

AKÜ FEMÜBİD 22 (2022) 025703 (366-376)

AKU J. Sci. Eng. 22 (2022) 025703 (366-376)

DOI: 10.35414/akufemubid.1066566

Araştırma Makalesi / Research Article

Biyouyumlu Polimerik Kürelerden 5-Fluorourasilin Kontrollü Salımı

Merve OLUKMAN ŞAHİN¹, Oya ŞANLI²¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Teknoloji ve Araştırma Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi, Tayfur Sökmen Kampüsü, Antakya, Hatay²Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Teknikokullar, AnkaraSorumlu yazar e-posta: merve.olukmansahin@mku.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9588-2661>
osanli@gazi.edu.tr ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3794-6786>

Geliş Tarihi: 01.02.2022

Kabul Tarihi: 14.04.2022

Öz

Primidin analogu olan 5-Fluorourasil (5-FU) çok çeşitli kanserlerin (meme, kolorektal, gastrointestinal vb.) tedavisinde kullanılan bir kemoterapi ajanıdır. Ancak, plazma yarı ömrünün kısa olması, kanser hücrelerine karşı düşük seçiciliği ve ciddi yan etkilere sebep olması klinik kullanımını sınırlandırmıştır. Bu çalışmada 5-FU'nun kontrollü salım teknolojisi ile olumsuz özelliklerinin en aza indirilmesi hedeflendi. Bu amaçla 5-FU yüklü poli (vinil alkol)/sodyum aljinat (PVA/NaAlg) küreleri FeCl₃ kullanılarak iyonik çapraz bağlanma yöntemiyle hazırlandı ve Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile karakterize edildi. İn vitro salım çalışmaları 2'şer saat süre ile 3 farklı pH (1.2, 6.8 ve 7.4) değerinde toplam 6 saat olacak şekilde gerçekleştirildi. PVA/NaAlg (m/m) oranı, ilaç/polimer (m/m) oranı, çapraz bağlama süresi ve çapraz bağlayıcı derişiminin 5-FU salımı üzerine etkisi araştırıldı. Kürelerde PVA miktarının artmasıyla 5-FU salımının arttığı buna karşın çapraz bağlama süresinin ve çapraz bağlayıcı derişimin artmasıyla 5-FU salımının azaldığı belirlendi.

Anahtar kelimeler

5-Fluorourasil;
Antikanser ilaç;
Kontrollü Salım; pH
Duyarlı Salım

Controlled Release of 5-Fluorouracil from Biocompatible Polymeric Beads

Abstract

5-Fluorouracil (5-FU), a pyrimidine analog, is a chemotherapy agent used in the treatment of a wide variety of cancers (breast, colorectal, gastrointestinal, etc.). However, its short plasma half-life, low selectivity against cancer cells and serious side effects limited its clinical use. In this study, it was aimed to minimize the negative properties of 5-FU with controlled release technology. For this purpose, 5-FU loaded poly(vinyl alcohol)/sodium alginate (PVA/NaAlg) beads were prepared by ionic crosslinking method using FeCl₃ and beads were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and differential scanning calorimetry (DSC). In vitro release studies were carried out for 2 hours at 3 different pH values (1.2, 6.8 and 7.4) for a total of 6 hours. The effects of PVA/NaAlg (w/w) ratio, drug/polymer (w/w) ratio, crosslinking time and crosslinker concentration on 5-FU release were investigated. It was determined that 5-FU release increased with increasing PVA amount in the beads, whereas 5-FU release decreased with increasing crosslinking time and crosslinker concentration.

Keywords

5-Fluorouracil;
Anticancer Drug;
Controlled Drug
Release; pH
Responsive Release

© Afyon Kocatepe Üniversitesi

1. Giriş

5-Fluorourasil (5-FU) suda çözünebilir urasilin bir primidin analogudur. Aktif formu, timinin normal üretimini inhibe ederek DNA sentezini engeller. Kolon, rektal, meme, gastrointestinal sistem

pankreas, baş, yumurtalık kanserlerinde nispeten yüksek bir yanıtı vardır. 1950'lerde urasilin C-5 pozisyonundaki hidrojenin yerine flor gelmesiyle sentezlenmiştir. İlk sentezinden bu yana, 5-FU kemoterapide kullanılmıştır ve şu anda Dünya Sağlık

Örgütü tarafından yayınlanan Temel İlaçlar Model Listesinde, kanser tedavisinde köklü bir ilaç olduğu bildirilmektedir (WHO 2019). Ancak 5-FU etkinliği, kan plazmasındaki kısa yarılanma ömrü (10-15 dakika) nedeniyle sınırlıdır, sıklıkla sistematik toksisiteye neden olan sık dozlama gerektirir, ayrıca 5-FU'nun yaygın uygulama şekli damar içine enjeksiyondur. Bu uygulama şekli ve hem hedef kanserli hücrelerin hem de normal hücrelerin, ilaca seçici olmayan maruziyete maruz kalması çeşitli yan etkilerin (mide bulantısı, kusma, iştahsızlık, nöral, hematoral, dermatolojik vb.) şiddetli görülmesine yol açar. Bu nedenle hem kanser tedavisinin etkinliğini artırmak hem ilacın yan etkilerini en aza indirmek hem de hastanın sık sık ilaç almasının önüne geçerek düşük ilaç dozu ile başarılı bir tedavi sağlanabilmesi için kontrollü ilaç salım sistemlerine ihtiyaç vardır (Olukman *et al.* 2012, Elaine *et al.* 2021, Dev *et al.* 2010). Bu amaçla, biyobozunur polimerler kullanılarak 5-FU'nun kontrollü salım formülasyonların hazırlanması geniş çapta araştırılmıştır. Örneğin, Lin ve Fu (2009) faz değişim tekniğiyle hazırladıkları kitosan/polietilen glikol mikropartiküllerden 5-FU'nun kontrollü salımı üzerine çalışmışlar, kitosan derişimi, çapraz bağlayıcı derişimi ve çapraz bağlama süresinin 5-FU salımı üzerine etkisini incelemişlerdir. 5-FU salımı için en iyi koşulun %3.5 (m/m) kitosan, %3 (m/m) tripolifosfat ve çapraz bağlama süresinin 4 saat olduğu mikropartiküllere ait olduğunu bildirmişlerdir. Reddy vd. (2014) poli(akrolamidoglikolik asit-kovinilkaprolaktam)/pektin hidrojelleri hazırlayarak 5-FU'nun bu hidrojellerden kontrollü salımını incelemişler, 24 saat içerisinde hidrojellerden salınan 5-FU miktarının pH 1.2'de %50, pH 7.4'de ise %85 olduğunu bulmuşlardır. He vd (2020) tripolifosfat ve glutaraldehit ile çapraz bağlı kitosan mikroküreleri hazırlayarak bu kürelerden 5-FU salımını incelemişler ve tripolifosfat ile çapraz bağlı kürelerin yüzeylerinin pürüzlü olduğunu ve ilacı daha hızlı serbestleştirdiğini buna karşın glutaraldehit ile çapraz bağlı kürelerin yüzeylerinin daha pürüzsüz olduğunu ve 5-FU salımının daha kontrollü gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Araştırma grubumuz daha önce 5-FU'nun kontrollü salımı üzerine çalışmalarda bulunmuştur (Olukman *et al.* 2012, Şanlı and Olukman 2014, Şanlı *et al.* 2016).

