminin kinetiğinin Fick olmayan taşınım mekanizması ile ifade edilebileceğini ve insulin salım hızının zamana bağlı olduğunu göstermiştir (Çizelge 3.5 ve 3.6). Bir diğer salım parametresi k taşıyıcı implantın yapısı ve geometrik karakteristiği ile ilgili bir sabittir. Küçük k değerleri insulin hormonunun salımının yavaş olduğunu göstermektedir. pHEMA ve p(HEMA-MMA) biyoyumlu hidrojellerden salınan insulinin salım profilinin sıfırıncı-derece kinetik ve Higuchi modeli ile de uygunluğu araştırıldı ve hesaplanan model parametreleri Çizelge 3.5 ve 3.6'da verildi.

Çizelge 3.5. pHEMA hidrojelinden insulinin salım kinetiği ve belirlenen salım parametreleri

İnsulin dozu (U/ml)	Salım kinetik modeli						
	Kuvvet Yasası			Sıfırıncı-derece		Higuchi Modeli	
	$k_p \times 10^{-2}$	n	R^2	$k_o \times 10^{-2}$	R^2	$k_H \times 10^{-2}$	R^2
25	1.73	0.73	0.989	0.97	0.994	4.76	0.982
50	2.39	0.66	0.997	1.88	0.990	9.54	0.990
75	2.32	0.71	0.996	2.98	0.970	15.70	0.994

Çizelge 3.6. p(HEMA-MMA) hidrojelinden insulinin salım kinetiği ve belirlenen salım parametreleri

İnsulin dozu (U/ml)	Salım kinetik modeli						
	Kuvvet Yasası			Sıfırıncı-derece		Higuchi Modeli	
	$k_p \times 10^{-2}$	n	R^2	$k_o \times 10^{-2}$	R^2	$k_H \times 10^{-2}$	R^2
25	0.35	0.81	0.984	0.42	0.952	3.67	0.984
50	1.38	0.69	0.989	0.78	0.954	6.81	0.992
75	2.55	0.60	0.991	1.06	0.920	9.69	0.996

4. SONUÇ

Kontrollü salım sistemlerini hazırlamakta kullanılan biyomalzemeler, doğal veya sentetik olarak elde edilebilen polimerik moleküllerdir ve sayıları gün geçtikçe artmaktadır. Doğal malzemelerin yüzeyi farklı aktivasyon ve/veya modifikasyon yöntemleri kullanılarak değiştirilebilir ve bu yolla, hedef molekülün salım hızı istenilen düzeyde tutularak kontrol edilebilir. Bu sistemlerin ilk örnekleri olan kaplı tablet, kapsül ve küreciklerden, mikroparçacıklı taşıyıcı implanta kadar çok fazla seçeneğin bulunduğu çalışmalarda amaç, tüm etkin madde uygulamalarının biyomalzemelerle kontrollü olarak yapılabilmesidir.

Kontrollü salım sistemlerinde etkin madde özellikleri, ilacın verilmiş biçimi, hedef bölge, tedavinin süresi, hastalığın ve hastanın durumu, taşıyıcı implant sistem tasarımında dikkate alınması gereken ölçütlerdir. İnsulin yarım yüzyıldır üzerinde sürekli çalışılan bir ilaç ve deri altına iğne ile uygulama çeşitlerinin yanısıra; yamalar, pompalar ve özellikle de ağız yolu ile uygulandığı biçimler açısından çok yönlü araştırılmıştır. Yakın gelecekte ise ağız yolu ile uygulanan insülinlerin kullanılması hedeflenmektedir. Bu uygulamalara ek olarak insulin hormonunun polimerik taşıyıcı implantlara yüklenerek kontrollü salım sistemi oluşturulması yolu ile cerrahi yöntemlerle deri altına veya dokulara yerleştirilmesi çalışmaları da önem kazanmıştır.

Çalışmamızda bu özellikleri taşıması hedeflenen hidrojel yapıdaki pHEMA temelli kompozit membranları, UV fotopolimerizasyon yöntemi ile sentezlendi. Bu yeni sentezlenen kompozit membranın; *i)* yeterli mekanik güce sahip olması, biyolojik ve kimyasal degradasyona karşı dirençli olması, *ii)* istenilen yüzey yapısında ve gözenekliliği istenilen düzeyde hazırlanmaya uygun olması, *iii)* kompozit materyalin

hazırlanması aşamasında ilacın aktivitesinde herhangi bir kayıp veya azlamaya maruz kalmadan yüklenebilmesi ve taşıyıcı sistemde ilaç dozunun istenilen düzeyde ayarlanabilir olması, iv) hidrofilik bir yapı sergilemesi bu taşıyıcı sistemin kontrollü ilaç salım alanında kullanılmasındaki sunduğu üstünlükler olarak düşünülmektedir.

