

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**KONTROLLÜ AKTİF MOLEKÜL SALIMI YAPAN PEKTİN
TEMELLİ HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Ayşe Banu KOCAAĞA

Kimya Mühendisliği Bölümü

Kimya Mühendisliği Programı

HAZİRAN 2021

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**KONTROLLÜ AKTİF MOLEKÜL SALIMI YAPAN PEKTİN TEMELLİ
HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Ayşe Banu KOCAAĞA
(506912019)**

Kimya Mühendisliği Bölümü

Kimya Mühendisliği Programı

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşe Özge Kürkçüoğlu LEVİTAS
Eş Danışman: Prof. Dr. Fatma Seniha GÜNER**

HAZİRAN 2021

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 506912019 numaralı Doktora Öğrencisi Ayşe Banu KOCAAĞA, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KONTROLLÜ AKTİF MOLEKÜL SALIMI YAPAN PEKTİN TEMELLİ HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç.Dr. Ayşe Özge KÜRKÇÜOĞLU LEVİTAS**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Prof.Dr. Fatma Seniha GÜNER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Mehmet Gökтуğ AHUNBAY**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Fethiye Aylin SUNGUR
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nihan NUGAY
Boğaziçi Üniversitesi

Prof. Dr. Turgut NUGAY
Boğaziçi Üniversitesi

Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ
İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi

Teslim Tarihi : 21 Mayıs 2021
Savunma Tarihi : 24 Haziran 2021





Anneme,



ÖNSÖZ

Doktora çalışmamın her aşamasında kıymetli düşünce, bilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bakış açısından her zaman etkilendiğim, kendisi ile beraber çalışma, deneyimleri ve inovatif fikirlerinden istifade etme imkanına sahip olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim çok kıymetli tez hocam Sayın Doç. Dr. Özge KÜRKÇÜOĞLU LEVİTAS'a en içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Doktora çalışmam boyunca kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum, bu imkana sahip olduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim, sahip olduğu geniş bilgi yelpazesinin ışığıyla geliştiğime, çok şey öğrendiğime inandığım, kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile akademik ve bilimsel gelişimime büyük katkı sağlayan, çok yoğun olduğu zamanlarda bile ilgisini, hoş görüşünü esirgemeyen çok kıymetli tez hocam Sayın Prof. Dr. F.Seniha GÜNER'e en içten teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Doktora çalışmama çok değerli bilgi ve birikimleriyle katkıda bulunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Melkon TATLIER'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora çalışmam boyunca manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Melek TÜTER'e teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Her biri benim için ayrı bir ders niteliğinde olan proje toplantılarında kıymetli bilgilerinden yararlanma imkanı bulduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Aylin SUNGUR ve Sayın Prof. Dr. Ahmet SİRKECİOĞLU'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora çalışmamın ilk yıllarından beri destekleri için Sayın Dr. Cemile YERLİKAYA ve Sayın Doç. Dr. Çiğdem ORAL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu süreç boyunca kendileriyle çalışmaktan keyif aldığım başta Tuğçe İNAN ve Zeynep Güner YILMAZ; son iki sene boyunca, özellikle içinde bulunduğumuz zorlu pandemi günlerinde beraber çalıştığımız Ceren KURÇİN, Bora YILDIRIM, Nergishan İYİSAN ve Polimer Araştırma Laboratuvarlarında birlikte çalışma imkanı bulduğum çok sayıdaki tüm değerli genç arkadaşlarıma ve bana bu kıymetli 'beyinler' ile çalışma imkanı veren hocam Sayın Prof. Dr. F. Seniha GÜNER'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Enstrümental analiz çalışmalarımıza özverili bir şekilde destek olan Mühendis Esra ENGİN, Selin DEMİRCİ ve Serap GÜL'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmasında maddi destek sağlayan 115M439 numaralı 'Kronik İnflamatuvar Deri Hastalıklarının Topikal Tedavisinde Kullanılacak Kontrollü İlaç Salım Sistemi Tasarımı: Steroid Yüklü MOF/Pektin İçeren Yara Örtüsü' adlı 1001 projesi ile TÜBİTAK'a ve MGA-2018-41165 numaralı 'Kontrollü İlaç Salımı için Zeolit-Pektin Kompozitlerin Hesaplamalı ve Deneysel Yöntemlerle Geliştirilmesi' adlı BAP projesi ile İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunuyorum.

Yoğun çalışmalarım esnasında, hoşgörü ve sabırla her zaman yanımda olan başta sevgili eşim Mustafa KOCAAĞA'ya ve canım çocuklarım Emir, Buğra ve Sude'ye; diğer yarım olan sevgili ablam Tuba ARABACIOĞLU'na hayatım boyunca gösterdikleri destek ve koşulsuz sevgileri için çok teşekkür ediyorum.

Ve ulaştığım her aşamada, her başarıda en büyük destekçim olan, bu günlere gelmemi sağlayan, seneler sonra bu yolculuğa başlamam ve sürdürmem için çok büyük fedakarlıkla bana destek veren, her zaman yanımda olan, her zorlu çalışmanın ardından kendisini arayıp rahatlamamı sağlayan ve tez aşamasının son aylarında çok ani bir şekilde aramızdan ayrılan biricik, sevgili anneciğim Ayşe Zahide ARABACIOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunmak istiyorum.

Haziran 2021

A. Banu KOCAAĞA
(Kimya Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xvii
SEMBOLLER	xix
ÇİZELGE LİSTESİ	xxi
ŞEKİL LİSTESİ	xxiii
ÖZET	xxix
SUMMARY	xxxi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1 Deri	5
2.2 Yara	6
2.2.1 Yaraların sınıflandırılması	6
2.2.2 Yara iyileşmesinin fazları	10
2.2.2.1 Hemostasis	11
2.2.2.2 İnflamasyon fazı	12
2.2.2.2 Proliferasyon fazı	12
2.2.2.4 Matürasyon fazı	12
2.3 Yara iyileşmesini etkileyen faktörler	13
2.3.1 Lokal faktörler	15
2.3.2 Sistemik faktörler	15
2.4 Yara tedavisinin tarihsel gelişimi	16
2.5 Yara örtüleri	19
2.5.1 Yara iyileşmesi ve fitoterapi	19
2.5.2 İdeal yara örtüsü kriterleri	20
2.5.3 Yara örtülerinin sınıflandırılması	21
2.5.3.1 Geleneksel yara örtüleri	22
2.5.3.2 Biyomalzeme temelli yara örtüleri	22
2.5.3.3 Gelişmiş yara örtüleri	23
2.6 Polisakkarit temelli yara örtüleri	26
2.7 Pektin	30
2.7.1 Biyomedikal uygulamalarda pektin temelli jeller	34
2.7.1.1 Nazal ilaç salımında pektin	35
2.7.1.2 Kanseri hedefli ilaç salımında pektin	35
2.7.1.3 Doku mühendisliğinde pektin jeller	35
2.7.1.4 Üç- boyutlu baskı tekniğinde pektin jeller	36
2.7.1.5 Yara örtüsünde pektin jeller	36
2.8 Kontrollü Salım	38
2.9 Dünyada ve Türkiye’de Yara Örtüsü Pazarı	38

3. MOLEKÜLER MODELLEME VE SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ.....	41
3.1 Monte Carlo Simülasyonları.....	43
3.2 Moleküler Dinamik Simülasyonları.....	43
3.3 Kuvvet Alanı.....	46
3.3.1 Karbonhidratlar için en yaygın kullanılan kuvvet alanları.....	48
4. DÜŞÜK METOKSİ- VE YÜKSEK METOKSİ-PEKTİN MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI.....	53
4.1 Giriş.....	53
4.2 Başlangıç Modellerinin Oluşturulması.....	55
4.3 Gezinge Analizi	58
4.3.1 Radyal dağılım fonksiyonu (RDF).....	58
4.3.2 Uçtan uca uzaklık (R_n) ve Dönme yarıçapı (R_n).....	59
4.4 Sonuçlar ve Tartışma.....	59
4.5 Vargılar.....	80
5. PEKTİN HİDROJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU ...	83
5.1 Giriş.....	83
5.2 Malzeme ve Yöntemler	87
5.2.1 Malzemeler	87
5.2.2 Hidrojel filmlerin hazırlanması.....	88
5.2.3 Çok katmanlı filmlerin hazırlanması.....	88
5.2.4 İlaç salım performansı.....	89
5.3 Sonuçlar ve Tartışma.....	90
5.3.1. Katman sayısının belirlenmesi.....	90
5.4 Vargılar.....	93
6. PEKTİN HİDROJELLERDEN KONTROLLÜ SALIM İÇİN OPTİMUM İLAÇ KONSANTRASYONUN MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARIYLA TAHMİN EDİLMESİ.....	95
6.1 Giriş.....	95
6.2 Gereçler ve Yöntemler	97
6.2.1 Moleküler dinamik simülasyonları	97
6.2.1.1 Sistemlerin modellenmesi.....	97
6.2.1.2 Gezinge analizi.....	100
6.2.1.3 Uçtan uca uzaklık ve dönme yarıçapı.....	100
6.2.1.4 Radyal dağılım fonksiyonu.....	100
6.2.1.5 Karekök ortalama kare sapma ve karekök ortalama kare dalgalanma	100
6.2.1.6 Karakteristik oran C_n	101
6.2.2 Deneysel yöntemler.....	102
6.2.2.1 Malzemeler	102
6.2.2.2 Hidrojel filmlerin hazırlanması	102
6.2.2.3 İlaç salım performansı	102
6.2.2.4 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC).....	103
6.2.2.5 Taramalı elektron mikroskopu (SEM).....	103
6.2.2.6 Reolojik analiz	103
6.2.2.7 Şişme oranı.....	104
6.2.2.8 Hidrojellerden kalsiyum salımı.....	104
6.3 Sonuçlar ve Tartışma.....	104
6.3.1 Moleküler dinamik simülasyonları	104
6.3.1.1 PGAL ve prokain sistemlerinin moleküler dinamik simülasyonları	104
6.3.1.2 Karakteristik oran hesaplamaları.....	115

6.3.2 Deneyisel çalışma	117
6.3.2.1 Pektin hidrojelilerin ilaç salım performansları	117
6.3.2.2 SEM ve DSC analizi	118
6.3.2.3 Reolojik analiz.....	121
6.3.2.4 Şişme davranışı.....	123
6.4 Vargılar.....	125
7. KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI YAPAN ZEOLİT KATKILI PEKTİN HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ.....	127
7.1 Giriş	127
7.2 Malzeme ve Yöntemler.....	131
7.2.1 Malzemeler.....	131
7.2.2 Zeolit partiküllerine ilaç yüklenmesi	131
7.2.3 İlaç yüklü LM-pektin-zeolit hidrojelilerin hazırlanması	132
7.2.4 Hidrojelilerin yapısal, ısı ve reolojik karakterizasyonu.....	134
7.2.4.1 Fourier transform infrared spektroskopi analizi (FTIR)	134
7.2.4.2 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	134
7.2.4.3 XRD analizi.....	134
7.2.4.4 Çözeltilerin zeta potansiyel analizi.....	134
7.2.4.5 Morfolojik analiz	135
7.2.4.6 Reolojik analiz.....	135
7.2.4.7 Temas açısı.....	135
7.2.4.8 Oksijen geçirgenliği tayini	136
7.2.5 Şişme derecesi	136
7.2.6 Hidrojelilerin iyon salımı.....	136
7.2.7 Hidrojelilerin <i>in vitro</i> ilaç salımı	136
7.2.8 Su buharı geçirgenliği hızı	137
7.2.9 Hidrojelilerin <i>in vitro</i> yara örtüsü karakterizasyonu	137
7.2.9.1 Esneklik.....	137
7.2.9.2 Su tutma kapasitesi	137
7.2.9.3 Dehidrasyon hızı.....	138
7.2.9.4 Dispersiyon özelliği	138
7.2.9.5 pH değeri.....	138
7.2.9.6 Birim alan başına ortalama kütle ve kalınlık.....	139
7.2.10 <i>In vitro</i> hücre canlılığı	139
7.2.11 Hidrojel filmler için <i>in vitro</i> yara iyileşmesi çalışmaları:.....	139
7.2.12 Antibakteriyel analiz.....	140
7.3 Sonuçlar ve Tartışma	140
7.3.1 İlaç yüklü pektin-zeolit hidrojel hazırlama metodu tayini.....	140
7.3.2 Yapısal, ısı ve reolojik karakterizasyon.....	142
7.3.2.1 FT-IR ve DSC analizleri	142
7.3.2.2 XRD spektrofotometre sonuçları.....	145
7.3.2.3 Zeta potansiyel ölçümü	147
7.3.2.4 Taramalı elektron mikroskopu analizi	147
7.3.2.5 AFM analizi.....	149
7.3.2.6 Reolojik analiz.....	150
7.3.2.7 Temas açısı analiz.....	152
7.3.2.8 Oksijen geçirgenliği.....	153
7.3.3 Şişme davranışı	153
7.3.4 Ca ²⁺ ve Zn ²⁺ iyon salımı	154
7.3.5 İlaç yükleme ve salımı	155