Kolon hedefli ilaç salımının amacı etkili tedavi için kalın bağırsakta uygun terapötik dozu sağlamak, kürelerin gastrointestinal kanaldan geçişi sırasında ilacın doz ve aktivite kaybını önlemek ve tedavinin olumsuz yan etkilerini en aza indirmektir. Biyopolimerlerin pH'a bağlı şişme davranışı gösterdiği bilinmektedir. Sodyum aljinat (NaAlg) kahverengi deniz yosunundan elde edilen biyoyumlu hidrofilik bir polimerdir. NaAlg, pH > 5'te negatif yüklü karboksil gruplarının mevcudiyeti nedeniyle doğada anyoniktir. Bu negatif yükler, polimerin asidik pH'ta büzülmesine ve nötr veya bazik pH'a maruz kaldıklarında şişmesine izin verir. Bu özellikler, NaAlg'ı ağızdan ilaç verme sistemlerinin tasarım uygulamaları için uygun hale getirir. Aljinat tuzlarının, çok değerlikli metal iyonları (M^{2+} ve M^{3+}) veya glutaraldehit ile temas ettiğinde polimerik ağ yapı oluşturduğu bilinmektedir ve bu özellik, çeşitli ilaçlar, proteinler ve hatta hücreler için kontrollü salım sistemleri üretmek için kullanılmıştır. NaAlg zincirleri Fe^{3+} iyonları ile üç boyutlu ağ yapı oluşturarak çapraz bağlanır bu da kürelerin M^{2+} iyonlarıyla çapraz bağlanmış kürelerden daha yüksek ilaç yüklemesi için önemli bir avantaj sağlar. Bu nedenle bu çalışmada Fe^{3+} , çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Poli(vinil alkol) (PVA) kontrollü ilaç salım çalışmaları için yaygın olarak kullanılan biyoyumlu bir polimerdir. Ancak PVA'nın oldukça hidrofilik bir yapıda olması stabilitesinin zayıf olmasına neden olur. Bu sorunun üstesinden gelmek için PVA'nın NaAlg ile blendi oluşturulmuştur (Şanlı *et al.* 2007, Agarwal *et al.* 2015, Swamy and Yun 2015).

Bu çalışmada kolon hedefli bir ilaç salım sistemi olarak NaAlg/PVA blend küreleri hazırlanarak bu kürelerden 5-FU'nun kontrollü salımı amaçlandı. Uygun bir NaAlg/PVA bileşimi ve optimum küre hazırlama koşulu ile gastrointestinal kanaldan geçişi sırasında spesifik olmayan bölgelerde (mide ve ince bağırsak) en az miktarda ilaç salımı, kalın bağırsakta ise daha yüksek 5-FU salımı hedeflendi. Bu amaçla PVA/NaAlg oranı, ilaç/polimer oranı, çapraz bağlama süresi ve çapraz bağlayıcı derişimi değiştirilerek 5-FU salımı için uygun küre hazırlama koşulu araştırıldı.

2. Materyal ve Metot

2.1 Materyaller

NaAlg (orta viskozite), Sigma Chemical Co (Louis, ABD) firmasından; 5-FU Sigma-Aldrich (Steinem, Almanya) firmasından; Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, FeCl₃ ve PVA'nın (molekül ağırlığı 72000) tümü Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi ve alındığı gibi kullanıldı.

2.2 5-FU Yüklü Kürelerin Hazırlanması

NaAlg %2 (m/V) ve PVA %8 (m/V) saf su içerisinde çözülerek hazırlandı ve Çizelge 1'de verilen oranlarda manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Hazırlanan polimer karışımının üzerine farklı oranlarda katı 5-FU ilave edildi ve 12 saat süre ile karıştırılarak 5-FU'nun polimer karışımı içerisinde homojen dağılması sağlandı. 5-FU içeren polimer çözeltisi bir peristaltik pompa (Masterflex, L / S Digital Economy Drive, Kanada ve ABD) ile farklı derişimlerdeki FeCl₃ (0.05, 0.1 ve 0.2 M) çözeltisine damla damla eklendi. Oluşan küreler 5, 10 ve 15 dakika sonunda çapraz bağlama çözeltisinden süzülerek çıkarıldı ve saf su ile yıkandı. Küreler daha

sonra 40°C'da etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutuldu.

2.3 Kürelerin Şişme Davranışlarının Belirlenmesi

ilaç içermeyen çapraz bağlı kürelerin denge şişme derecesini belirlemek amacıyla farklı pH'larda (1.2, 6.8 ve 7.4) tam dengelenmeyi sağlamak için 24 saat boyunca oda sıcaklığında pH 1.2 HCl çözeltisinde ve fosfat tamponunda şişmelerine izin verildi. Daha sonra şişmiş kürelerin yüzeyine yapışan fazla sıvı damlaları kurulandı ve elektronik terazi (Precisa XB 22A, ABD) kullanılarak tartıldı. Ardından sabit ağırlığa ulaşılan kadar 40°C'da etüvde kurutuldu. Kürelerin denge şişme derecesi (%) aşağıdaki eşitlik ile hesaplandı.

$$\% S = \frac{m_t}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

% S: Şişme yüzdesi

m_t: 24 saatte dengeye gelen şişmiş küre miktarı (g)

m₀: Başlangıçta alınan küre miktarı (g)

Çizelge 1. 5-FU yüklü kürelerin hazırlama koşulları ve değişik formülasyonlarda hazırlanan kürelerin % tutuklama verimi, % verim ve çapları.