Temas açısı ölçümleri biyomateryal yüzeyinin karakterizasyonunda kullanılan parametrelerden biridir. Destek materyalinin hidrofobisitesi, yüzey özelliklerine bağlı olarak değişir. Kompozit membranların hidrofobik ve polar karakterleri yüzey gerilimi bilinen farklı test sıvılarının kullanıldığı temas açısı ölçümleri ile belirlenir. Bu doğrultuda, biyomateryallerin mikroçevreleri ile etkileşimi hakkındaki önemli sonuçlar ıslanabilirlik özellikleri araştırılarak belirlenebildiğinden, çalışmamızda, taşıyıcı implant yüzey polaritesinin belirlenmesi için temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Islatma gücünün değişimi, yüzey tabakası kalınlığındaki (en az 10Å) ve sıvı fazla doğrudan temasındaki, fonksiyonel grupların etkisini yansıttığından yüzey karakteristiklerine, oldukça fazla hassastır. Su, gliserol ve diiyodometan (DIM) test sıvıları kullanılarak kompozit membranların temas açıları ölçümleri yapılmıştır.

Bu çalışmanın amacı; azami 28 gün bazal insulin salımını gerçekleştirecek sürekli bir sistem tasarlamaktır. İnsulinin en büyük fonksiyonu, hiperglisemiyi oluşturan hormonun birtakım planlanmış eylemlerine karşı koyarak kan glukoz seviyesini düşürmektir. Genelde pek çok hiperglisemik hormonun insulin ile birlikte düzenli şekilde çalışmamasından dolayı, şiddetli hiperglisemi ve yaşam süresinin kısalması gibi olaylar ortaya çıkmaktadır.

Çözücü transferi ile şişebilen hidrojellerde şişme davranışı araştırıldı ve polimer/kopolimer ile kopolimer/ilaç etkileşimlerini azalttığı bulundu. İmplantasyon

yapılan polimer silindirlerinin porsuz yüzey yapılarının SEM görüntüsü çıkarıldı. pHEMA ve p(HEMA-MMA) sırasıyla 21 ve 17 saatte suyu yapısına geçirerek dengeye ulaştı. Silindir membran kalınlığı ve yoğunluğu sırasıyla 2,63 mm ve 1,06 g cm⁻³ olarak bulundu. İnsulinin üç farklı dozunun (25, 50 and 75 U/ml) salım kinetikleri, fizyolojik fosfat tamponu (PBS, pH 7.4) içinde sürekli akış salım sistemi ile değerlendirildi ve spektrofotometrik metod ile 280 nm dalga boyunda polimerik silindirlerinden insulin salım miktarı tayin edildi. Silindirlerden insulinin salımının sıfırıncı derece salım kinetikleri gözlemlendi. İnsulinin in vitro salımı ilk olarak atak göstermemiş ve azami 28 gün boyunca sabit salım oranı göstermiştir. Sonuç olarak biz bu formülasyonların dört hafta üzerinde bazal insulin seviyesi için başarıyla uygulanabileceğini gösterdik. Bu sonuçlar, kolay sterilizasyonu ve ilaç yüklemeyi, numune dozunun ayarlanması, sistemin biyolojik uyumu ve organik çözücülerin kullanılmaması gibi pek çok farklı avantajı sağladığını göstermektedir.

Ucuz ve sürekli kullanımı olan polimerik salım sistemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda geliştirdiğimiz bu biyoyumlu taşıyıcı implantın, düşük biyoyumluluk yaratan kan proteinlerine ve hücrelerine karşı olan yüksek adezyon olumsuzluğunu giderme özelliğine sahip olması bu alanda başarı ile kullanılabilceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. B.K. Mann, A.S. Gobin, A.T. Tsai, R.H. Schmedlen, J.L. West. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: Synthetic ECM analogs for tissue engineering, *Biomaterials*, **22**. 3045(2001)
2. G. Bayramoğlu, M. Yılmaz, and M.Y. Arıca, Evaluation of lysozyme adsorptive behaviour of pHEMA based affinity membranes related to the surface energy and its components to be used in chromatographic fields, *Colloid and Surface A.*, **243**. 11(2004).
3. R.W. Baker, H.K. Lonsdale, *Controlled Release: Mechaniss and rates*, Plenum Press, New York, NY, 1974
4. R. S. Langer ve N. A. Peppas. Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, **2**, 201(1981).
5. J. Heller, ve R. W. Baker. In *Controlled Release of Bioactive Materials*. R. W. Baker, Inc., New York. 1980.
6. J.M.G. Cowie, *Polymers: Chemistry & Physics of Modern materials*, 2nd Edition, Chapman & Hall, united Kingdom. 1991.
7. R. Gref, Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **263**, 1600(1994).
8. A. Kishida, Y. Ikada. In: S. Dumitriu (Ed.), *Polymeric Biomaterials*, seconded., Dekker, New York. 2001
9. J. D. Andrade ed. *Surface and Interfacial Aspects Of Biomedical Polymers* New York. 1985.