7.3.5.1 Zeolit partiküllerine ilaç yükleme ve salımı	155
7.3.5.2 LM-pektin-zeolit hidrojellerinin ilaç salım profili	155
7.3.6 Su buharı geçirgenliği	162
7.3.7 Filmlerin <i>in vitro</i> yara örtüsü karakterizasyonu.....	163
7.3.8 Hücre canlılığı deneyleri	165
7.3.9 <i>In vitro</i> yara iyileşmesi	166
7.3.10 <i>In vitro</i> antibakteriyel analiz.....	167
7.4 Vargılar.....	168
8. SERUM ALBÜMİN SALIMI YAPAN ZEOLİT KATKILI PEKTİN HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ	169
8.1 Giriş.....	169
8.2 Malzeme ve Yöntemler	171
8.2.1 Malzemeler	171
8.2.2 Zeolit katkılı sığır serum albümin yüklü (BSA) hidrojel filmlerin sentezi	171
8.2.2.1 Karıştırma metodu.....	171
8.2.2.2 Adsorpsiyon metodu.....	172
8.2.3 Hidrojel filmlerin karakterizasyonu ve BSA moleküllerinin immobilizasyon davranışı	174
8.2.3.1 BSA moleküllerinin yük dağılım analizi	174
8.2.3.2 Zeta potansiyel ölçümü.....	174
8.2.3.3 Reolojik analiz	174
8.2.3.4 FTIR analizi	175
8.2.3.5 Morfolojik analiz.....	175
8.2.3.6 Temas açısı ölçümü.....	175
8.2.3.7 Şişme oranının hesaplanması	175
8.2.4 <i>In Vitro</i> ilaç salım çalışmaları.....	175
8.2.5 UV-Vis absorpsiyon spektra ölçümleri	176
8.2.6 Circular dichroism (CD) ölçümleri	176
8.2.7 Hidrojel Filmler için <i>in vitro</i> yara iyileşmesi çalışmaları.....	176
8.3 Sonuçlar ve Tartışma.....	176
8.3.1 Moleküler seviyede bileşenler arası etkileşimlerin incelenmesi	177
8.3.1.1 BSA yük dağılımı.....	177
8.3.1.2 Sentez çözeltilerinde pektin-BSA etkileşimi tayini	178
8.3.1.3 Sentez çözeltilerinin zeta potansiyel ölçümleri.....	179
8.3.2 Hidrojellerin reolojik analizi.....	180
8.3.3 BSA yüklü hidrojellerin yapısal ve morfolojik analizi	184
8.3.3.1 FTIR analizi	184
8.3.3.2 AFM analizi	185
8.3.3.3 SEM analizi.....	186
8.3.3.4 Su temas açısı ölçümü	188
8.3.4 Pektin-zeolit hidrojel filmlere BSA yükleme deneyleri.....	189
8.3.4.1 Zeolit partiküllerine BSA adsorpsiyonu	189
8.3.4.2 Pektin-zeolit hidrojel filmlere BSA adsorpsiyonu	190
8.3.5 Hidrojel filmlerin BSA adsorpsiyonu esnasında şişme analizi.....	191
8.3.6 Zeolit partikülleri ve hidrojel filmlerden BSA salımı	192
8.3.7 CD spektrofotometre analizi.....	195
8.3.8 <i>In vitro</i> yara iyileşme analizi	197
8.4 Vargılar.....	198
9. SONUÇLAR	199

KAYNAKLAR.....	203
EKLER	245
ÖZGEÇMİŞ	251





KISALTMALAR

AFM	: Atomic Force Microscope (Atomik Kuvvet Mikroskobu)
ASTM	: American Society for Testing and Materials (Amerikan Test ve Malzeme Kurumu)
Arg	: Arginine (Arjinin)
Asp	: Aspartat
ATR	: Attenuated Total Reflectance (Total Yansıtma)
BSA	: Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albumin)
CarbFF	: Carbohydrate Force Field (Karbonhidrat Kuvvet Alanı)
CD	: Circular Dichroism (Çift yönlü poliarizasyon interferometresi)
CFF	: Consistent Force Field (Tutarlı Kuvvet Alanı)
CG	: Coarse Grained (Kaba Taneli)
CHARMM	: Harvard Makromoleküler Mekanikde Kimya
Cn	: Characteristic Ratio (Karakteristik Oran)
COMPASS	: Condensed-phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies (Atomik Simülasyon Çalışmaları İçin Optimize Edilmiş Yoğun Faz Moleküler Potansiyeller)
CP25	: Conic Plate 25 mm Çaplı (Konik Plaka)
CPK	: Corey, Pauling, Koltun
DSC	: Differential Scanning Calorimetry (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
DE	: Degree of Esterification (Esterleşme Derecesi)
DFT	: Density Functional Theory (Yoğunluk Fonksiyonelleri Teorisi)
ECM	: Extra Cellular Matrix (Hücreler Arası Matris)
EGF	: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektra
G'	: Storage Modulus (Depolama Modülü)
G''	: Loss Modulus (Kayıp Modülü)
GA	: 1-4 alfa D- Galakturonik asit
GAL	: Galakturonik Asit
GAP	: Boşluk
GE	: 1-4 Alfa Esterli D- Galakturonik Asit
Glu	: Glutamin
GN	: 1-4 Alfa Amitli D- Galakturonik Asit
GelMA	: Jelatin Metakrilol
GPTMS	: 3-glisidiloksioproil Trimetoksisilan
GROMOS	: GRONingen Molecular Simülasyonu
HGA	: Homogalakturenan
ICP	: Inductively Coupled Plasma Spectrometer (İndüksiyonla Birleşmiş Plazma Spektrometrisi)
IQR	: Interquartile range (Çeyrekler Açıklığı)
HM	: High Methoxy Pektin (Yüksek Metoksi Pektin)

LM	: Low Methoxy Pektin (Düşük Metoksi Pektin)
LTA	: Zeolit A
Lys	: Lizin
MC	: Monte Carlo
MD	: Moleküler Dinamik
MMP	: Metalloprotenaz
MS	: Materials Studio
Mw	: Molekül Ağırlığı
NIH	: ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NPT	: İsoyarık Topluluk
NVE	: Mikro Kanonik Topluluk
NVT	: Kanonik Topluluk
OTR	: Oksijen Geçirgenlik Hızı
PAF	: Trombosit Etkinleştirici Faktör
PCFF	: Polimer CFF
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)
PGAL	: Poligalakturonik Asit
PP25	: 25 mm Çaplı Paralel Plaka
QM	: Kuantum Mekaniği
RDF	: Radial Distribution Function (Radyal Dağılım Fonksiyonu)
Rg	: Radius of Gyration (Dönme Yarıçapı)
RG-I	: Ramnogalakturonan-I
RG-II	: Ramnogalakturonan-II
RMSD	: Root Mean Square Deviation (Karekök Ortalama Kare Sapma)
RMSF	: Root Mean Square Fluctuation (Karekök Ortalama Kare Dalgalanma)
Rn	: End to End Distance (Uçtan Uca Mesafe)
SEM	: Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
Tg	: Glass Transition Temperature (Camsı Geçiş Sıcaklığı)
TGF	: Transformative Growth Factor (Dönüştürücü Büyüme Faktörü)
TGF-β	: Transforming Beta Growth Factor (Dönüştürücü Beta Büyüme Faktörü)
TRIS	: Hidroksimetil Aminometan
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Damar Endotelial Büyüme Faktörü)
VMD	: Visual Molecular Dynamic (Görsel Moleküler Dinamik)
XRD	: X-ray diffraction (X-ışını difraksiyonu)
WVTR	: Water Vapor Permeability Rate (Su Buharı Geçirgenlik Hızı)
ZSM-5	: Pentasil Alüminosilikat Zeolit

SEMBOLLER

$d_i(0), d_i(t)$	: Monomerler arası mesafe
q	: Faz yükü
t	: Zaman
$g(r)$	: (m,n) çifti dağılım fonksiyonu.
I	: Işık şiddeti
K	: Aborbsiyon katsayısı
L	: Bağ uzunluğu
R	: Atom pozisyonu
t	: Zaman
u,v	: Yer değiştirme vektörü bileşenleri
w	: Açısal hız
$\tan \delta$	: Sönümleme faktörü
ζ	: Zeta potansiyel
α	: Asal gerilme doğrultusundan sapma açısı
η	: Viskozite
(ϕ, ψ)	: Dihedral açıları
W	: Hidrojel kütlesi



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Polimerik yara örtüleri..	23
Çizelge 2.2 : Aljinat temelli ticari yara örtüleri.	28
Çizelge 3.1 : Simülasyonlarda en çok kullanılan topluluklar.	44
Çizelge 4.1 : Pektin zincir atomlarının LM ve HM modelindeki yük dağılımları.....	68
Çizelge 4.2 : Ca iyonunun HM ve LM yapılarında, simülasyon sonunda etkileşime girdiği monomer ve zincir adetleri.	69
Çizelge 5.1 : Çok katmanlı hidrojel tasarım parametreleri.....	91
Çizelge 6.1 : Hesaplamalı ve deneysel çalışmalarla incelenen sistemlerin detayları.	99
Çizelge 6.2 : Modellenen yapıların medyan ve çeyrekler açıklığı hesaplamaları....	107
Çizelge 6.3 : DSC analizi ile hesaplanan erime entalpileri.....	120
Çizelge 7.1 : Deneylerde kullanılan Zeolit-A partikülleri özellikleri.	131
Çizelge 7.2 : Farklı yöntemlerle hazırlanan hidrojel formülasyonları ve ilaç salımları.	133
Çizelge 7.3 : Zeolit ve ilaç miktarı ile katyon cinsinin film yapısına ve ilaç salımına etkisi.....	145
Çizelge 7.4 : Kümülatif ilaç salım miktarına çapraz bağlayıcı miktarının etkisi....	156
Çizelge 7.5 : A7.30Na0, A7.50Na0 ve ticari ürünün <i>in vitro</i> yara iyileşmesi deneyleri sonuçları.	164
Çizelge 7.6 : Pektin ve Pektin-Na zeolit hidrojellerin antibakteriyel etkinlik sonuçları	167
Çizelge 8.1 : Farklı yöntemlerle hazırlanan hidrojel formülasyonları, temas açısı, şişme oranı, BSA adsorblama ve salım miktarı.	173



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Tez çalışmasında izlenilen yol haritası ve gerçekleştirilen çalışmalar.	3
Şekil 2.1 : Deri tabakaları.	5
Şekil 2.2 : Yaraların sınıflandırılması	7
Şekil 2.3 : Yara iyileşme aşamalarının günlere göre gösterimi	8
Şekil 2.4 : Akut ve kronik yara süreci	8
Şekil 2.5 : Yara iyileşmesi kademelerinin şematik gösterimi (a) Yaralanma, (b) Koagülasyon (c) Erken enflamasyon, (d) Geç enflamasyon, (e) Proliferasyon, (f) Yeniden modelleme	11
Şekil 2.6 : Yara iyileşmesine etki eden en genel faktörler	14
Şekil 2.7 : Yara tedavisinde en çok kullanılan bitkiler	20
Şekil 2.8 : Yara örtülerinin sınıflandırılması	22
Şekil 2.9 : Hidrojel temeli yara örtüleri.	26
Şekil 2.10 : Pektin kaynağı olarak meyve ana hücre duvarı.	31
Şekil 2.11 : Pektin polimerinin meyve suyu sanayii yan/atık ürünü olarak üretimi şematik gösterimi.	31
Şekil 2.12 : Pektin zincirlerindeki fonksiyonel gruplar. a) Karboksil b) Ester c) Amit	32
Şekil 2.13 : Pektin zincirlerinin esterleşme derecesi	32
Şekil 2.14 : Pektin zincirlerinin Ca iyonlarıyla oluşturduğu ‘ yumurta kutusu’ adı verilen modelin şematik gösterimi	33
Şekil 2.15 : ABD geleneksel yara iyileşmesi pazar büyüklüğü yan ürünler (a) geleneksel yara örtüleri (b) gelişmiş yara örtüleri.	39
Şekil 3.1 : Bağ içeren ve içermeyen etkileşimler (a) kovalent bağ, (b) bağlı aç, (c) dihedral aç (d) çapraz terim (e) uzun mesafe van der Waals (f) elektrostatik etkileşimlerin şematik gösterimi	48
Şekil 3.2 : Farklı süre ve vibrasyonel hareket mesafelerinde tavsiye edilen moleküler modelleme uygulama aralıkları: kuantum (quantum), tüm atom (all-atom), kaba taneli (coarse-grained) ve orta ölçek (mesoscale)	52
Şekil 4.1 : (a) 1-4 alfa D-galakturonik asit (GA), (b) 1-4 alfa esterlenmiş D-galakturonik asit (GE) ve (c) 1-4 alfa amitlenmiş D-galakturonik asit (GN) monomerleri. Monomerlerin uçtan uca uzunlukları (yeşil kesikli çizgiler, Å) Materials Studio arayüzünde hesaplanmıştır.	55
Şekil 4.2 : Galakturonik asit atomlarının numaralandırılması. Karboksilli grup üzerindeki oksijenler büyük gösterilmiştir.	56
Şekil 4.3 : 21 monomer uzunluktaki pektin zincirleri ve Ca ²⁺ iyonları (turuncu) başlangıç konfigürasyonu. (a) LM model (b) HM model. –COO– üzerindeki oksijenler büyük gösterilmiştir. Su molekülleri saklanmıştır.	57