No	PVA/NaAlg Oranı (m/m)	İlaç/Polimer Oranı (m/m)	FeCl ₃ Derişimi (M)	Çapraz Bağlama Süresi (dakika)	Tutuklama Verimi (%)	Verim (%)	Küre Çapları (mm)
A ₁	1/1	1/8	0.05	10	52.58	72.98	1.39±0.01
B ₁	1/2	1/8	0.05	10	68.72	76.10	1.36±0.01
C ₁	1/3	1/8	0.05	10	67.54	86.64	1.35±0.01
D ₁	1/4	1/8	0.05	10	60.78	72.15	1.24±0.01
D ₂	1/4	1/1	0.05	10	65.05	70.03	0.79±0.04
D ₃	1/4	1/2	0.05	10	24.12	66.48	0.78±0.005
D ₄	1/4	1/4	0.05	10	39.03	74.63	1.17±0.04
D ₅	1/4	1/8	0.1	10	74.66	64.77	1.20±0.04
D ₆	1/4	1/8	0.2	10	79.61	83.22	1.12±0.01
D ₇	1/4	1/8	0.05	15	45.02	92.48	1.20±0.02
D ₈	1/4	1/8	0.05	20	15.79	64.26	1.28±0.01
A ₀	1/1	-	0.05	10	-	-	-
B ₀	1/2	-	0.05	10	-	-	-
C ₀	1/3	-	0.05	10	-	-	-
D ₀	1/4	-	0.05	10	-	-	-

2.4 Küre Oluşum ve Tutuklama Veriminin Belirlenmesi

Kürelerin % tutuklama verimini (TV) belirlemek amacıyla 50 mg ilaç yüklü küre agat havanı yardımıyla toz haline getirilerek bir balona alındı ve 1 saat süre ile geri soğutucu altında 50 mL suda ekstrakte edildi. Karışım, 5-FU'nun kürelerden tam olarak ekstraksiyonunu sağlamak için bu süre

boyunca manyetik olarak karıştırıldı. Ardından çözelti süzüldü ve süzüntü 266 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Unicam UV2-100 UV/Visible) olarak analiz edildi. Kürelerin oluşum ve tutuklama verimleri aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Verim (\%)} = \frac{KM}{I+P} \times 100 \quad (2)$$

KM: Sentez sonrası sabit tartıma gelmiş küre miktarı (g)

İ: Sentez ortamına ilave edilen ilaç miktarı (g)

P: Sentez ortamına ilave edilen polimer miktarı (g)

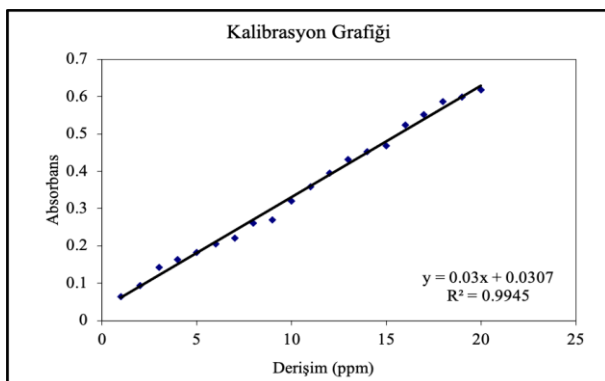
$$\%TV = \frac{D}{T} \times 100 \quad (3)$$

D: Gerçekte mikrokürelerin içinde bulunan ilaç miktarı (mg).

T: Teorik olarak mikrokürelerin içinde bulunan ilaç miktarı (mg).

2.5 İn vitro 5-FU Salımı

5-FU yüklü kürelerden in vitro ilaç salım çalışmaları sırasıyla mide (pH=1.2), ince bağırsak (pH=6.8) ve kalın bağırsak (pH=7.4) koşullarında 2'şer saat süre ile gerçekleştirildi. Bu amaçla, kütlesi bilinen miktarda küre örneği alınarak 250 mL pH 1.2 (HCl) tampon çözeltisine yerleştirildi ve ardından çalkalamalı bir su banyosunda (BS-21, Medline Scientific, Kore) 37°C'da inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından 5 mL örnek alındı ve sabit hacmi korumak için çözünme ortamına eşit hacimde taze tampon çözeltisi ilave edildi. 2 saatlik bir salım süresinden sonra, küreler süzüldü ve süzüntü sırasıyla pH 6.8 ve 7.4'de aynı hacimde fosfat tamponu çözeltisine aktarıldı. Aynı şekilde belirli zaman aralıklarında 5 mL numune çekildi ve 5-FU içeriği 266 nm dalga boyunda UV spektrofotometre kullanılarak belirli derişimlerde distile su içerisinde 5-FU'nun çözünmesiyle hazırlanan kalibrasyon grafiği yardımıyla belirlendi (Şekil 1). Varyasyon hatasını en aza indirmek için tüm deneyler üç kez gerçekleştirildi. Ortalama değerlerden standart sapmalar hesaplandı.



Şekil 1. 5-FU'ya ait kalibrasyon grafiği.

2.6 Karakterizasyon

5-FU'nun, polimer örneklerinin ve kürelerin KBr disklerinin FTIR spektrumları Mattson 1000 FTIR spektrometresi (Welwyn Garden, İngiltere) ile elde edildi.

Polimer örneklerin ve kürelerin cam geçiş sıcaklığı (T_g) ayrıca 5-FU'nun erime sıcaklığı V4.1C 2000 diferansiyel tarama kalorimetresi (DuPont General Perkin Elmer, ABD) kullanılarak belirlendi. Ölçümler 0-300°C sıcaklık aralığında 10°C dk⁻¹ ısıtma hızında gerçekleştirildi.

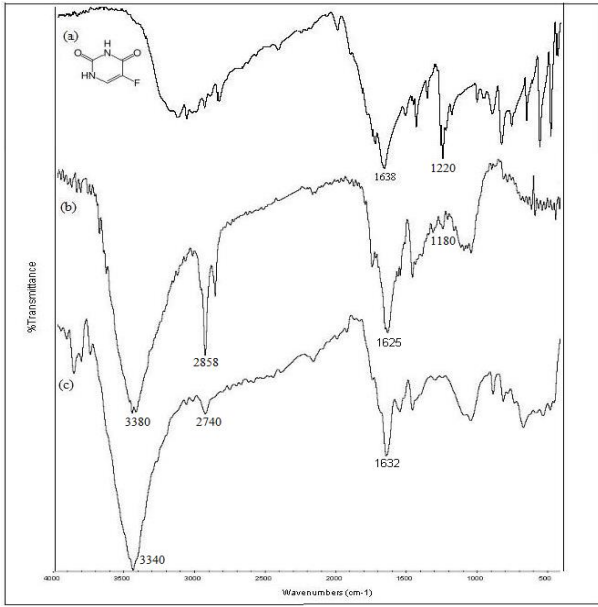
Kürelerin morfolojilerini incelemek amacıyla SEM görüntüleri, JSM 6400 SEM (Quanta 400F alan emisyonu, JEOL Ltd., Japonya) kullanılarak elde edildi. Küre örnekleri önce kurutuldu ve ardından SEM görüntülemeye önce vakum altında altınla kaplandı.