10. B.S. Andreas, Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems, *International Journal of Pharmaceutics*, **194**, 1(2000)
11. K. Ikesue, P. Kopečková and J. Kopeček Degradation of proteins by guinea pig intestinal enzymes *International Journal of Pharmaceutics*, **95**, 171(1993).
12. M.E. Bryn, K. Park, N.A. Peppas, 'Molecular imprinting within hydrogels' *ADV. Drug Deliver Rev.* **54**,149(2002).
13. S. Duran, D. Şolpan O., Güven, 'Synthesis and characterization of arylamide-acrylic acid hydrogels and adsorption of some textile dyes' A Thesis of Science, The Institute for Graduated Studies in Pure and Applied Sciences of Hacettepe University, Ankara, 2000.
14. N.A. Peppas, P. Bures, W. Leabandung, H. Inohara, 'Hydrogels in pharmaceutical formulations', *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27(2000).
15. G. Bayramoğlu, and M.Y. Arıca, A novel pH sensitive porous membrane carrier for various biomedical applications based on pHEMA/chitosan: preparation and its drug release characteristics. *Macromolecular Symposia*, **203**, 213(2003).
16. M.Y., Arıca, G. Bayramoğlu, and N. Bıçak, Characterization of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process biochemistry*, **39**, 2007(2004).
17. M.Y. Arıca, and G. Bayramoğlu, Polyethyleneimine grafted poly(hydroxyethyl methacrylate-co-glycidyl methacrylate) membranes for glucose oxidase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, **20**, 73(2004).
18. K. Christensen R., Larsson, E. G. Emanuelsson, A., Larsson Heparin coating of stent graft-effects on platelets coagulation and compliment activation, *Biomaterials*, **22**, 349(2001).

19. M.Y. Arica, Epoxy-Derived pHEMA Membrane for Use Bioactive Macromolecules Immobilization: Covalently Bound Urease in a Continuous Model System. *Journal of Applied Polymer Science*, **77**, 2000(2000).
20. D. Tan, B. Zhao, S. Moochhala, Y. Yang. Sustained-Release of Caffeine from a Polymeric Tablet Matrix: an in Vitro and Pharmacokinetic Study, *Materials Science and Engineering B* **132**, 143(2006)
21. R. S. Langer. New methods of drug delivery. *Science*, **249**, 1527(1990).
22. N.A. Peppas, Hydrogels in medicine and pharmacy. **180**, 1(1986).
23. N.A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J.H. Ward, J. Zhang. Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2**, 9(2000).
24. J. Siepmann, N.A. Peppas. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (hpmc), *Adv. Drug Deliv. Rev.* **48**, 139(2001)
25. A.C. Guyton, J.E. Hall, İnsulin, Glukagon ve Diabetes Mellitus. *Tıbbi Fizyoloji*, Editör: H. Çavuşoğlu, (W.B.Saunders Company) 1996.
26. R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Radwell, *Herpers Biochemistry* 1996.
27. K.S. Polonosky, J. Sturis, and G.I. Bell, Noninsulin-dependent diabetes mellitus: A genetically programmed failure of the β -cell to compansate for insulin resistance. *N Eng J Med.* **334**, 777(1996)

28. R.R. Wing, E.H. Blair, P., Bononi, M.D., Marcus R. Watanable, and R.N. Bergman, Caloric restriction perse is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care*. **17**, 30(1994)
29. S. Yılmaz, ve B. Üstündağ, *Türk J. Vet. Anim. Sci. Tübitak* **26**, 549(2002)
30. I. Satman, T. Yılmaz, A. Sengül, S. Salman, F. Salman, S. Uygur, I. Bastar, et al. Population based study of Diabetes and risk characteristic in Turkey: results of the Turkish Diabetes. Epidemiology study. (TURDEP) *Diabetes Care*:**25**,1551(2002)
31. K.M. Narayan, J.P. Boyle, T.J. Thompson, S.W. Sorenson, D.F. Williamson, Lifetime risk for Diabetes Mellitus in United States, *JAMA*: **209**,1884(2003)
32. A.R. Hand, R.E. Weiss: Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab Invest*; **51**, 429(1984)
33. I. Moff, and R. Peterson, *Endokrinology: diabetes*. V.L. Gunn, C. Nechyba (editors). *The Harriet Lane Handbook*. Philadelphia, Mosby 2002.
34. R.Y.M. Tun, M. Peakman, L. Alviggi, P. J. Haskins, C. Johnson, and D. Heaton, The impertance of persistent cellular and humoral immune changes in the pre-diabetic period: a prospective idential twin study. *BMJ*. **308**,1063(1994).
35. M. Laakso, Insulin resistance and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol*; **7**, 217(1996)
36. J.C. Pickup, and G. Williams, *Textbook of diabetes*. Second edition. Blackvell Science. Oxford. 1997