Şekil 4.4 : LM-pektin zincirleri yumurta kutusu sisteminin anlık görüntüleri; (a) $t = 0$ ps, (b) $t = 250$ ps, ve (c) $t = 500$ ps. -COO- grupları Üzerindeki oksijenler (kırmızı) büyük gösterilmiştir, Ca^{2+} iyonları turuncu renktedir.	60
Şekil 4.5 : HM-pektin zincirleri yumurta kutusu sisteminin anlık görüntüleri; (a) $t = 0$ ps, (b) $t = 250$ ps, ve (c) $t = 500$ ps.	60
Şekil 4.6 : LM-Pektin yapısı Ca^{2+} iyonu ile halka atomları arasındaki RDF analizi: (a) Ca^{2+} - COO-, (b) Ca^{2+} - O4- (ester&amit), (c) Ca^{2+} - OH grupları, (d) Ca^{2+} - O1, (d) Ca^{2+} - O6.	62
Şekil 4.7 : HM-Pektin yapısı Ca iyonu ile halka atomları arasındaki RDF analizi: (a) Ca^{2+} - COO-, (b) Ca^{2+} - O4-(ester&amit), (c) Ca^{2+} - oh grupları, (d) Ca^{2+} - O1, (d) Ca^{2+} - O6.	63
Şekil 4.8 : LM-pektin yapısında Ca^{2+} iyonlarının gezinge boyunca zincir atomlarıyla yaptığı etkileşim.	64
Şekil 4.9 : HM-pektin yapısında Ca^{2+} iyonlarının gezinge boyunca zincir atomlarıyla yaptığı etkileşim.	65
Şekil 4.10 : Halka oksijenleri ile Ca iyonları RDF analizi.	66
Şekil 4.11 : (a) LM-pektin, ve (b) HM-pektin sisteminde Ca^{2+} iyonları ile su molekülleri için RDF analizi.	66
Şekil 4.12 : Simülasyon sonundaki pozisyonlarına göre Ca^{2+} iyonlarının zincir atomları ile ortalama koordinasyon sayıları	69
Şekil 4.13 : (a) LM ve (b) HM-pektin sistemleri $t=500$ ps zamanında Ca^{2+} iyonu ile etkileşimleri. Ca^{2+} iyonunun zincirler ile yaptığı etkileşimler pembe kesikli çizgiler ile gösterilmiştir. HM yapısındaki siyah renkli Ca^{2+} iyonları, simülasyon sonunda, zincirler ile koordine olmayan Ca^{2+} iyonlarıdır.	70
Şekil 4.14 : (a) O5---O1, O1---O6, (b) O4---O7, O1---O6 atomları arasındaki ortak su koordinasyonları.	71
Şekil 4.15 : (a) LM-pektin zinciri -OH hidrojenleri H6 ve H9---O1 arasındaki, (b) LM-pektin -OH hidrjenleri H6 ve H9---O6 arasındaki, (c) HM-pektin zinciri -OH hidrojenleri H6 ve H9---O1 arasındaki, (d) HM-pektin zinciri -OH hidrojenleri---O6 arasındaki hidrojen bağlarını gösteren RDF grafikleri.	72
Şekil 4.16 : (a) karboksil asitli (b) esterli (c) amitli rezidüle bağlı hidroksil hidrojenlerinin (H6, H9) halka oksijenleri ile etkileşim RDF analizleri.	73
Şekil 4.17 : LM-pektin zincirinde oluşan iki zincir arası hidrojen bağının simülasyon süresi boyunca değişimi.	74
Şekil 4.18 : Galakturonik asit rezidüsü için $\phi = O1'-C4'-O6-C2$ $\psi = C4'-O6'-C2-C3$ şeklinde tanımlanmıştır.	75
Şekil 4.19 : Modellerin simülasyon boyunca (ϕ, ψ) açıları.	75
Şekil 4.20 : Modellenen çapraz-bağlı zincirlerin simülasyon süresi boyunca dönme yarıçapı R_g	76
Şekil 4.21 : Modellenen zincirlerin simülasyon süresi boyunca uçtan uca mesafeleri R_n	77
Şekil 4.22 : Karşılıklı monomerler arasındaki mesafe hesaplamaları.	77
Şekil 4.23 : Karşılıklı monomerler arasındaki mesafe hesaplamaları (a) HM pektin (b) LM pektin.	78
Şekil 4.24 : Fonksiyonel gruplara göre monomerler arası mesafe hesaplamaları. LM-pektin için (a) amitli rezidüler, (b) esterli rezidüler, (c) karboksil	

asitli rezidüler. HM-pektin için (d) amitli rezidüler, (e) esterli rezidüler, (f) karboksil asitli rezidüler.	79
Şekil 4.25 : Zincirlerdeki ester ester etkileşimleri RDF analizi	80
Şekil 5.1 : Poligalakturonik asit zincirleri ile farklı divalent katyonların (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , ve Mg^{2+}) birleşme adımlarının şematik gösterimi. R, $[Me_2+]/[GalA]$ molar oranı ve R^* mono kompleks oluşumu ve nokta benzeri çapraz bağlanmadan dimerlerin oluşumu sınır molar oranıdır.	84
Şekil 5.2 : (a) Galakturonik asit monomeri (b) Teofilin molekülü	88
Şekil 5.3 : İlaçsız ve ilaçlı çok katmanlı LM-pektin hidrojel filmler	90
Şekil 5.4 : Çok katmanlı Ca-pektinat hidrojellerinden ilaç salım profilleri	92
Şekil 6.1 : Geometrik olarak minimize edilmiş (a) protonlanmış prokain, (b) çapraz bağlı PGAL modeli.	98
Şekil 6.2 : Çapraz bağlı PGAL zincirlerinin dinamik özellikleri violin grafikleri (a) RMSD, (c) Rg, (e) Rn herbir bağımsız simülasyon için ayrı ayrı gösterilmiştir. D-0 (kırmızı), D-6 (turuncu), D-30 (siyah), D-60 (mavi), D-90 (yeşil) and D-180 (sarı). 3 bağımsız simülasyon gezintileri birleştirilerek (b) RMSD, (d) Rg ve (f) Rn çizilmiştir.	106
Şekil 6.3 : Zincirlerin zamana bağlı RMSD hesaplamaları	106
Şekil 6.4 : Zincirlerin zamana bağlı dönme yarıçapı hesaplamaları	107
Şekil 6.5: Zincirlerin zamana bağlı uçtan uca mesafe hesaplamaları.....	108
Şekil 6.6 : Zincir atomlarının RMSF dağılımları violin grafikleri (a) herbir bağımsız simülasyon için ayrı ayrı ve (b) 3 bağımsız simülasyon gezintileri birleştirilerek çizdirilmiştir.	109
Şekil 6.7 : Zincir atomlarının RMSF değerleri	109
Şekil 6.8 : Modellenen yapıların simülasyon başlangıç ve bitimindeki anlık görüntüleri.....	110
Şekil 6.9 : İlaçsız pektin zincirlerindeki (D-0) Oksijen atomları – halka hidrojenleri etkileşimleri	111
Şekil 6.10 : Ca^{2+} iyonlarının galakturonik asit monomerlerinin karboksilik asit gruplarıyla yaptığı etkileşimler için RDF analizi	111
Şekil 6.11 : Farklı zincirlerdeki birbirlerine bakan en yakın GAL monomerleri arasındaki mesafe dalgalanmaları violin grafikleri. Herbir formülasyon için (a) 3 bağımsız simülasyon ayrı ayrı (b) 3 bağımsız simülasyon gezintileri birleştirilerek çizdirilmiştir.	113
Şekil 6.12 : Farklı zincirlerdeki birbirlerine bakan en yakın GAL monomerleri arasındaki mesafelerin zamana bağlı değişimi. Herbir simülasyon için ayrı ayrı çizdirilmiştir.	114
Şekil 6.13 : Polimer zincirleri ile ilaç molekülleri arasındaki (a) bağlı olmayan enerji, (b) RDF analizi sonuçları.	115
Şekil 6.14 : Modellenen yapıların karakteristik oran hesaplamaları	116
Şekil 6.15 : Polimer zincirlerinin plastikleştirici etkisi ile birbirleri üzerinden kaymaları	117
Şekil 6.16 : Hidrojellerden ilaç salım profilleri	118
Şekil 6.17 : Hidrojellerin SEM görüntüleri; a,b: D-0, c,d:D-30, e,f: D-180.....	119
Şekil 6.18 : D-0, D-30 ve D-180 hidrojellerinin DSC termogramları.....	120
Şekil 6.19 : Hidrojellerin (a) Frekans tarama analizleri, (b) Ca^{2+} salımı (c) farklı kayma hızlarındaki sönümlleme faktör (d) 10 /s kayma hızındaki sönümlleme faktörü analizi grafikleri	122
Şekil 6.20 : Hidrojellerin (a) şişme profili (b) degradasyon hızı hesaplamaları.	125

Şekil 7.1 : Tez çalışmasında tasarlanan yara örtüsünün şematik gösterimi.	130
Şekil 7.2 : Alüminosilikat zeolit A ağ yapısının şematik gösterimi. Ağ yapı LTA-tip yapıya sahiptir. Boyalı daire Si, içi boş daire O ve içinde nokta bulunan daire Al atomunu temsil etmektedir. Alkali katyonlar gösterilmemiştir.	130
Şekil 7.3 : Zeolit A katkılı LM-pektin hidrojellerini hazırlama şeması	132
Şekil 7.4 : Kuru hidrojel filmler	140
Şekil 7.5: Farklı metotlarla hazırlanan hidrojellerin ilaç salım profilleri	141
Şekil 7.6 : Hidrojellerin FT-IR spektrumu	143
Şekil 7.7 : Saf pektin, saf Zn-zeolit, A7.30Zn30 ve A7.50Zn30 hidrojellerinin XRD desenleri	146
Şekil 7.8 : XRD spektra ile belirlenen CaxZny kompleksleri (a) A7.30Zn30, (b) A7.50Zn30	146
Şekil 7.9 : LM-pektin (P), LM-pektin-gliserin (P-Gly) ve LM-pektin-gliserin-NaA zeolit (PZ) çözeltilerinin zeta potansiyel değerleri	148
Şekil 7.10 : Hidrojellerin SEM görüntüleri; (a) saf pektin, (b) pektin hidrojel, (c) ilaç yüklü pektin hidrojel, (d) A7.30ZnO, (e) A7.50ZnO, (f) A7.30Zn30, (g) A7.50Zn30	148
Şekil 7.11 : 30Na0 ve 50Na0 hidrojel filmlerin AFM görüntüleri	150
Şekil 7.12 : Zeolitsiz, 30 ve 50 mg zeolitli pektin filmlerin frekansa bağlı (a) depolama modülü, (b) kayıp modülü ve (c) kompleks viskozite grafikleri.	151
Şekil 7.13 : Hidrojellerden (a) Ca iyonu (b)Zn iyonu salımı	154
Şekil 7.14 : Hidrojellerin ilaç salım profilleri.....	157
Şekil 7.15 : Zn-zeolit ve Na-zeolit filmlerin tasarım parametreleri arasındaki ilişki (a) zeolit konsantrasyonu ile maksimum ilaç salım miktarının değişimi, (b) başlangıç ilaç konsantrasyonu ile maksimumu ilaç salımının değişimi, (c) zeolit konsantrasyonuna bağlı olarak şişme oranının değişimi, (d) şişme oranına bağlı olarak maksimum ilaç salımı ve (e) Zn-zeolitli filmlerin ilaç salımlarının şişme oranına bağlı olarak değişimi.....	160
Şekil 7.16 : İlaç çözeltisi pH değerinin A7.50Na30 hidrojelinden ilaç salımına etkisi	162
Şekil 7.17 : Hidrojellerin su buharı geçirgenliği hızı analizi.....	163
Şekil 7.18 : Hidrojel yara örtüsü filmlerin dispersiyon karakteristikleri (a) kuru A7.30Na0 (b) ıslak A7.30Na0 (c) kuru A7.50Na0 (d) ıslak A7.50Na0	165
Şekil 7.19 : Hidrojellerin hücre canlılığı analizleri.....	166
Şekil 7.20 : A7.30Zn0 ve A7.50Zn0 hidrojellerinin yara iyileşmesi deneyleri temsili fotomikrografikleri. Orijinal büyütme $\times 10$	167
Şekil 8.1 : Serum albümin elektrostatik yüzey (a) pH 6,4; (b) pH 4,7; (c) pH 4,3..	177
Şekil 8.2 : Pektin, pektin-gliserin ve pektin-gliserin-BSA çözeltilerinin UV-taraması.	178
Şekil 8.3 : Çözelti formundaki formülasyonların zeta potansiyel değerleri.....	180
Şekil 8.4 : Hidrojellerin reolojik analizi.....	182
Şekil 8.5: . BSA yüklü hidrojellerin FTIR spektraları	184
Şekil 8.6 : Farklı koşullarda hazırlanmış pektin-zeolit ve BSA yüklü pektin-zeolit hidrojellerinin AFM yüzey topoloji görüntüleri: (a) 30 mg zeolitli NaA-zeolit-pektin (30Na0) (b) 50 mg zeolitli NaA-zeolit-pektin (50Na0) (c) M6.4-100 (d) M6.4-50 (e) A6.4-100 (f) M4.7-100	185