3. Bulgular

3.1 Kürelerin Karakterizasyonu

5-FU, D₁ ve D₀ formülasyonlu kürelerin ana absorpsiyon bantlarının konum ve yoğunluklarındaki değişim Çizelge 2 ve Şekil 2'de sunuldu. Şekilde 5-FU spektrumunda gözlenen 3000-3500 cm⁻¹arasındaki geniş bandın -NH grubunun bükülme bandına ait olduğu belirlendi. İlaç yüklü kürelerde bu band yaklaşık olarak 3500 cm⁻¹'de görüldü. 5-FU spektrumunda 1220 cm⁻¹'de görülen pik C-F gerilme bandına ait olduğu düşünüldü (Arafat *et al.* 2021). Bu pikin D₁ formülasyonlu kürelerin spektrumunda ise 1180 cm⁻¹'de olduğu tespit edildi. 5-FU, D₁ ve D₀ formülasyonlu kürelere ait spektrumda karbonil (C=O) gerilme bandının sırasıyla 1638 cm⁻¹, 1625 cm⁻¹ ve 1632 cm⁻¹'de olduğu belirlendi. D₁ ve D₀ formülasyonlu kürelerin spektrumunda 3380 cm⁻¹ ve 3340 cm⁻¹'de bulunan pikin PVA grubunun yapısında bulunan -OH gruplarından kaynaklanan O-H gerilme bandı olduğu düşünüldü. D₁ ve D₀ formülasyonlu kürelerin spektrumunda sırasıyla 2858 cm⁻¹ ve 2740 cm⁻¹'de gözlenen bandın ise alifatik C-H gerilme bandı olduğu düşünülmüştür. Yapılan FTIR analizi sonucunda 5-FU'nun kürelere başarıyla yüklendiği, kürelerin yapısında bozunmadan bulunduğu ve küre sentezi için

kullanılan polimerlerin özelliklerini etkilemediği sonucuna varıldı.



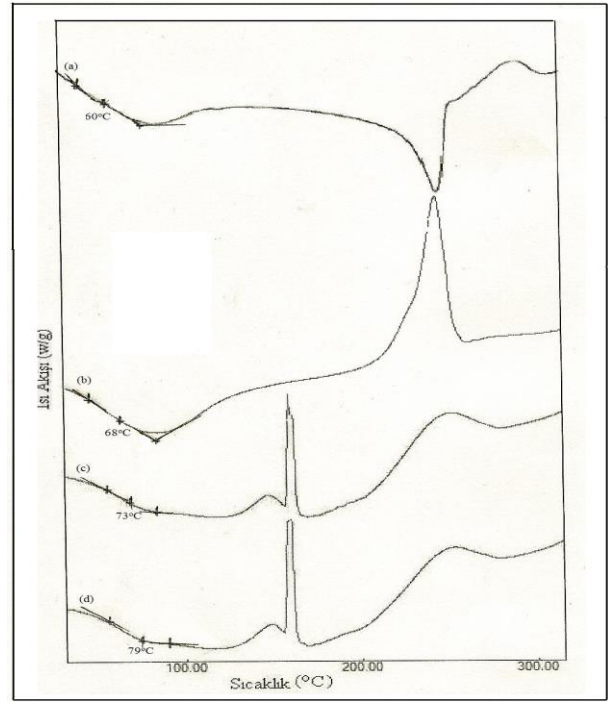
Şekil 2. (a) 5-FU, (b) D₁ (c) D₀ formülasyonlu kürelerin FTIR spektrumları.

Çizelge 2. 5-FU, D₁ ve D₀ formülasyonlu kürelerin ana absorpsiyon bantlarının konum ve yoğunluklarındaki değişim

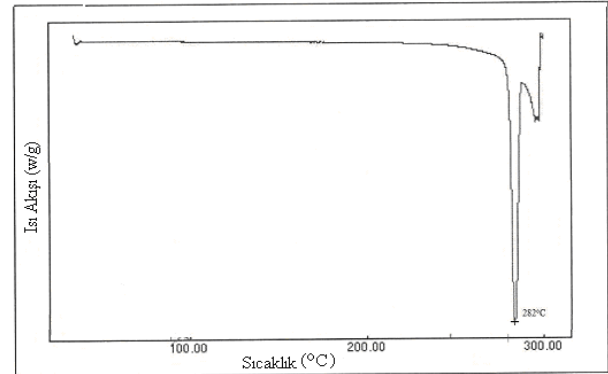
Dalga Sayısı cm ⁻¹			Fonksiyonel Grup
5-FU	D ₁	D ₀	
3000-3500			-NH
1220	1180		C-F
1638	1625	1632	C=O
	3380	3340	O-H
	2858	2740	C-H

PVA, NaAlg, D₀ ve D₁ formülasyonlu kürelerin DSC termogramları Şekil 2.'de sunuldu. Şekil 3.'deki DSC termogramlarından PVA'nın camsı geçiş sıcaklığı (T_g) değeri 60°C, NaAlg'ın T_g değeri 68°C, D₀ formülasyonlu boş kürelerin T_g değeri 73°C ve D₁ formülasyonlu ilaç yüklü kürelerin T_g değeri 79°C olarak bulundu. Eğimlerin kesişme noktaları T_g olarak alındı. Kürelerin T_g değerlerindeki bu artışın polimer matrisi ile Fe³⁺ iyonu arasındaki güçlü çapraz bağlanmadan kaynaklandığının bir kanıtı olduğu düşünüldü. Ayrıca Şekil 4'de 5-FU'ya ait DSC termogramı görülmektedir. Termogramda 5-FU'nun erime noktası 282 °C olarak belirlenmiştir ve D₁ formülasyonlu kürenin DSC termogramında ilaca ait

erime pikinin görülmemesi ilacın küre içinde homojen dağıldığını göstermektedir.

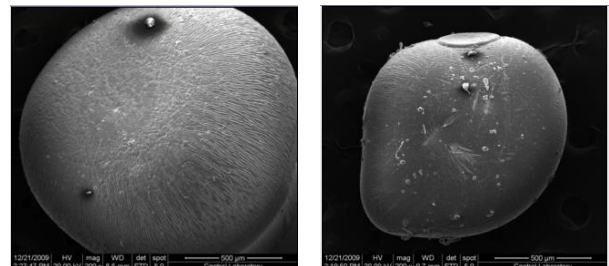


Şekil 3. a) NaAlg, b) PVA, c) D₀ ve d) D₁ formülasyonlu kürelere ait DSC termogramları.



Şekil 4. 5-FU'ya ait DSC termogramı.

D₀ ve D₁ formülasyonlu kürelerin morfolojisi, taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelendi ve Şekil 5.'de sunuldu. Tüm mikrograflar, hazırlanan kürelerin neredeyse küresel bir şekle sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 5. a) D₀ ve b) D₁ formülasyonlu kürelere ait SEM mikrografları.