37. J.M.J. Svec and F. Fréchet, Modified Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Continuous Rod Columns for Preparative Scale Ion-Exchange Chromatography of Proteins. *J. Chromatogr. A*, **702**, 89(1995)
38. R. Blanco, A. Arai, N. Grinberg, D.M. Yarmush, B.L. Karger. Role of association on protein adsorption isotherms. β -lactoglobulin adsorbed on a weakly hydrophobic surface, *Journal of chromatography*. **482**, 1(1989).
39. T.A. Mykhaylyk, S.D. Evans, C.M. Fernyhough, L.W. Hamley, J.R. Henderson, Ellipsometric study of adsorption on nanopatterned block copolymer substrates. *J. Colloid Interf. Sci.* **260**, 234(2003).
40. W.A. Zisman. Influence Of Constitution On Adhesion *Ind. Eng. Chem.* **55**, 19(1963).
41. F.M. Fowkes, Microscopic Aspects of Adhesion and Lubrication *J. Adhes Sc. Technol.* **1**, 7(1987)
42. S.J. Wu, *Colloid Surface Sci.* **71**, 605(1979)
43. C.J., van Oss, R.J., Good, M.K., Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Chaudury Langmuir* **4**, 884(1988).
44. M.Y. Arıca, G. Bayramoğlu. B. Arıca, E. Yalçın K. Ito and Y. Yagci Design of a novel hydrogel membrane for various biomedical applications based on poly(hydroxyethylmethacrylate/vinylbenzyl-poly(ethyleneoxide)): properties and its drug release characteristics, *Macromolecular Bioscience* **5(10)**, 983(2005).
45. M. Yılmaz Polihidroksi Etilmetakrilat Kökenli Yapay Damarların Hazırlanması Ve Biyo-Uyumluluk Özelliklerinin Arttırılması Ve Karakterizasyonu, Kırıkkale Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2006.

46. P.L, Ritger, N.A. Peppas, A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. J. Controlled Release.; **5**, 37(1987)
47. R.W, Korsmeyer, R, Gurny, E, Doelker, P, Buri, N.A. Peppas Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. Int. J. Pharm.; **15**, 25(1983)
48. T. Higuchi, Mechanism of Sustained Action Medication: Theoretical Analysis Of Rate of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices, J. Pharm. Sci. **52**, 1145(1963).
49. Y.W. Chien, in: novel Drug Delivery Systems, 2nd ed, Marcel Dekker, New York, NY, 1992.
50. A.M. Lowman, M. Morishita, M. Kajita, T. Nagai, N.A. Peppas. Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels, J. Pharm. Sci. **88**, 933 (1999)
51. S. Lakshmi, A. Jayakrishnan, Migration resistant, blood-compatible plasticized polyvinyl chloride for [Medical and related applications] Artif Organs; **22**, 222(1998).
52. D.K. Han, K.D. Park, Y.H. Kim, Plasma protein adsorption to sulfonated poly(ethyl oxide) grafted polyurethane, J.Biomed Mater Res. **30**, 2(1999).
53. L.C. Winterton, I.D. Andrade, J. Feijen, SW. Kim. Heparin interaction with protein with protein-adsorbed surfaces. J. Coll. Interface Sci., **111**, 314(1986).
54. L. Yu, L. Li, Z. Wei'an, F. Yue'e. Proposal for Intense Attosecond Radiation from an X-Ray Free-Electron Laser Radiat Phys Chem **69**, 467(2004)
55. T. Coviello, F. Alhaique , C. Parisi, P. Matricardi, G. Bocchinfuso, M. Grassi. A new polysaccharidic gel matrix for drug delivery: preparation and mechanical properties. Journal of Controlled Release, **102**, 643(2005).

56. A. Frank and S. Kumar Rath. Study of the initial stages of drug release from a degradable matrix of poly(d,l-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*,**25**(5),813(2004).