Şekil 8.7 : (a) Farklı koşullarda hazırlanmış hidrojellerin yüzey pürüzlülükleri (b) Yüzey pürüzlülüğü ile BSA konsantrasyonu arasındaki ilişki	186
Şekil 8.8 : BSA yüklü hidrojellerin SEM görüntüleri (a) PZ-A4.7-100; (b) PZ-M6.4-100; (c) PZ-A6.4-100; (d) PZ-M6.4-50; (e) PZ-M6.4-25	187
Şekil 8.9 : BSA yüklü hidrojellerin temas açıları	188
Şekil 8.10 : Farklı başlangıç konsantrasyonu ve pH değerlerinde, NaA-zeolit yüzeyine BSA adsorpsiyon grafikleri.....	189
Şekil 8.11 : Pektin zincirleri ile BSA molekülleri etkileşiminin şematik gösterimi	191
Şekil 8.12 : Hidrojellerin şişme oranları (a) pektin zeolit hidrojellerin adsorbsiyon çözeltileri ve tampon çözelti içinde (b) BSA yüklü pektin-zeolit hidrojellerin pH 6,4 tampon çözelti içindeki şişme oranları.....	192
Şekil 8.13 : Pektin-zeolit hidrojellerinden BSA salımı	194
Şekil 8.14 : PZ-A6.4-50 ve PZ-A4.7-50 hidrojellerinden BSA salım profili.....	195
Şekil 8.15 : Saf BSA ve hidrojellerden salınan BSA'nın CD-UV spektraları; (a) PZ-M8.2-100; (b) PZ-M6.4-100;(c) PZ-M6.4-100; (d) PZ-A6.4-100; (e) Saf BSA.....	196
Şekil 8.16 : A6.4-100 ve M6.4-100 filmleri için <i>in vitro</i> yara iyileşmesi analizleri	197
Şekil A1 : pH 6,4 ortamı teofilin molekülü kalibrasyon eğrisi (düşük konsantrasyon).	246
Şekil A2 : pH 6,4 ortamı teofilin molekülü kalibrasyon eğrisi (yüksek konsantrasyon).	246
Şekil A.3 : pH 6,4 ortamı prokain molekülü yüksek absorbans değerleri için kalibrasyon eğrisi.	247
Şekil A4 : pH 6,4 ortamı prokain molekülü düşük absorbans değerleri için kalibrasyon eğrisi.	247
Şekil A5 : pH 6,4 ortamı BSA molekülü kalibrasyon eğrisi.....	248
Şekil A6 : pH 4,7 ortamı BSA molekülü kalibrasyon eğrisi.....	248
Şekil A7 : pH 4,3 ortamı BSA molekülü kalibrasyon eğrisi.....	249



KONTROLLÜ AKTİF MOLEKÜL SALIMI YAPAN PEKTİN TEMELLİ HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Yara tedavisi, bir dizi hücrel ve biyokimyasal olayların, dokuyu tamir etme ve yenileme amacıyla, iç içe geçmiş ve düzenli bir sırada gerçekleştiği bir prosestir. Günümüzde, diyabet hastalığı gibi çeşitli hastalıkların neden olduğu kronik yaralar, hızla yaşlanan nüfus, trafik kazaları ve cerrahi prosedürlerin artışı ile daha etkili yara örtülerine olan gereksinim artmaktadır. Gelişmiş bir yara örtüsü, mükemmel biyoyumluluk ile beraber bakterilere karşı bir koruma sağlamalı, fazla eksudayı absorbe edebilmeli, uygun su buharı ve oksijen geçirgenliği oranı ile de iyileşmeyi hızlandırmalıdır. Ayrıca, hasta ve hasta yakınları için konforlu bir kullanıma sahip olması, mekanik dayanıklılık, uzun raf ömrü, uygun maliyet ve biyobozunurluk da bir yara örtüsü malzemesinde aranan önemli özelliklerdendir. Ancak, çoğu mevcut yara örtüleri bu özelliklerden çok azını bir arada içermektedir. Bu nedenle, tüm aranan özellikleri bir arada barındıran, düşük maliyetli, gelişmiş yara örtülerine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu motivasyonla, bu tez çalışmasında *in silico* ve *in vitro* yöntemlerin beraber kullanıldığı bir yaklaşımla, yara örtüsü olarak kullanılmak üzere antimikrobiyal, kontrollü ilaç/protein salım sistemleri geliştirilmiştir. Yara örtüsünün ana matrisi olarak pektin seçilmiştir. Hidrofilik pektin fazla yara sıvısını absorplayabilir. Gözenekli hidrojel yapısı ile pektin kontrollü ilaç salımı yapabilir. Pektin zincirlerinin üzerindeki fonksiyonel gruplar aracılığıyla oluşan asidik ortam ise bakterilere ve virüslere karşı bir bariyer görevi görebilir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar bölümler halinde sunulmuştur. Öncelikle yara örtüleri için literatürde rapor edilen çalışmalar ve pektinin yara örtüsü olarak kullanımı tartışılmıştır. Bunu, moleküler modelleme ve moleküler dinamik (MD) simülasyonları hakkında kapsamlı bir bölüm takip etmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar ise beş ayrı bölümde tartışılmıştır. İlk bölümde, tüm-atom MD simülasyonları kullanılmıştır. Temel olarak galakturonik asit monomerleri içeren pektin zincirleri kimyasal özellikleri farklı karboksil, ester ve amitli grupları barındırmaktadır. Çalışmada, yüksek metoksili ve düşük metoksili olarak 21 monomerli pektin oligomerleri modellenmiştir. Ca^{2+} iyonlarıyla çapraz bağlanmış zincirlerin düşük enerji seviyelerinde konfigürasyonları taranmış, düşük metoksili pektin zincirlerinin çapraz bağlı yapılarını daha fazla korudukları tespit edilmiştir. Tezin devamında kontrollü ilaç salım sistemlerinde düşük metoksili pektinin kullanılmasına karar verilmiştir.

Çalışmaların ikinci bölümünde, düşük metoksili pektinden sentezlenen hidrojel, farklı Ca^{2+} iyonu ve ilaç yükleme konsantrasyonlarında, ve farklı sayıda hidrojel katmanlarda çalışılmıştır. Sentezlenen hidrojel karakterize edilmiş ve istenilen ilaç salım hızının katman sayısı ve film kalınlığı ile kontrol edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Tezin simülasyon odaklı üçüncü çalışmasında ise, pektin hidrojellerinin yüklenen ilacı kontrollü salabileceği ilaç konsantrasyonu aralığının belirlenmesi için hesaplamalı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, Ca^{2+} ile çapraz bağlı 21 monomer uzunluğundaki α -D-galakturonik asit oligomerleri, artan prokain konsantrasyonlarında (6, 30, 60, 90 180 mg ilaç.g⁻¹ film), her sistem için üçer bağımsız 200 ns uzunluğunda tüm-atom MD simülasyonları ile incelenmiştir. Sonuçlara göre 30 mg.g⁻¹ prokain yüklemenin çapraz bağlamayı bozmayacağı, bu konsantrasyonun hidrojeli düşük seviyede degradasyona uğratacağı ve kontrollü salım yapabileceği ön görülmüştür. MD çalışmalarında kullanılan konsantrasyonlarda prokain yüklü pektin hidrojel sentezlenmiş, karakterize edilmiş, analizler ile prokain salımı ve hidrojel degradasyonunun simülasyonlarla tahmin edilebileceği ortaya konmuştur. Bu hesaplamalı yaklaşım kontrollü salım için kullanılacak benzer esnek sistemlerin tasarımı da kullanılabilir.

Tezdeki diğer bir çalışmada, pektin hidrojin mekanik özelliklerini arttırmak için kafes yapılı alimünasilikat zeolit-A kullanılmıştır. Bu katkı ile kontrollü ilaç salımı yapabilen, modern yara örtüsü için gerekli özellikleri taşıyan, uygun maliyetli özgün bir yara örtüsü geliştirilmiştir. Membrana difüzyon ve matrise difüzyon olmak üzere iki farklı hidrojel hazırlama metodu ile hazırlanan hidrojellerde farklı çapraz bağlayıcı, zeolit ve teofilin ilacı konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Pektin-zeolit etkileşimlerini kontrol etmek amacıyla iki farklı iyonik formatta (Na^+ ve Zn^{2+}) zeolit-A kullanılmıştır. Membrana difüzyon yöntemi ile hazırlanan hidrojellerin teofilini kontrollü bir şekilde salabildiği, zeolit-A partiküllerinin teofilin deposu olarak davranırken hidrojel stabilitesini ve oksijen geçirgenlik hızını arttırdığı tayin edilmiştir. Pektin-zeolit hidrojellerin ilaç salımına etki eden en önemli parametrelerin şişme oranı ve iyon konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir.

Tezin son bölümünde ise hem yüksek kanamalı ve yanık yaralarında önemli bir problem olan, hem de kalp krizi, kanser ve COVID-19 nedeniyle gelişebilen serum albümin eksikliği yaşayan hastaların cerrahi operasyonlarında kullanmak amacıyla serum albümin yüklü pektin-zeolit hidrojel geliştirilmiştir. pH 6,4 ortamında hazırlanan 100 mg.g⁻¹ film albümin yüklü hidrojin, yapısında immobilize olmuş albümini kontrollü bir şekilde protein yapısını bozmadan dış ortama salabildiği belirlenmiştir. WST-1 yöntemi ile dermal fibroblast hücrelerine karşı gerçekleştirilen hücre canlılığı analizlerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında hazırlanan hidrojellerin hücre sayısını düşürmediğini, *in vitro* yara iyileşmesi analizlerinde ise hücrelerin göçüne etki etmediği, fibroblast hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermediği belirlenmiştir. *E.coli* ve *S.aureus*'a karşı yapılan antibakteriyel analiz testlerinde ise hidrojellerin antibakteriyel özellikleri gösterilmiştir.

Bu tez kapsamında, atık ürün veya yan ürün olarak değerlendirilen pektini kullanarak geliştirilen antibakteriyel, aktif ajan yüklü yara örtüleri ile kişiye özel tasarım (istendiğinde kontrollü veya hızlı salım, ilaç/protein salımı, istenilen ebatta esnek yara örtüsü) yapılabileceği belirlenmiştir. Katma değeri yüksek olan bu ürünün ithal yara örtülerine olan bağımlılığı azaltacağı ve ülke ekonomisine katkıda bulunacak olması ise tezin bir diğer önemli çıktısıdır.

DEVELOPING PEKTIN-BASED HYDROGELS WITH CONTROLLED DELIVERY OF ACTIVE MOLECULES

SUMMARY

Wound healing is a dynamic, ordered sequential phenomena that requires numerous chemical, cellular and biochemical processes to perform tissue repair and regeneration. Today, increasing prevalence of chronic injuries such as pressure ulcers, diabetic ulcers, other slow-healing injuries, incidence of accidents such as road accidents, burns, and traumas across the globe, growth of the aged population, and increasing number of surgical procedures highly necessitate advanced wound care products. An ideal advanced wound dressing should exhibit numerous characteristics; these are excellent biocompatibility and non-toxicity, stopping bleeding, relieving local pain, keeping the wound moist enough while absorbing the excess exudate, having optimum water vapor and oxygen permeability, protecting the wound from microorganisms and infections. It should be also easily implemented to the wounded area, become less adhesive before peeling to maintain patient comfort and prevent a second injury. An ideal wound dressing should also have mechanical durability, long shelf life and be cost effective. However, most of the advanced wound dressings available in the market have few of these properties. For this reason, there is a high demand for low-cost, advanced dressings that assemble most of the desired features. The aim of this thesis is thus designing new antimicrobial drug/protein loaded wound dressing materials combining *in silico* and *in vitro* methods.

The main polymeric matrix of the wound dressing is selected as pectin for numerous reasons. Pectin is a non-toxic, natural heterogeneous polysaccharide extracted mostly from citrus peels or apple pomaces. It is a by- or waste product of fruit juice industry, making pectin easily available and cheap. It is mainly composed of linear chains of galacturonic acid monomers accommodating –COOH groups, enabling a unique gel formation in the presence of divalent cations leading to the “egg-box model”. This unique hydrogel structure makes pectin an ideal carrier for delivering bio/active agents. Pectin imparts many advantages for wound dressings such as binding bioactive molecules, retaining an acidic environment, which may act as barrier against bacteria, having anti-inflammatory and anti-microbial properties. It has dual-responsiveness to pH, which corresponds to wounded tissue pH. Highly hydrophilic pectin chains can also absorb the excess exudate, therefore controlling the moisture of the wound environment.

Studies conducted within the scope of this thesis are discussed in five separate chapters. In the first chapter, conformational differences that can occur during the gelation of high-methoxyl (HM) and low-methoxyl (LM) pectin chains are

investigated at molecular level using all-atom molecular dynamics (MD) simulations in explicit water. Pektin chains mainly contain galacturonic acid monomers accommodating carboxyl, ester and amide groups. Pektin oligomers of 21 monomers are modeled as HM and LM according to the natural ratios of these functional groups. The conformational rearrangements of the oligomers cross-linked with Ca^{2+} ions are revealed at low energy configurations. LM-pektin chains are noted to maintain their cross-linked structure more when compared to the HM chains, suggesting a more suitable hydrogel for controlled delivery. Consequently, in the remaining of the thesis, LM-pektin is used.

In the second chapter, hydrogels are synthesized from LM-pektin at different Ca^{2+} concentrations, with different numbers of hydrogel layers and with different drug (theophylline) loading methods. The synthesized hydrogels are characterized, and the most effective drug loading method for drug release is determined. The analyses show that the desired drug release rate can be controlled by the number of layers and film thickness. In the third chapter of the thesis, a total of 3.6 μs long MD simulations in explicit water are employed to predict the optimum drug concentration in pektin-based hydrogels that maintain controlled drug release and delayed hydrogel degradation. The dynamics of the 21 monomer long polygalacturonic acid chains cross-linked with Ca^{2+} ions is studied at different drug (procaine) concentrations (6, 30, 60, 90, 180 mg/g hydrogel) and compared with the dynamics of the chains without drug. Global motions and local motions of the chains are analyzed. Especially, the deviations of the cross-links from their initial contacts reveal the optimum procaine concentration as 30 mg/g hydrogel to maintain the hydrogel network intact. To assess computational results, LM pektin hydrogels are synthesized, characterized and procaine release experiments are performed. Results from MD simulations and drug release agree that 30 mg/g procaine loading do not disturb the cross-links, therefore leads to low degradation and controlled release from the hydrogel. On the other hand, 90 mg/g-hydrogel loading leads to increased chain fluctuations causing burst procaine release. In addition, procaine molecules are determined to behave as plasticizer promoting polymer flexibility.