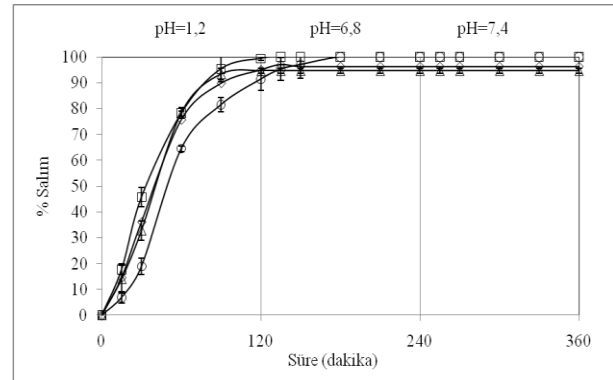
3.2 Küre Bileşiminin Parçacık Boyutu, Tutuklama Verimi Ve Verim Değeri Üzerine Etkisi

Küre bileşiminin, ilaç/polimer oranının çapraz bağlama süresi ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun tutuklama, küre oluşum verimi ve çap değerleri üzerindeki etkileri de araştırıldı ve Çizelge 1.'de gösterildi. Çizelge 1. incelendiğinde kürelerin tutuklama verimlerinin %29.12-79.61 aralığında değiştiği, kürelerde çapraz bağlama süresi 10 dakikada 20 dakikaya çıkarıldığında ise küre verimde ve tutuklama veriminde düşme gerçekleştiği görülmektedir. Bu durum kürelerin çapraz bağlama çözeltisine maruz kalma süresinin artmasıyla, 5-FU'nun çapraz bağlama çözeltisine salınmasına atfedilebilir (Işıklan 2006). Çizelge 1 incelendiğinde çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun 0.2 M'den 0.05 M'ye azaltılmasıyla tutuklama ve küre verimlerinin azaldığı görülmektedir. Bu durumun çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun artmasıyla artan çapraz bağlanma yoğunluğu nedeniyle polimer matrisi içindeki serbest hacmin azalması neticesinde oluştuğu düşünülmüştür. Benzer sonuçlar Soppirath ve Aminabhavi (2002) tarafından da ifade edilmiştir. Ayrıca PVA/NaAlg oranı arttıkça tutuklama veriminde artış gözlenmiştir. Bu nedenle PVA'nın 5-FU tutuklamasında önemli etkisi olduğu söylenebilir. Ayrıca Çizelge 1'den ilaç/polimer oranının 1/1'den 1/8'e azaltılmasıyla küre çaplarının 0.79 ± 0.04 mm'den 1.24 ± 0.01 mm'ye arttığı görülmektedir. Küre çaplarındaki bu artışın nedeninin kürelerde 5-FU içeriğinin azalmasıyla polimer miktarının arttığı polimerik kürelerde daha gevşek bir yapı oluştuğu düşünülmüştür. Bununla beraber diğer küre hazırlama koşulu değişimiyle küre veriminde ve çaplarında önemli bir değişim gözlenmemiştir.

3.3 PVA/NaAlg Oranının 5-FU Salımı Üzerine Etkisi

PVA/NaAlg oranının ilaç salımı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla PVA/NaAlg oranı 1/1-1/4 aralığında değiştirilerek hazırlanan kürelerden 5-FU salımı incelendi ve sonuçlar Şekil 6.'da sunuldu. Şekil 6. incelendiğinde PVA/NaAlg oranı 1/4 olan kürelerde 5-FU salımının diğer oranlara kıyasla daha kontrollü gerçekleştiği ve en yüksek ilaç salımına ulaştığı (%96.3) görülmektedir. PVA ve NaAlg

karışımı ağ yapıya sahiptir ve Fe^{3+} iyonları sadece aljinat zincirlerine bağlanır, PVA zincirleriyle çapraz bağ oluşturmaz. Bu nedenle kürelerdeki PVA oranı arttıkça çapraz bağ yoğunluğu azalmış ve kürelerden 5-FU salımı artmıştır. Benzer şekilde kürelerdeki NaAlg miktarının artmasıyla ağ yapıdan ilacın ortama difüzyonu daha yavaş ve kontrollü gerçekleşir ve ani salım (burst effect) engellenir. Bulut ve Şanlı (2016) yağ/su emülsiyonu yöntemiyle Fe^{3+} ile çapraz bağlı poli(vinil alkol)-aşı-poliakrilamid (PVA-g-PAAM)/sodyum aljinat (NaAlg)/sodyum karboksimetil selüloz (NaCMC) mikroküreleri hazırlamış ve bu mikrokürelerden bir Alzheimer ilacı olan donepezil hidroklorürün (DP) kontrollü salımını incelemişlerdir. PVA-g-PAAM/NaAlg/NaCMC oranının 1/2/1'den 3/2/1'e değişmesinin, mikrokürelerden DP salımında bir artışa neden olduğunu ve bu artışın PVA-g-PAAM varlığının mikrokürelerin hidrofilik karakterini artırması sebebiyle gerçekleştiğini bildirmişlerdir. 5-FU salımının daha kontrollü gerçekleştiği ve en yüksek ilaç salımına ulaşması sebebiyle çalışmanın bundan sonraki kısmında PVA/NaAlg oranı 1/4 olarak belirlendi.



Şekil 6. PVA/NaAlg oranının 5-FU salımı üzerine etkisi (◊: A1, □: B1, Δ: C1, ○: D1)

Denge şişme deneyleri, çeşitli ilaç içermeyen küre formülasyonları için farklı pH değerlerindeki (1.2, 6.8 ve 7.4) tampon çözeltilerinde gerçekleştirildi ve sonuçlar Çizelge 3.'de sunuldu. Çizelge incelendiğinde pH=1.2'de kürelerdeki NaAlg miktarının artmasıyla şişme değerlerinin azaldığı belirlendi. Bunun sebebinin de asidik ortamda NaAlg'nin aljinik asit formuna dönüşmesinden kaynaklandığı düşünüldü (Swamy and Yun 2015). Ayrıca sonuçlardan görüldüğü gibi bütün

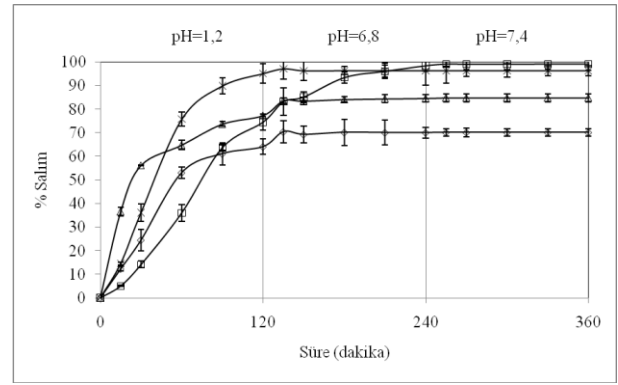
formülasyonlar için pH arttıkça şişme değerlerinin arttığı ve en yüksek şişme değerlerinin ise pH 7.4'de gerçekleştiği tespit edildi.

Çizelge 3. Değişik formülasyonlarda hazırlanan boş kürelerin denge şişme değerleri (%).

No	pH=1.2	pH=6.8	pH=7.4
A ₀	242.5±1.9	576.5±8.0	598.8±5.9
B ₀	240.3±2.4	610.5±1.9	768.9±1.8
C ₀	207.1±1.0	634.2±4.1	863.4±3.2
D ₀	202.7±2.9	638.6±7.0	1014.0±4.1

3.4 İlaç/Polimer Oranının 5-FU Salımı Üzerine Etkisi

Farklı miktarda ilaç yüklemelerinde kürelerin gösterdiği salım profilleri Şekil 7.'de gösterildi. Salım verileri kürelerdeki ilaç miktarının azalmasıyla kümülatif salım yüzdesinin arttığını göstermektedir. İlaç/polimer oranı 1/8'den 1/1'e çıktıkça kürelerin 5-FU içeriği artar. Düşük ilaç içeriği, polimer matriksinde daha az sayıda ilaç molekülünün taşınacağı daha fazla boş boşlukların bulunması nedeniyle tampon çözeltinin kürelere daha kolay nüfuz etmesine yol açabilir bu nedenle ilacın kürelerden salım ortamına difüzyonu daha hızlı olabilir. Benzer salım profilleri çeşitli araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Swamy vd (2012) yağ içinde su (w/o) emülsiyon yöntemiyle hazırladıkları NaAlg/PVA blend mikro kürelerden metformin hidroklorür (MHC) kontrollü salımı üzerine çalışmışlar ve mikrokürelerdeki MHC içeriğinin %5 (m/m)'den %15 (m/m)'e artırılmasıyla kümülatif ilaç salımının %96'dan %75'e azaldığını bulmuşlardır. Soppirnath ve Aminabhavi (2002) yağ/su emülsiyonu yöntemiyle hazırladıkları poliakrilamid-aşı-guar gum mikrokürelerden antihipertansif ilaç olan nifedipinin kontrollü salımını üzerine çalışmışlar ve mikrokürelerin ilaç içeriğinin %5 (m/m)'den %20 (m/m)'ye artmasıyla kümülatif ilaç salımının %80'den %40'a kadar düştüğünü bildirmişlerdir.

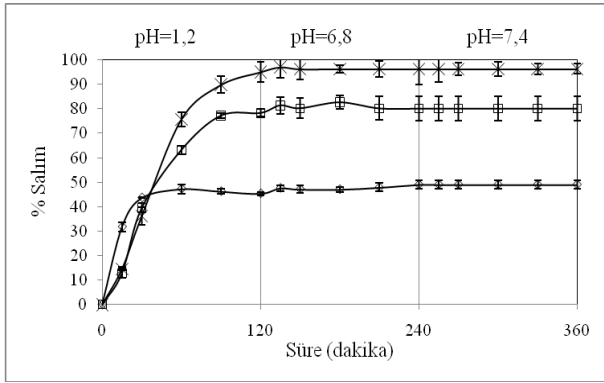


Şekil 7. İlaç/polimer oranının 5-FU salımı üzerine etkisi (x: D₁, ○: D₂, □: D₃, △: D₄)

3.5 FeCl₃ Derişiminin 5-FU Salımı Üzerine Etkisi

Çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun kürelerden 5-FU salımı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla salım çalışması D₁, D₅ ve D₆ formülasyonlu küreler ile gerçekleştirildi ve salım sonuçları Şekil 8.'de sunuldu. Şekil incelendiğinde kümülatif ilaç salım miktarının, düşük FeCl₃ konsantrasyonunda (0.05 M) oldukça yüksek iken, yüksek FeCl₃ konsantrasyonunda (0.2 M) düşük olduğu görülmektedir. Yüksek FeCl₃ konsantrasyonlarında, polimer zincirleri arasındaki çapraz bağ yoğunluğunun daha yüksek olması nedeniyle kürelerdeki mikro boşluklar daralır bunun sonucunda da polimerik zincirler daha sert hale gelir ve polimer matrisinden 5-FU'nun difüzyonu güçleşir. Bu da kümülatif ilaç salımının azalmasına neden olur. Benzer sonuçlar literatürde bulunmaktadır. Zeng W. vd (2021) yaralanan periferik sinirde sinir büyüme faktörünün (NGF) salınımını kontrol etmek için, tripolifosfat ile iyonik olarak çapraz bağlı NGF yüklü kitosan/PLGA (TPP/Kitosan/PLGA-NGF) kompozit mikroküreler hazırlamışlar, çalışma sonucunda TPP derişiminin %1'den %10'a artırılmasıyla kümülatif NGF salımının yaklaşık %70'de %40'a azaldığını bildirmişlerdir. Al-Kahtani ve Sherigara (2014) emülsiyon çapraz bağlama yöntemiyle glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlı akrilamid-aşı-sodyum aljinat mikroküreleri hazırlayarak bu mikrokürelerden diklofenak sodyumun (DS) kontrollü salımı üzerine çalışmışlardır. GA miktarının 3 mL'den 9 mL'ye artırılmasıyla biraz daha yavaş bir DS salım oranı gösterdiğini bunun nedeninin de GA miktarının 3 mL'den 9 mL'ye yükseldiğinde polimer zincirlerinin

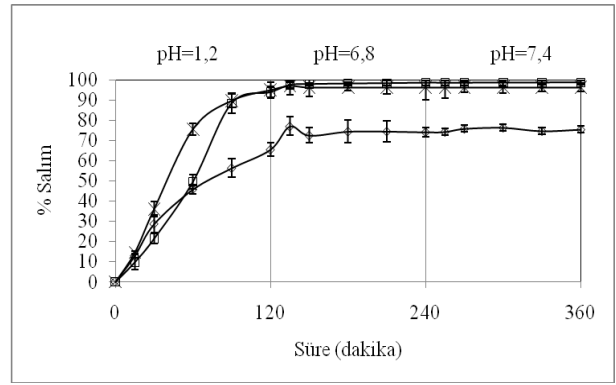
daha sıkı çapraz bağlı katı ağ yapısının oluşması olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 8. FeCl₃ konsantrasyonunun 5-FU salımı üzerine etkisi, (x: D₁, □: D₅, ◇: D₆)