Next, LM-pektin hydrogels are synthesized with the addition of alumina silicate zeolite-A particles to improve the mechanical properties of the hydrogel. Hydrogel films are prepared based on diffusion into membrane or diffusion into matrix preparation methods with different concentrations of cross-linker, zeolite and drug theophylline. To enlighten the pektin-zeolite interactions, zeolite particles are prepared in two different ionic forms, Na^+ and Zn^{2+} . Hydrogels prepared with diffusion into membrane system release theophylline in a controlled manner. In the system, zeolite-A particles also adsorb theophylline, which improves controlled release while enhancing the hydrogel stability and increasing the oxygen permeation rate. Analyses show that swelling of the hydrogel and ion dynamics in the medium dominate the drug release behaviors. As a result, a novel and cost effective wound dressing material is developed with critical features required in a modern wound dressing,

In the last part of the thesis, bovine serum albumin-loaded LM-pektin – zeolite-A hydrogels are developed to be used in high-bleeding and burn wounds, as well as in surgical operations of patients with albumin deficiency due to heart attack, cancer or COVID-19. Hydrogel samples with 100 mg g^{-1} film albumin that are immobilized at pH 6.4, display controlled albumin release while preserving secondary and plausibly tertiary structure of albumin.

LM-pektin and LM-pektin – NaA-zeolite hydrogels outperform a similar advanced wound care product, with desirable oxygen permeability, water (moist) permeability, swelling, and absorbing excess exudate. Cell viability analysis performed by WST-1 method reveals that LM-pektin and LM-pektin – NaA-zeolite hydrogels have no cytotoxicity when compared to the control group. *In vitro* wound healing assays show that all hydrogels have no toxic effects on the fibroblast cells and promote migration of the cells. These hydrogels have antibacterial properties as demonstrated with antibacterial analysis tests against *E.coli* and *S.aureus*.

With the wound dressing including pektin and zeolite-A developed during this thesis, two important outcomes can be achieved. First, an effective wound treatment can be provided with tailor made (controlled or rapid release according to the treatment of the disease, drug / protein release, flexible wound dressing in desired size), antibacterial, active agent loaded pektin-based wound dressings. Second, a high added value product can be produced from pektin, which is evaluated as a waste by-product.





1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünya çapında artan kronik hastalıklar ve diyabet, hızla yaşlanan nüfus, cerrahi prosedürler ve trafik kazalarındaki artış nedeniyle deri yaralanmalarının sayısı gittikçe artmaktadır. Akut ve kronik yaralar, hastalarda ciddi fiziksel travmalara neden olmakta ve büyük bir sosyo-ekonomik yük getirmektedir. Bu durum gelişmiş yara örtülerine olan ihtiyacı hızla arttırmaktadır. Bununla beraber, deri hastalıklarında karşılaşılabilecek çözülmesi en zor problemlerden biri kronik enflamatuvar deri hastalıklarının tedavisidir. Egzama ve sedef gibi kronik enflamasyonlu deri hastalıkları ise Türkiye ve Dünya nüfusunun %1-2'sinde görülen, hastaların yaşam konforunu olumsuz yönde etkileyen, kesin tedavisi olmayan bir immün hastalık grubudur. Bu hastalıkların kontrol altına alınmasında topikal, fototerapi ve ağız yoluyla tedavi yöntemleri kullanılmaktadır.

Topikal tedavinin hastalar tarafından bilinçsiz uygulanması ve ilaç dozaj aşımı sonucunda, kemik erimesine varan doku kaybı gibi yan etkilerin bulunması, bu hastalıkların tedavisinde kontrollü ilaç salımının önemini arttırmıştır. İlaç moleküllerinin biyoaktivitesini arttırarak hızlı ya da yavaş salım veya kontrollü salım, hedefli salım gibi metotları geliştirmek, günümüz tedavilerinin önemli hedeflerindendir. Bu nedenle biyopolimerik ilaç salım cihazları, biyoaktif ajanların salımını istenilen bölgeye, istenilen hızda gerçekleştirmek üzere tasarlanmaya çalışılmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin ilaç bozunmasını ve kaybını minimize etmek, ilaç biyoyumluluğunu arttırmak, hedeflenen ilaç konsantrasyonunu olabildiğince uzun süre tutmak ve en önemlisi sağlıklı dokunun toksik etkilerden etkilenmesini engellemek gibi önemli fonksiyonları bulunmaktadır.

Bu motivasyonla bu tez çalışmasında *in silico* ve *in vitro* yöntemlerin beraber kullanıldığı bir yaklaşımla kontrollü ilaç salımı yapabilen bir hidrojel geliştirilmiştir. İlaç taşıyıcı sistem olarak, insan vücudundaki hücreler arası matrisin (*extracellular matrix*, ECM) ana komponentlerine olan yapısal benzerliğinden dolayı anyonik bir polisakkarit olan pektin polimeri seçilmiştir. Sistemin özellikle mekanik özelliklerini iyileştirmek amacıyla biyoyumlu zeolit-A eklenmiştir. Zeolit partikülleri mekanik

özellikleri arttırmasının yanısıra, hücrelere oksijen taşınımını arttırması [1, 2], trombositleri aktive ederek kanamayı durdurmaya yardımcı olması, hücrel ve büyük protein bileşenlerinin konsantrasyonunu arttırması gibi özelliklerinden dolayı yara iyileşmesine aktif olarak etki etmektedir [3].

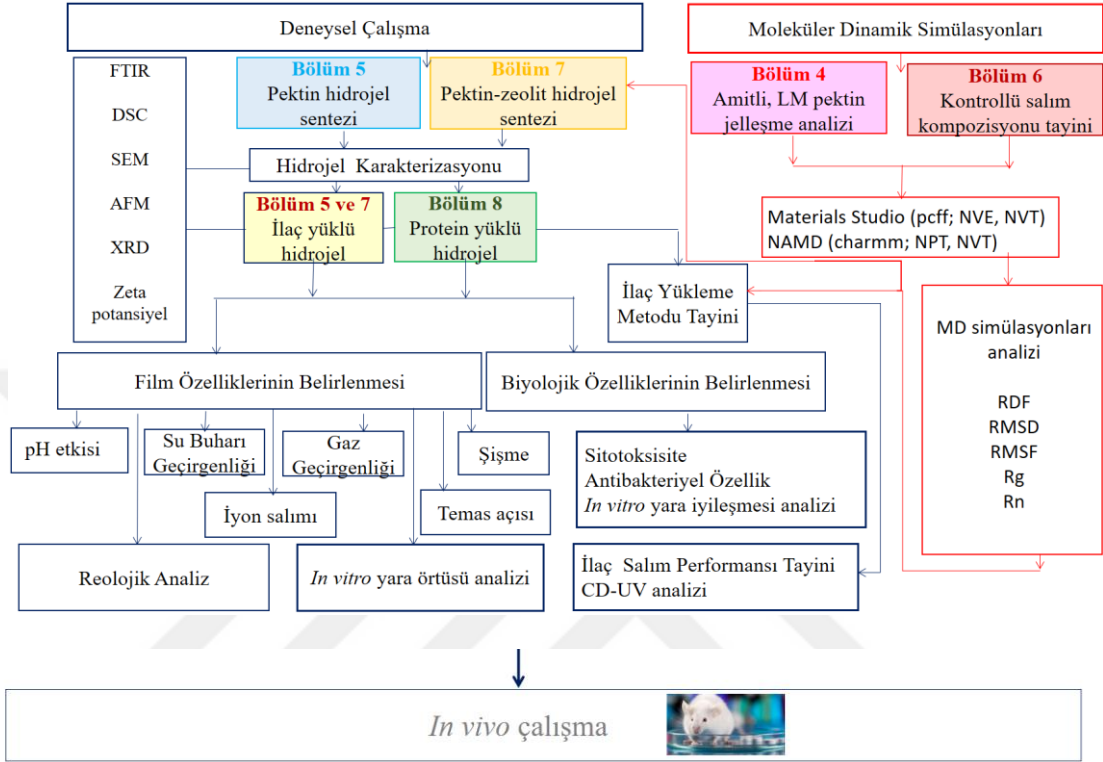
Deneyisel çalışmalardan evvel, ilaç salım sisteminin performansını geliştirebilmek için tüm-atom moleküler dinamik simülasyonları kullanılarak öncelikle moleküler seviyede gerçekleşen pektin-çapraz bağlayıcı etkileşimleri açıklığa kavuşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, düşük metoksi ve yüksek metoksi pektin zincirleri modellenmiş ve düşük enerji seviyesindeki zincir-çapraz bağlayıcı etkileşimleri detaylıca incelenmiştir (**Bkz. Bölüm 4**). Topikal uygulamalar için yara örtüsü formundaki ilaç yüklü antimikrobiyal pektin temelli hidrojellerin tasarım parametreleri tayin edildikten sonra karakterize edilmiş ve *in vitro* yara örtüsü ile kontrollü ilaç salım performansları belirlenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları **Bölüm 5**'te detaylandırılmıştır.

Bunun yanında hidrojellerin yüklenen ilacı kontrollü salabileceği ve ayrıca zincirlerin degradasyona uğrayıp, ilaç salımının kontrollü salım profilinden sapacağı ilaç konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla detayları **Bölüm 6**'da açıklanan bir dizi moleküler dinamik simülasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiş ve ilaç konsantrasyonunun pektin zincirlerini dekompoze etme mekanizması incelenmiştir. Bu amaçla modellenen pektin hidrojel/prokain sistemleri için hesaplamalı bir metodoloji geliştirilmiştir. Bu geliştirilen metodolojinin aynı zamanda çeşitli geleneksel veya yeni ilaç taşıyıcı esnek yapılı polimer sistemlere de uygulanabileceği düşünülmektedir.

Pektin hidrojellerinin mekanik özelliklerini artırmak amacıyla Na^+ veya Zn^{2+} yüklü zeolit-A kullanılmıştır. Sentezlenen hidrojeller karakterize edilmiş ve daha sonra *in vitro* testler ile yara örtüsü olarak kullanımının uygun olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın tüm detayları **Bölüm 7**'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Son olarak, özellikle aşırı ekzudalı yaralar, yanık yaraları ve hipoalbuminemi hastalarının cerrahi operasyonlarında kullanılma potansiyeline sahip olan albümin yüklü hidrojeller geliştirilmiştir. Bu çalışmanın aynı zamanda protein-karbonhidrat etkileşimlerine de iyi bir model olacağı düşünülmektedir. Bu çalışma ise **Bölüm 8**'de sunulmuştur.

Bu tez kronik enflamasyonlu deri hastalıklarının tedavisinde kullanılacak ilaç yüklü hidrojellerin tasarımına odaklanan özgün bir çalışmadır. İlaç ve protein yüklü hidrojellere tez boyunca yapılan analiz ve uygulamalar Şekil 1.1’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.1 : Tez sırasında izlenen yol haritası ve gerçekleştirilen çalışmalar.

Gelişmiş yara bakım ürünleri akut vakalarda da büyük ölçüde pansuman yapmak ve kazadan kaynaklanan yaralanmaların hızlı iyileşmesi için kullanılmaktadır. Özellikle diyabet gibi kronik hastalıkların ve yaşlı nüfusun artışının bu segmentin artışıdaki payı büyüktür. Çok yüksek maliyeti olan gelişmiş yara bakım örtülerinde, ülkemiz açısından bakıldığında ise artan dövize bağımlılık durumu, maliyetin artarak yükselmesine neden olmaktadır. Atık veya bir yan ürün olan pektin kullanılarak geliştirilen bu yara örtüsü aynı zamanda ülkemizin değerlendirilemeyen doğal kaynaklarından biri olan pektinin yüksek katma değerli ürünlerin hazırlanmasında kullanılacak olması, tezin bir diğer önemli çıktısı olacaktır.

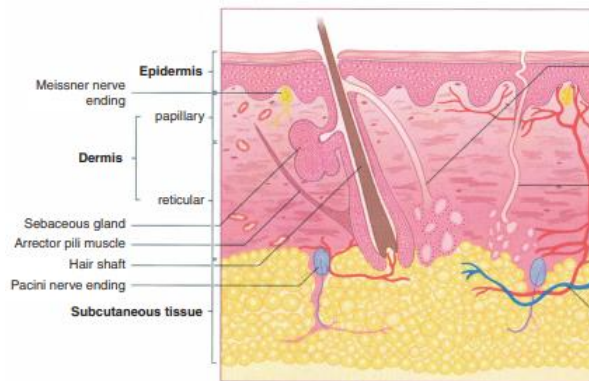


2. LİTERATÜR ÖZETİ

Gelişmiş bir yara örtüsü ürünü tasarlayabilmek için sağlıklı bir derinin kompozisyonu ve yara iyileşmesinin evreleri hakkında genel bir bilgi sahibi olmak, yara tedavisini anlamaya yardımcı olması bakımından önemlidir. Bu amaçla bu bölümde deri yapısı hakkında çok kısa bir bilgi verildikten sonra, yara çeşitleri, yara iyileşme fazları ve yara iyileşmesine etki eden çeşitli faktörler ile ilgili bilgi verilmiştir. Yara tedavisinin tarihsel gelişimi hakkında bilgi verilmesinin ardından ise modern bir yara örtüsünde bulunması gereken özellikler, mevcut yara örtüsü çeşitleri ve pektin polimeri hakkında geniş bir literatür özeti verilmiştir.