3.6 Çapraz Bağlama Süresinin 5-FU Salımı Üzerine Etkisi

Kürelerden ilaç salımını değiştirmenin yollarından biri de küreleri çapraz bağlama çözeltiline çeşitli sürelerde maruz bırakarak polimer matrisinin çapraz bağlanma yoğunluğunu değiştirmektir. Çapraz bağlama süresinin 5-FU salım hızı üzerindeki etkisi, kürelerin çapraz bağlama çözeltiline maruz kalma süresi 10 ila 20 dakika arasında değiştirilerek araştırıldı ve sonuçlar Şekil 9.'da sunuldu. Şekil 9.'dan görülebileceği gibi, çapraz bağlanma süresinin 10 dakikadan 20 dakikaya çıkmasıyla 5-FU salımı azaldı, 10 dakikalık çapraz süresi ile hazırlanan küreler için maksimum 5-FU salımı elde edildi. Polimerin çapraz bağlanma çözeltiline maruziyetinin artırılması, makromoleküler zincirlerin daha yüksek derecede çapraz bağlanmasına yol açar ve serbest hacim düşer. Bu durum hem çözücü moleküllerinin polimer matrisine nüfuzunu hem de 5-FU moleküllerinin salım ortamına difüzyonunu daha zor hale getirir. Bulut ve Şanlı (2013) yağ/su emülsiyonu yöntemiyle donepezil hidroklorür yüklü iyonik çapraz bağlı NaAlg mikrokürelerin hazırlayarak mikroküre hazırlama koşullarının ilaç salımı üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla mikrokürelerin CaCl₂'ye maruz kalma süresini 15 dakikadan 120 dakikaya değiştirmişlerdir. Salım sonuçlarının artan çapraz bağlama süresi ile salım hızının azaldığını ve maksimum ilaç salımının 15 dakika çapraz bağlama süresi ile hazırlanan mikroküreler için 150 dakika sonunda %99.6 olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 9. Çapraz bağlama süresinin 5-FU salımı üzerine etkisi (x: D₁, □: D₇, ◇: D₈)

3.7 Kinetik Sonuçların Analizi

ilaç salım mekanizmalarını anlamak için sonuçlar yarı deneysel bir denklem (Eşitlik (4)) kullanılarak analiz edildi. Salım sonuçlarının kinetik olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen salım hız sabiti olan k, salım mekanizmasını belirleyen n, korelasyon katsayısının karekökü olan r ve difüzyon katsayısı olan D değerleri Çizelge 4.'de verildi.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (4)$$

Küreler için, 0.43 ile 0.85 arasındaki n değerleri hem difüzyon kontrollü ilaç salımının hem de şişme kontrollü ilaç salımının Fick difüzyonuna uymadığının bir göstergesidir. 0.85'in üzerindeki değerler, jel şişmesi sırasında polimer gevşemesi ile ilgili Durum-II taşınımını gösterir. 0.43'ün altındaki değerler, polimerden ilaç salımının Fick difüzyonundan kaynaklandığını gösterir (Dai *et al.* 2008). Sonuçlar incelendiğinde kürelerden 5-FU salımının Fick difüzyonuna uymayan aktarım olduğu gözlenmektedir.

Çizelge 4. Kinetik sonuçlar.

No	k (min ⁻ⁿ)	n	r	D (cm ² s ⁻¹) x10 ⁻¹²	Difüzyon Mekanizması
A ₁	0.017	0.7565	0.899	8.98	Fick'e uymayan
B ₁	0.092	0.4458	0.865	4.88	Fick'e uymayan
C ₁	0.062	0.5100	0.862	4.81	Fick'e uymayan
D ₁	0.066	0.5015	0.872	4.21	Fick'e uymayan
D ₂	0.050	0.4891	0.897	0.96	Fick'e uymayan
D ₃	0.0073	0.9003	0.947	3.83	Durum-II
D ₄	0.235	0.2361	0.930	1.38	Fick Difüzyonu
D ₅	0.072	0.4572	0.869	2.77	Fick Difüzyonu
D ₆	0.260	0.1297	0.891	0.19	Fick Difüzyonu
D ₇	0.025	0.6838	0.911	6.51	Fick'e uymayan
D ₈	0.049	0.5030	0.926	3.43	Fick'e uymayan

Sulu ilaç çözeltisinin kürelerden taşınması için difüzyon katsayıları (D değerleri) Eşitlik (5) ile sorpsiyon ve desorpsiyon sonuçları kullanılarak hesaplandı.

$$D = \left(\frac{r\theta}{6M_{\infty}}\right)^2 \pi \quad (5)$$

Burada, θ değeri M_t/M_{∞} 'un $t^{1/2}$ 'ye karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun eğimi, r küresel yapıdaki partiküllerin çapı, M_{∞} ise ∞ zamanda salınacak etken madde miktarıdır (Babu *et al.* 2008). Sorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları için Eşitlik (5)'ten hesaplanan D değerleri de Çizelge 4'te sunuldu. Çizelge 4. İncelendiğinde desorpsiyon için hesaplanan D değerlerinin sorpsiyon için gözlemlenenlerden daha küçük olduğu ve bu değerlerin 0.96×10^{-12} ile 8.98×10^{-12} cm²s⁻¹ arasında değiştiği görülmektedir. PVA/NaAlg oranının 1/1'den 1/8'e değişimiyle difüzyon katsayısı 8.98×10^{-12} cm²s⁻¹ den 4.21×10^{-12} cm²s⁻¹ e düşüş göstermiştir. NaAlg miktarındaki bu artış salım sonuçları ile uyumlu olarak difüzyon katsayısının

düşmesine neden olmuştur. Aynı durum çapraz bağlayıcı derişimin 0.05 M'dan 0.2 M'a artırılması için de geçerlidir. Polimer matrisindeki çapraz bağ yoğunluğunun artması neticesinde zincirin artan sertliği daha fazla su molekülünün taşınmasını engellemiş bu durum da difüzyon katsayısının düşmesine neden olmuştur. Benzer sonuçlar literatürde de bildirilmektedir (Babu *et al.* 2007). Ayrıca D değerleri artan ilaç/polimer oranıyla azalmıştır.

4. Tartışma ve Sonuç

5-FU içeren NaAlg/PVA blend küreler, iyonik çapraz bağlanma yöntemiyle başarılı bir şekilde hazırlandı ve Fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR), taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ile karakterize edildi. DSC termogramları, Fe³⁺ iyonunun NaAlg zincirlerini çapraz bağladığını doğruladı. Kürelerden 5-FU salımı ilaç/polimer oranındaki azalma ile artarken, FeCl₃ derişiminin ve çapraz bağlanma süresinin artmasıyla azaldığı belirlendi. Optimum 5-FU salımı, 6 saatin sonunda 1/4 NaAlg/PVA (m/m) oranı, 1/8 ilaç/polimer oranı, 10 dakikalık çapraz bağlanma süresi ve 0.05 M FeCl₃ derişimi için %96.3 olarak elde edildi. Kürelerden 5-FU salımı için hesaplanan n değerleri, 5-FU salımının ya $n < 0.43$ değerinin altındaki Fick difüzyonu ya da Fick'e uymayan difüzyon ($n = 0.43-0.85$) izlediğini gösterdi.

Teşekkür

Yazarlar, desteklerinden dolayı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'ne teşekkür eder.

5. Kaynaklar

- A.AL-Kahtani, A, Sherigara, BS, 2014. Semi-interpenetrating network of acrylamide grafted-sodium alginate microspheres for controlled release of diclofenac sodium, preparation and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **115**, 132–138.
- Agarwal, T, Gautham Hari Narayana, SN, Pal, K, Pramanik, K, Giri, S, Banerjee, I, 2015. Calcium alginate-carboxymethyl cellulose beads for colon-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, **75**, 409-417.

- Arafat, M, Prestidge, CA, Fouladian, P, Wignall, A, Song, Y, Parikh, A, Albrecht, H, Garg, S, Blencowe A, 2021. Development and In Vitro Evaluation of 5-Fluorouracil-Eluting Stents for the Treatment of Colorectal Cancer and Cancer-Related Obstruction. *Pharmaceutics*, **13**, 17.
- Babu, VR, Sairam, M, Hosamani, KM, Aminabhavi, TM, 2007. Preparation of sodium alginate–methylcellulose blend microspheres for controlled release of nifedipine. *Carbohydrate Polymers*, **69**, 241-250.
- Bulut, E, Şanlı O, 2013. Delivery of Alzheimer's Drug Donepezil Hydrochloride from Ionically Crosslinked Alginate Microspheres Prepared by Water-in-oil Emulsion Technique: Optimization of Release Conditions. *Asian Journal of Chemistry*, **25**, 3993-4000.
- Bulut, E, Şanlı, O, 2016. Novel ionically crosslinked acrylamide-grafted poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/sodium carboxymethyl cellulose pH-sensitive microspheres for delivery of Alzheimer's drug donepezil hydrochloride: Preparation and optimization of release conditions. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **44**(2), 431-442.
- Cutrim, ESM, Vale, AAM, Manzani, D, Barud, HS, Rodriguez-Castellon, E, Santos, APSA, Alcantra, ACS, 2021. Preparation, characterization and in vitro anticancer performance of nanoconjugate based on carbon quantum dots and 5-fluorouracil. *Materials Science & Engineering C*, **120**, 111781.
- Dai, YN, Li, P, Zhang, JP, Wang, AQ, Wei, Q, 2008. "Swelling Characteristics and Drug Delivery Properties of Nifedipine-Loaded pH Sensitive Alginate–Chitosan Hydrogel Beads. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, **86**, 493-500.
- Dev, A, Mohan, JC, Sreeja, V, Tamura, H, Patzke, GR, Hussain, F, Weyeneth, S, Nair, SV, Jayakumar, R, 2010. Novel carboxymethyl chitin nanoparticles for cancer drug delivery applications. *Carbohydrate Polymers*, **79**, 1073-1079.
- He, T, Wang, W, Chen, B, Wang, J, Liang, Q, Chen, B, 2020. 5-Fluorouracil monodispersed chitosan microspheres: microfluidic chip fabrication with crosslinking, characterization, drug release and anticancer activity, *Carbohydrate Polymers*, **236**, 116094.
- Işıklan, N, 2006. Controlled Release of Insecticide Carbaryl from Sodium Alginate, Sodium Alginate/Gelatin, and Sodium Alginate/ Sodium Carboxymethyl Cellulose Blend Beads Crosslinked with Glutaraldehyde, *Journal of Applied Polymer Science*, **99**, 1310-1319.
- Lin, CC, Fu, CH, 2009. Controlled release study of 5-fluorouracil-loaded chitosan/polyethylene glycol microparticles. *Drug Delivery* **16**, 274-279.
- Olukman, M, Şanlı, O, Kondolot Solak, E, 2012. Release of anticancer drug 5-fluorouacil from different ionically crosslinked alginate beads. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, **3**, 469-479.
- Rama Subba Reddy, P, Eswaramma, S, Krishna Rao, KSV, Ill Lee, Y, 2014. Dual responsive pectin hydrogels and their silver nanocomposites: swelling studies, controlled drug delivery and antimicrobial applications. *Bulletin of Korean Chemical Society*, **35**, 2391-2399.
- Ramesh Babu, V, Hosamani, KM, Aminabhavi TM, 2008. Preparation and in-vitro release of chlorothiazide novel pH-sensitive chitosan-N,N-dimethylacrylamide semi-interpenetrating network microspheres, *Carbohydrate Polymers*, **71**, 208–217.
- Soppirath, KS, Aminabhavi, TM, 2002. Water transport and drug release study from cross-linked polyacrylamide grafted guar gum hydrogel microspheres for the controlled release application. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **53**, 87–98.
- Swamy, BY, Yun, YS, 2015. In vitro release of metformin from iron (III) cross-linked alginate-carboxymethyl cellulose hydrogel beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, **77**, 114-119.
- Şanlı, O, Ay, N, Işıklan, N, 2007. Release characteristics of diclofenac sodium from poly(vinyl alcohol)/sodium alginate and poly(vinyl alcohol)-grafted-poly(acrylamide)/sodium alginate blend beads. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **65**, 204-214.
- Şanlı, O, Olukman, M, 2014. Preparation of ferric ion crosslinked acrylamide grafted poly (vinyl alcohol)/sodium alginate microspheres and application in controlled release of anticancer drug 5-fluorouracil. *Drug Delivery*, **21**(3), 213-220.
- Şanlı, O, Kahraman, A, Kondolot Solak, E, Olukman, M, 2016. Preparation of magnetite-chitosan/methylcellulose nanospheres by entrapment and adsorption techniques for targeting the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **44**, 950-959.

World Health Organization, 2019. World Health Organization Model List of Essential Medicines, 21st List ed., Geneva, Switzerland.

Yerri Swamy, B, Venkata Prasad, C, Reddy, CLN, Sudhakara, P, Chung, I, Subha, MCS, Chowdoji Rao, K, 2012. Preparation of Sodium Alginate/Poly(vinyl alcohol) Blend Microspheres for Controlled Release Applications. *Journal of Applied Polymer Science* **125**, 555–561.

Zeng, W, Hui, H, Liu, Z, Chang, Z, Wang, M, He, B, Hao, D, 2021. TPP ionically cross-linked chitosan/PLGA microspheres for the delivery of NGF for peripheral nerve system repair. *Carbohydrate Polymers*, **258**, 117684.