2.1 Deri

Hücreler arası organizasyonel bir ortam oluşturan organa ‘doku’ adı verilmektedir. Deri ise, insan vücudundaki en büyük organdır ve hayatın sürekliliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Doğumdan itibaren tüm yaşam boyunca sıvıyı dengelemek, enfeksiyon kontrolü ve termojenesis gibi hayati görevleri üstlenmektedir [4, 5]. Sağlıklı deri esas olarak epidermis, dermis ve deri altı tabakalarından oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 : Deri tabakaları [6].

Epidermis, en dıştaki bariyer tabakadır. Yüksek sızdırmazlığı sayesinde sadece su kaybını önlemez, aynı zamanda alt tabakaları zararlı dış etkenlerden de korumaktadır. Dermis tabakası fibroblast, elastin, glikozaminoglikan içeren ekstra hücresel

matriksden (ECM- *extracellular matrix*) oluşmaktadır. Derinin esnekliğini sağlayıp cilde fiziksel destek verirken aynı zamanda vasküler sistem, sinir yolları ve lenfatik sisteme de destek olmaktadır. Çok damarlı olan deri altı tabakası adipos doku bakımından zengindir. Bu nedenle deri sıcaklığı ve mekanik özelliklerin düzenlemesine yardımcı olmaktadır. Normal bir cilt, yağlı ve patojenlerin büyümesini engellemek için hafifçe asidiktir [7].

2.2 Yara

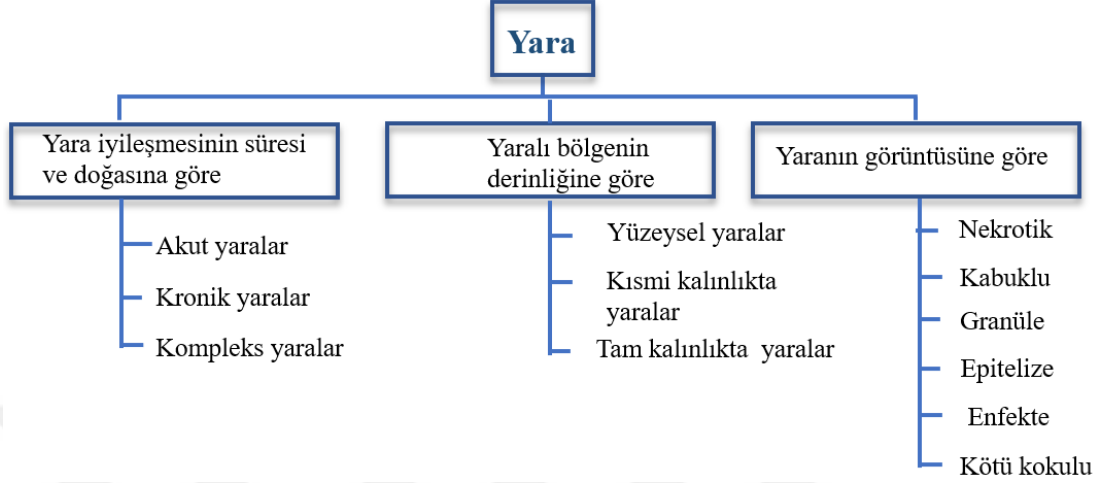
Yara, deri bütünlüğünün çeşitli sebeplerle bozularak, canlı dokunun yapısal ve fonksiyonel işlevini sürdürememesidir [8]. Fiziksel, termal, kimyasal bir etki veya fizyolojik ve medikal koşullar sonucu oluşan defektler olarak da açıklanabilir [9]. Wound Healing Society’ye göre de yara, herhangi bir dış etken sonucu normal anatomik dokunun yapısının ve fonksiyonlarının bozulmasıdır.

Yara iyileşmesi, bir dizi hücrel ve biyokimyasal olayların, dokuyu tamir etme ve yenileme amacıyla, iç içe geçmiş ve düzenli bir sırada gerçekleştirdiği bir prosestir [10]. Yara onarım süreci neredeyse vücuttaki tüm farklı dokularda benzer bir şekilde işlemektedir. Bu nedenle miyokard enfaktüsü (kalp krizi), bir omurilik yaralanması ya da yanık yaralanmalarında vücudun izlediği kendini tamir amaçlı sekanslar, etkilenen organların farklılığına rağmen önemli ölçüde benzerlik göstermektedir [11]. Yaralanma ile beraber hücrel, biyokimyasal prosesler ve enzimatik reaksiyonlar devreye girerek iyileşmeye yardımcı olurlar. Bununla beraber, enfekte olmuş cerrahi yaralar, travma veya yanık gibi fiziksel nedenlerden veya diyabet, basınç ve enfekte kronik yaralar gibi çeşitli fizyolojik bozukluklardan dolayı oluşan bazı yaralarda iyileşmede önemli gecikmeler görülmektedir. İyileşmesi çok zor olan bu kronik yaraların tedavisi yıllar almakta ve yara, enflamatuvar fazda kalarak bir sonraki faza geçememektedir [12].

2.2.1 Yaraların sınıflandırılması

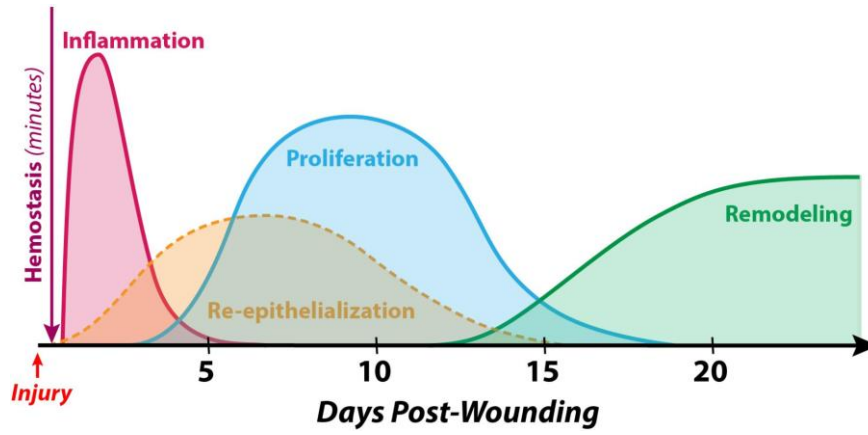
Yaralar çok farklı şekilde kategorize edilebilmektedir. Şekil 2.2’de yara sınıflandırmasına genel bir bakış verilmiştir. En genel şekliyle, (i) süre ve yara iyileşmesinin doğası, (ii) yaralanmanın derinliği ve yaranın görüntüsü olarak iki ana sınıfta incelenebilir. Onarım prosesine göre ise (i) akut yaralar, (ii) kronik yaralar, (iii) yanıklar, (iv) kimyasal yaralanmalar ve (v) mekanik yaralanmalar olarak sınıflandırılabilirler. Yaralar, aynı zamanda etkilenen doku alanı ve tabakasına göre de sınıflandırılabilirler. Sadece epidermis denilen, vücudun dış yüzeyini koruyan

damarsız dokuda meydana gelen yaralanmalara ‘yüzeysel yaralanmalar’ adı verilmektedir. Hem epidermisde hem de kıl foliküllerini de içeren daha alt tabakalardaki yaralanmalara ‘kısmi kalınlıkta yaralanmalar’, deri altı yağları veya daha derindeki dokulara da zarar veren yaralara ‘tam kalınlıkta’ (full thickness) yaralar denilmektedir[10].

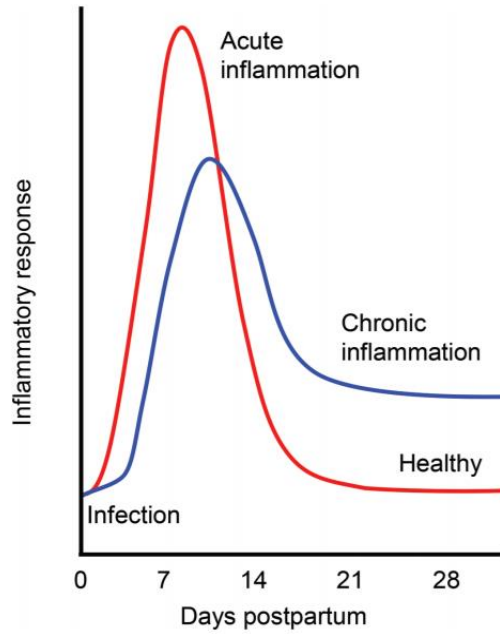


Şekil 2.2 : Yaraların sınıflandırılması [10].

Akut yaralar, deri yaralanması veya cerrahi bir operasyondan sonra oluşan, genellikle yaranın derinliği ve büyüklüğüne göre 8-12 hafta içinde, çok az yara izi ile tamamen iyileşebilen doku yaralanmalarıdır [13, 14] (Şekil 2.3). Klinik olarak kronik yaralar ise 12 hafta içinde işlevsel bütünlüğünü kendiliğinden eski haline getiremeyen ve iyileşme eğilimi göstermeyen yaralar olarak tanımlanmaktadır [15]. Şekil 2.4’te ise kronik yara aşamaları görülmektedir. Kronik yaralar büyük çoğunlukla enflamasyon fazını aşmamaktadır. Böyle yaralar genelde, diyabet, kanser, uzun süreli enfeksiyon, albümin eksikliği gibi bir fizyolojik nedenden kaynaklanmaktadır. Bu fizyolojik problemler, düzenli bir süreci izleyen yara tedavi proseslerinde bozulma veya yavaşlamaya neden olmaktadır [13].



Şekil 2.3 : Yara iyileşme aşamalarının günlere göre gösterimi [16].



Şekil 2.4 : Akut ve kronik yara süreci [17].

Büyük çoğunluğu ağrılı olan kronik yaralar ortaya çıktığı lokasyon ve şiddetine bağlı olarak hastanın özel ve sosyal hayatını olumsuz etkiler [18]. Hastalığın sebep olduğu fiziksel deformasyon sonucunda hastada psikolojik sorunlar oluşabilir. Bu durumda hasta kendisini çevresinden ve toplumdan izole eder ve sonunda kendisine olan saygıyı yitirebilir. Kronik yaralar, yaşam kalitesini ve fonksiyonlarını bozarak organ kesilmesine hatta ölüme yol açabilir. Hastanın uzun süreli olarak hastanede kalmasına ve belirsizliğe de neden olmaktadır [19]. Günümüz tıp dünyası, aynı zamanda enfeksiyona çok açık olan kronik yaraların tedavisine büyük önem vermekte ve bu konuda çok sayıda araştırma yapılmaktadır [20].

Yanıklar, çok sık rastlanan ve en yüksek tedavi gideri olan, uzun süreli veya kalıcı ağır fiziksel, fizyolojik ve sosyal sonuçları olan enflamatuvarlı bir yara çeşitidir [21]. Tedavide genellikle, yanık yarası serum fizyolojik ile kapandıktan sonra, bir yara örtüsü ile kapatılır ya da yanık pomadı kullanılarak her gün değiştirilip kapalı pansuman yapılır. Yanıkları enfeksiyona karşı korumak tedavinin en önemli kriteridir. Yanık yaralanmalarında kan kaybı ve cerrahi stresin birleşimi sonucu önemli oranda albümin tükenmesi yaşanmaktadır [22]. Bu durum postoperatif komplikasyon riskini üç kata kadar arttırmaktadır.

Diyabetes mellitus (şeker hastalığı) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın bir şekilde görülen bir sağlık sorunudur [20]. Diyabetik ayak ülserleri global nüfusun yaklaşık % 6.3'ünde görülebilen önemli bir kronik komplikasyondur [23]. Türkiye'de 2013 yılı verilerine göre yaklaşık 7 milyon diyabet hastası bulunduğu dikkate alındığında, bu hastaları bekleyen en büyük sorun olan diyabetik ayak yaralarının önemi daha da ortaya çıkmaktadır [24]. Diyabet prevalansı arttıkça diyabetik ayak ülserlerinin sıklığı artmaktadır. Dolaşım bozukluğu ve iyileşmeyen yaralara neden olmakla birlikte, hayat kalitesinin bozulmasına, yüksek tedavi maliyetlerine ve hatta morbidite artışına yol açmaktadır. Progresif doku kaybının yanı sıra yumuşak doku kaybı, kemik enfeksiyonu ve vakaların yaklaşık % 20'si de hızlandırılmış kardiyovasküler hastalık ile ilişkili olabilmekte, amputasyonlarına neden olmaktadır [25]. Sağlıklı bir bireyin yaşam boyunca diyabetik ayak ülseri gelişme riski %25 iken, diyabetik ayaklı hastalar %50 oranında enfeksiyon ve %20 oranında amputasyon riski taşımaktadırlar [26]. Dünyada şeker hastalığına bağlı olarak her 20 saniyede bir hasta ayağını kaybetmekte, ülkemizde ise yaklaşık olarak 300 bin civarında diyabetik ayaklı şeker hastası bulunmakta ve her yıl bu hastaların 20-30 bini uzuvlarını kaybetmektedir.

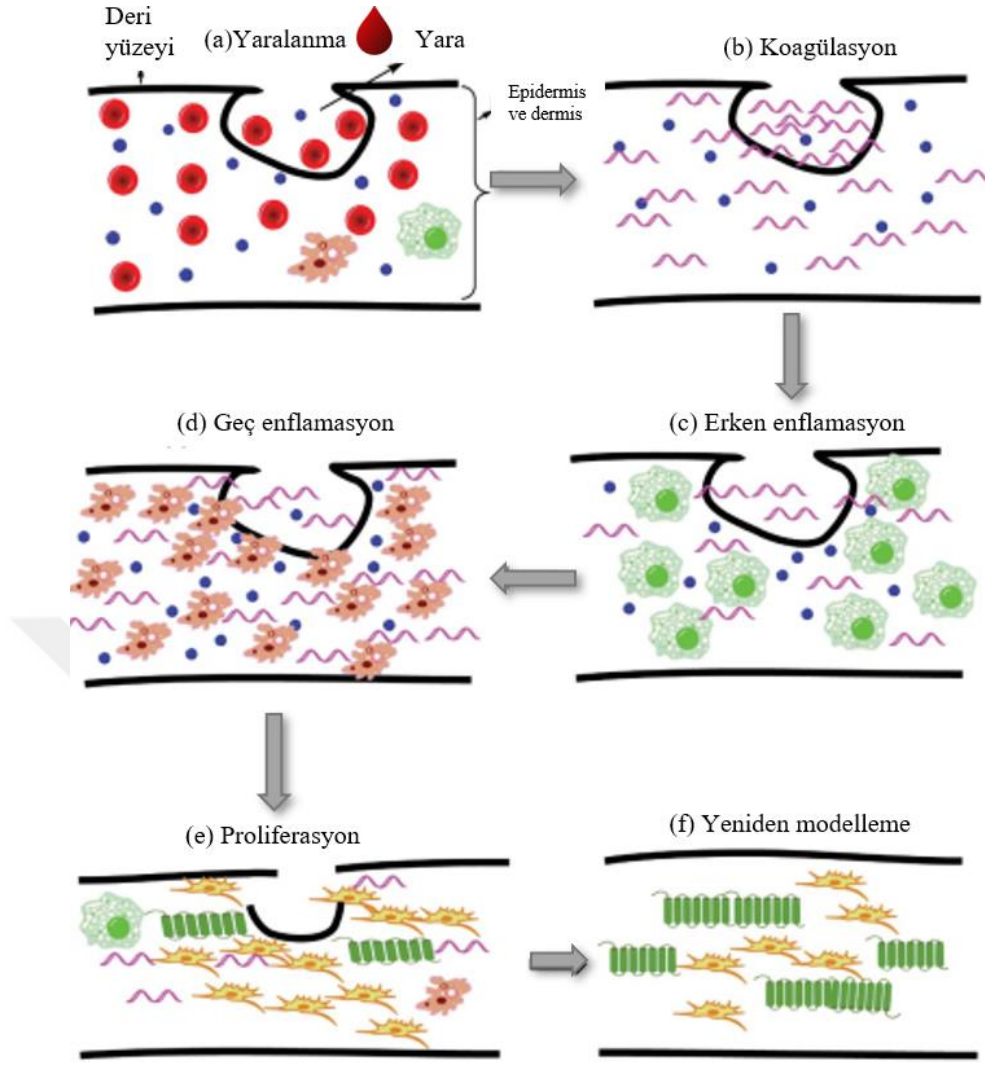
Bu yaraların tedavisinde kollajen, büyüme faktörleri, hiperbarik oksijen tedavisi gibi tedavi seçenekleri uygulanmaktadır. Fakat yüksek maliyetli olan bu tedavi yöntemleri halen rutin tedavi protokollerine girmemiştir [27]. Antibiyotik tedavisi enfeksiyon için temel olmakla birlikte yara bakımında da çok önemlidir [28].

2.2.2 Yara iyileşmesinin fazları

Yara iyileşmesi, vücuttaki farklı dokularda benzer biyolojik ve kimyasal prensipleri takip etmektedir [29]. Normal (akut) yara iyileşmesi, kan hücrelerinin, proteinlerin, proteazların, büyüme faktörleri ve hücre dışı matris bileşenlerinin koordineli etkileşimi ile ilgili bir dizi dinamik olayı içermektedir [5]. Bu tarz yaralarda vücut, doku tabakasına düzenli bir şekilde gerçekleşen aralıksız restorasyon prosesi sonucunda, eski bütünlüğünü ve fonksiyonunu kazandırmaktadır. Yara tedavisi, büyük bir disiplinle düzenli bir sırada ilerleyen, birbiri ile bağlantılı ve iç içe geçmiş farklı fazlardan oluşmaktadır ve birbiri ile etkileşen hücreler ve matriks elemanlarının kayıp dokuyu tamamlama, dokuya fonksiyonunu ve bütünlüğünü kazandırma amacıyla gerçekleşmektedir [9] (Şekil 2.3). Bu fazların herhangi birinde bozulma veya gecikme olduğunda yara iyileşmesinde sıkıntılar yaşanmakta, yara kronik yaraya dönüşmektedir. En genel sınıflandırma ile yara iyileşmesinin 4 ana evresi bulunmaktadır [30]. Bunlar;

1. Hemostasis,
2. İnflamasyon,
3. Proliferasyon
5. Yeniden modelleme fazlarıdır.

Şekil 2.5'te şematik olarak yara iyileşme kademeleri gösterilmektedir. Yara örtüsü formülasyonları, bu doğal iyileşme prosesi üzerine odaklanılarak geliştirilmeye çalışılmaktadır.



Şekil 2.5 : Yara iyileşmesi kademelerinin şematik gösterimi (a) Yaralanma, (b) Koagülasyon (c) Erken enflamasyon, (d) Geç enflamasyon, (e) Proliferasyon, (f) Yeniden modelleme [1] numaralı kaynaktan düzenlenmiştir.

2.2.2.1 Hemostasis

(Kanamamanın durdurulması) yaralanmadan hemen sonra başlamaktadır. Bu sayede pıhtılaşma başlatılmış olur. Bu fazda kan damarları büzülür, kolajen trombositlere yayılır. Kolajenin yayılmasıyla oluşan trombin, trombositleri aktive ederek yara bölgesine toplar ve kan pıhtıları oluşturur. Pıhtılaşma sonucu oluşan fibrin, iyileşmenin sonraki aşamaları için diğer hücrelere doku iskelesi rolü oynamaktadır [7, 31]. Aynı zamanda bu fibrin pıhtı, yara uçlarını birbirine yaklaştırır ve kuruyarak yaranın dış ortamla bağlantısını keser [29]. Trombin, bakterilerin yok edilmesini sağlayan tamamlayıcı sistemi de devreye sokmaktadır. Trombosit degranülasyonu ile hücreler arası etkileşimi sağlayan sitokinler, büyüme faktörleri ve damar çapının değişimine yardımcı olan vazoaaktif maddeler trombosit alfa granüllerinden salınır [31,

32]. Bu fazda trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGFs), fibroblast büyüme faktörü (FGFs) ve damar endothelial büyüme faktörü (VEGF) görev yapmaktadır [33].

2.2.2.2 İnflamasyon fazı

Hemostasis ile beraber yaralanmadan hemen sonra başlar ve yaklaşık 6. güne kadar devam eder. Bu fazın başlaması ve sürdürülmesinde trombositler önemli rol oynamaktadır [34]. Kapiler geçirgenlik arttığında inflamasyon başlatılır. İnflamasyon bulguları kızarıklık, şişlik, sıcaklık ve ağrıdır. Bağışıklık hücreleri (özellikle nötrofiller ve makrofajlar) ve büyüme faktörleri inflamasyon fazın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca trombositlerle birlikte iltihaplı hücreler fibroblastların yara bölgesine göçünü teşvik etmek ve damarlanmayı aktive etmek amacıyla çeşitli büyüme faktörleri salgırlar [7]. Trombositlerden salınan büyüme faktörleri, nötrofil ve makrofajların kemotaksisi ve proliferasyonunu başlatır [35]. Nötrofil ve makrofajlar, yaradan bakterileri, debriyi ve nekrotik dokuyu uzaklaştırırlar. Bu fazda fibroblast ve endotel hücreler çoğalmaktadır [31, 36].

2.2.2.3 Proliferasyon fazı

3-5. günde başlar ve 15-21 gün kadar sürer. Bu fazın en önemli adımı hücreler arası matriksin (ECM) oluşumunun ve damarlanmanın başlamasıdır. Bu fazda bulunan en önemli hücreler fibroblastlar ve endotelyal hücrelerdir [37]. Bu hücreler, trombosit veya makrofajlardan salınan ya da fibrin pıhtısının yapısındaki büyüme faktörleri ve sitokinler sayesinde çoğalırlar. Fibroblastların kemotaktik olarak yaraya göçmesinin yanı sıra, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve endotelyal büyüme faktörü (EGF) de fibroblast aktivasyonunu ve çoğalmasını indükler. Böylece granülasyon dokusunun üzeri örtülmeye başlanır [38].

2.2.2.4 Matürasyon fazı

yeniden şekillenme ve olgunlaşma dönemidir. 3. günde başlar ve iki yıla kadar sürebilir. Bu fazda hücresel elemanlar azalır, vasküler kanalların bir kısmı tıkanır. Yarayı nihayetlendiren bu fazda, kolajen fiberler ve ECM yeniden düzenlenir. Bu yeniden düzenlemede, kolajen sentezi ve ECM'nin bozulması (degradasyonu) arasında bir denge, yani yapım-yıkım dengesi gerçekleşmelidir. ECM'nin bozulması metalloprotenazlar (MMP) aracılığı ile olur. Diyabet hastalarının yara iyileşme

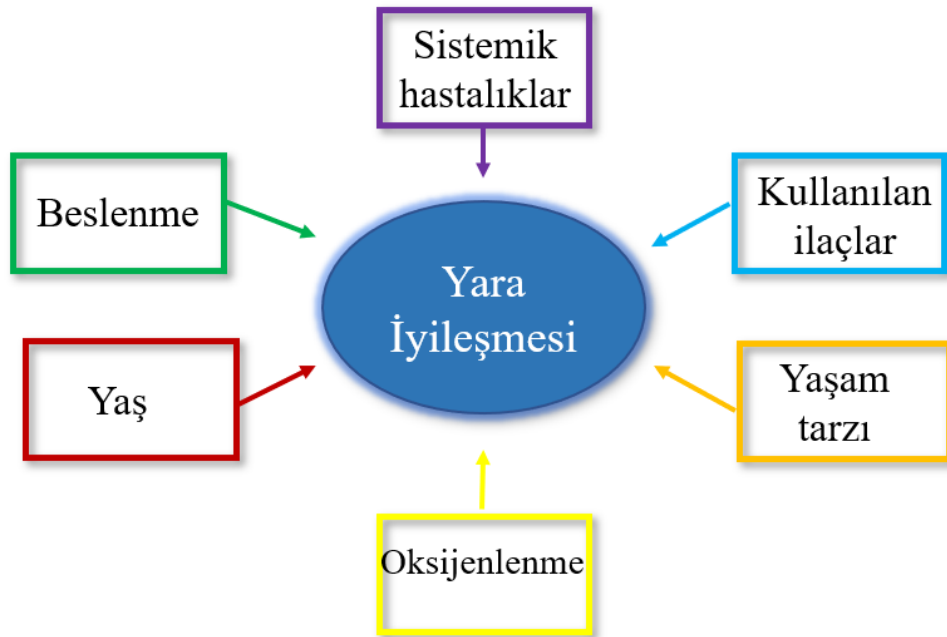
problemlerinden biri de bu kontrolsüz MMP salımıdır. Kolajen çatı sağlamlık kazandıktan sonra, yara yüzeyindeki pımbelik kaybolarak soluk bir hal alır [29]. İmmun sistem patojenleri yok edemediği zaman normal yara iyileşmesi kesintiye uğrar, enfeksiyon oluştuğunda granüstasyon dokusu, büyüme faktörleri ve ECM bileşenleri (kolajen, elastin ve fibrin) bozulmasına neden olur [39].

2.3 Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Bir önceki bölümde bahsedildiği gibi yara iyileşmesi sitokinler, büyüme faktörleri, kan ve ekstra hücresele matris arasında geçen etkileşimler sonucu oluşmaktadır [13].

Büyüme faktörleri, yara iyileşme süreci için hücresele tepkileri düzenleyen endojen sinyal molekülleridir. Bu proteinler, doku hasarına yanıt olarak dokunun alt tabaklarından yüzeye doğru trombositler, lökositler, fibroblastlar ve epitel hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Yara iyileşme prosesinin tüm aşamalarında hücre bölünmesi, göçü, ayrışması, protein ekspresyonu ve enzim üretiminde görev yapmaktadır. Enflamasyon ve yara iyileşmesinin, bir dizi büyüme faktörü ve sitokinler tarafından yönetildiğini ve inflamasyon hücrelerinin bunları ürettiğini unutmamak gerekir. Yara iyileşme prosesinde damarlanmayı (anjiojenesis) harekete geçirip fibroblast aktivitesini modüle edip enflamasyon, proliferasyon ve migrasyon fazlarına etki ederler [10]. Yapılan araştırmalarda gerekli durumlarda yara yatağına büyüme faktörü eklenmesinin yara iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir [40 - 43]. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) özellikle nöropatik diyabetik ayak ülserlerinde kemotaktik stok, hücre proliferasyonu ve anjiyojenesis aktivitelerini desteklemektedir. Augustine vça. çok yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada, epidermal büyüme faktörü (EGF) yüklü jelatin metakrilol (GelMA) hidrojel, Jiangyining vça. da EGF yüklü hyaluronik asit-kitosan hidrojelini hazırlayarak diyabetik ayak tedavisinin özellikle hücre göçü, proliferasyonu ve damarlanma fazlarını destekleyerek iyileşmenin hızlandığını göstermişlerdir [44, 45]. Trombosit etkinleştirici faktör (Platelet-activating factor, PAF), dönüştürücü büyüme faktörü beta (transforming growth factor beta(TGF- β) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor PDGF) inflamasyon fazında etkili olmakta ve monositler, nötrofiller, yumuşak kas hücreleri ve fibroblastlar için kemotaktik aktiviteyi onarmaktadırlar [46, 47].

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor VEGF) damarlanmada görev yapan bir diğer büyüme faktörüdür. Galiano vça. diabetik farelerde topikal VEGF uygulamasının iyileşmeyi önemli ölçüde hızlandırdığını belirlemişlerdir [48]. Bu çalışma özellikle diyabetik ayak tedavisinde neovaskülerizasyon ile karakterize edilmiş komplikasyonlarda VEGF terapisinin potansiyel rolünü göstermiştir. Zhang vça. da, sıçanlar üzerine yaptıkları çalışmalarda harici VEGF uygulamasının erken damarlanmayı arttırdığını ve iskemik yaralarda da gerilme dayanımını arttırdığını belirlemişlerdir [49]. Sitokinler bazal membran bileşenlerinin üretimini stimüle etmek, dehidrasyonu engellemek ve granülasyon dokusunun oluşumunu sağlamak gibi çeşitli metabolik yollarda görev yaparak yara iyileşmesine katkıda bulunurlar. Bu metabolik yollar çeşitli lokal (yaralı bölgede oluşan) ve sistemik (organizma ile ilgili) faktörlerden etkilenmektedir [13]. Bu lokal ve sistemik faktörlerin varlığı yarayı kronik bir yara haline getirebilmektedir (Şekil 2.6) [50].



Şekil 2.6 : Yara iyileşmesine etki eden en genel faktörler.

2.3.1 Lokal faktörler

Oksijenlenme: Oksijen, hücre metabolizması, özellikle enerji üretimi için çok önemlidir. Yara iyileşme prosesinin neredeyse her aşamasında oksijene gereksinim bulunmaktadır. Yarayı enfeksiyondan korur ve damarlanmayı başlatır. Keratin ayrışması, yer değiştirmesi, fibroblast proliferasyon ve kolajen sentezi için kullanılmaktadır. Vasküler karmaşa ve metabolik olarak aktif hücrelerin fazla oksijen harcamasından dolayı yara tedavisinin erken fazlarında oksijen tükenebilir ve bir miktar hipoksi oluşur [51]. İleri yaş ve diyabet, vasküler akışı geciktirebilir, bu yüzden doku oksijenlenmesi zayıflar. Bu gecikme hipoksik yara oluşturur. Kronik yaralar, önemli ölçüde hipoksikdir. Eğer oksijenlenme gecikirse, yara tedavisi de gecikmektedir. Yaralanmadan hemen sonra oluşan geçici hipoksia yara iyileşmesini başlatır. Geçici hipoksia, makrofaj, keratinosit ve fibroblastlardan sitokin ve büyüme faktörlerinin üretimini başlatır. Dolayısıyla optimum oksijen seviyesi, yara tedavisi için çok önemlidir [30].

Enfeksiyon: Yaralanma meydana geldiğinde, mikroorganizmalar derinin alt tabakasıyla bağlantı kurarlar. Mikroorganizmanın enfeksiyon veya replikasyon seviyesi kontaminasyon, kolonizasyon, lokal enfeksiyon/klinik kolonizasyon ve/veya yayılan saldırgan enfeksiyon olup olmadığını belirler. Enflamasyon, yara tedavisinin normal bir bölümüdür ve bu süreçte mikroorganizmalar yok edilir. Eğer efektif bir dekontaminasyon gerçekleştirilmezse, enflamasyon fazı gecikir ve mikrobiyal temizlik sağlanmaz. Bu durumda yara kronik hale gelir ve tedavi başarısız olur. Bu gecikmiş enflamasyon fazı, aynı zamanda MMP'lerin artışına neden olur ki bunlar da ECM'i degrade ederler [52, 53]. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *beta- hemolitik streptococci*, enfekte yaralarda en sık rastlanan bakterilerdir. Birçok kronik ülserler, *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerden dolayı iyileşmemektedir [38].

2.3.2 Sistemik faktörler: A, C, K vitamini, protein, Zn ve Fe eksikliği, yaş, cinsiyet, obezite, aşırı alkol kullanımı, sigara, kullanılan bazı ilaçlar ve diyabet, anemi gibi rahatsızlıklar yara tedavisini geciktirebilir [50, 53]. Diyabet çok önemli bir faktördür ve bütün aşamalarda yarayı ve yara iyileşmesini bozmaktadır [54, 55]. Vasküler sistemin restorasyonuna müdahale etmekte ve yeni oluşacak dokunun yenilenmesini engellemektedir [55]. Diyabetik ayak ülserleri sitotoksik enzimlerin, ROS gibi serbest radikallerin ve enflamatuvar mediatörlerin salımını gerçekleştirerek enflamasyon

fazının uzamasına ve hatta iyileşme sürecinin durmasına neden olmaktadır. Diyabetik ayak ülserleri hiperglisemi nedeniyle mikrobial kolonizasyon için çok uygun yaralardır. Bu durum doku enflamasyon ve iyileşme fazının uzamasının en önemli nedenlerinden biridir. Bunun yanısıra yaranın içinde biriken makrofaj ve nötrofiller enflamasyon sitokinlerini salarak, MMP üretimini destekleyip yara iyileşmesini yıkıma uğratmaktadır [15]. Bu arada, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve trombositlerden üretilen büyüme faktörü (PDGF) salımı da gecikir. Böylece enflamasyon fazından proliferasyon fazına geçiş önlenerek, yeni doku oluşumu aksar [56].

Proteinler, yara iyileşmesinde önemli rol alırlar. Protein eksikliğinde inflamasyon fazı uzar ve fibroblasya bozulur. Fibroblasya, kolajen üreten fibroblastların yara kenarından köken alarak yaraya göç edip, yaraya proliferolmaları, böylece kolajen üretilmesi ve kolajenin yara bölgesindeki birikim sürecidir [30]. Yara iyileşmesinde metionin, sistein ve arjinin gibi aminoasitler hayati önem taşırlar [53]. Karbonhidratlar ve yağlar hücrenin enerji kaynağıdır. Sodyum, potasyum, kalsiyum, fosfor, çinko ve magnezyum eksikliği, kolajen sentezinde problemlere yol açar. Çinko yetersizliğinde epitel hücreleri ve fibroblastlar göç edebilirler ama çoğalamazlar. Sonuçta epitelizasyon oluşmaz ve kolajen üretimi yara kenarlarının bir arada tutacak düzeye ulaşmaz. Ancak, yüksek çinko konsantrasyonu tedavi için zararlı olabilir [53].

2.4 Yara Tedavisinin Tarihsel Gelişimi

İnsanoğlu, uygarlığın başından beri yaralara çeşitli şekilde müdahale etmiştir. Yara bakımında temel amaç; mümkün olan en kısa sürede doku onarımını sağlayarak yaralı dokunun yapısını veya fonksiyonel durumunu düzeltmek, enfeksiyona uğramasını engellemek, ödem ve ağrıyı azaltarak iyi estetik sonuca ulaşmaktır [57]. Tarih öncesi devirlerde, mağara resimlerinden yaraların ve kırıkların tedavisinin yapıldığı anlaşılmaktadır.

Yara tedavisinin kökeni M.Ö. 5000'li yıllara dayanmaktadır. Geçmişte yara bakımında kullanılan yara örtüleriyle sadece yara dudaklarının bireştirilmesi ve yara akıntısının emilerek bakterilerin üremesi önlenmesi hedeflenmekteydi [58].

Yara bakım prosesi Sushruta (eski Hindistan), Hipokrat (Pericle, tıbbın babası olarak bilinir) ve Ibn-i Sina' dan (Mezopotamya) itibaren sihirli büyüler ve iksirlerden yola

çıkılarak sistematik bir yara bakımı ve prosedürüne ulaşana kadar çok çeşitli kilometre taşlarına sahip olmuştur.

Mezopotamya’da M.Ö. 2000 yılında Babil Kralı Hammurabi’nin kitabelerinde çeşitli tıbbi hükümler bulunuyordu. Bu tabletlerde ilaç reçeteleri bulunmaktadır. Eski Mısır’da Eber papiruslarında, hint yağının yaralar ve yanıklarda ilaç olarak dışarıdan kullanıldığı belirtilmektedir. M.Ö 1500’lerde yazıldığı düşünülen papirüslerdeki ‘Yara rahatsız ediyorsa sakinleştir, sert ise yumuşat, sıcak ise soğut, şiş ise söndür, ağrılı ise rahatlat’ sözü yara bakımındaki genel yaklaşımı özetler niteliktedir [59].

Mısırlı cerrahlar yaralara küflü ekmek kullanmaktaydılar. Hipokrat, yaralara katran sürerek, ilk antiseptik malzemeyi kullanmıştır. Yine bu devirde yara tedavisinde bal kullanılmıştır. Bal, yaralara antibiyotik etkisi göstermekteydi. El Zahravi (936-1013, Cordoba-Endülüs-İspanya) cerrahiye ilişkin (On surgery and instruments) adlı ansiklopedik kitabı günümüze kadar gelmiştir. Bu kitapta aynı zamanda ortopedi, göz, jinekoloji ve farmakoloji bilimine ait bölümler de bulunmaktadır. Bu çalışma ilk rasyonel cerrahinin dönüm noktası olarak kabul edilmektedir. William Hunter (1717-1783) Al-Zahrawi’nin anevrizma ile ilgili çalışmasını Glasgow Üniversitesi’ndeki çalışmalarında kullanmıştır [60]. Al-Zahrawi’den 300 yıl sonra Şerafeddin Sabuncuoglu’nun (1385–1468) 80 yaşında iken yazdığı İmparatorluk Cerrahisi ((Imperial Surgery) adlı kitap tarihte Türkler tarafından yazılmış ilk cerrahi kitabıdır [61]. Bu kitabın 1 kopyası Paris, 2 kopyası da İstanbul’da bulunmaktadır [62]. Avicenna olarak da bilinen İbn-i Sina’nın ünlü kitabı ‘Kanun’ uzun yıllar tıp fakültelerinde ders kitabı olarak okutulmuş, beş ciltten oluşan bu kitabın üçüncü cildi deri ve zührevi hastalıklar ile ilgili yazılar, ikinci kitapta ise o devirde bilinen 760 basit ilacın listesi verilmiştir. XVII yy.da Salih bin Nasrullah eserinde kantaron otunun hem öksürüğe, hem de yaralara iyi geldiğini yazmıştır [63]. Al-Zahrawi’nin koton kumaşı kanama kontrolünde ve kırıklarda dolgu olarak kullanmasının ardından [60] 1460 yılında Bavyeralı Heinrich von Pfolpeunt, yaraların temiz bezlerle sarılması ve yaraya dokunan kişinin ellerinin temiz olması gerektiğini belirterek temizliğin önemini vurgulamıştır.

1800’lerde yaşamış Louis Pasteur, havada bulunan etmenlerin, açıkta bıraktığımız yiyecekleri bozduğunu fark etmesiyle ilginç gelişmeler yaşanmıştır. Pasteur, hava ile temasda bulunmayan gıdaların bozulmadığını gözlemlemiş ve putrifikasyon, yani kokuşma deneyleri ile bu işi başlıca bakterilerin yaptığını tespit etmiştir [64, 65].

Duchesne, 1897’de küf mantarının koli basili çoğalmasını engellediğini tezinde yazmıştır. Askerlik yaparken Arap çocukların, atların yaralarını iyileştirmek amacıyla, eğerleri küflendirdiğini gözlemlemiştir. O’nun bu gözlemi penisilinin keşfedilmesine yol açmıştır.

Yara örtüsü malzemeleri gün geçtikçe gelişme göstermektedir ve üzerinde en çok araştırma yapılan konulardandır. İlk geniş kapsamlı mikroskopik çalışma 1930’larda Hartwell tarafından gerçekleştirilmiştir. Hartwell insan yaralarını tavşan, köpek ve domuz yaraları ile karşılaştırmış ve insan epitel ve alt epitel yüzeylerinde gerçekleşen iyileşmenin bu hayvanlarınkinden farklı olduğunu belirlemiştir. Yara iyileşmesi patolojik çizelgesinin en yakın domuz, ardından da tavşanlarınkine benzediğini belirlemiştir [66]. Nobel ödüllü (1953) Alman kimyacı Hermann Staudinger ‘makromolekül’ kavramını ortaya atarak [67] selüloz ve proteinlerin birer makromolekül olduğunu ileri sürmesiyle yeni bir çığır açılmıştır. Böylece yara tedavisinde 1960’lardan itibaren polimerik yara örtüleri geliştirilmeye başlanmıştır. 1962 yılında, İngiliz kimyacı George Winter, domuz yaralarını sıvı emici bir yara örtüsü ile kapatarak, yara iyileşmesine nemli iyileşme ‘moist healing’ kavramını kabul ettirmesi bir diğer kilometre taşı olmuştur [68]. Nemlendirme, bütün hücreleri canlı ve fonksiyonel tutabilmek için anahtar bileşendir [69]. George Winter, epitelizasyonun nemli tedavi ile iki kat daha hızlı ilerlediğini ispat etmiştir. Winter’ın sonuçlarını Hinman ve Maibach da 1963 yılında yaptıkları çalışma ile doğrulamışlardır [70]. 1990 yılında çok önemli bir gelişme olan yanık tedavisi amacıyla yapay deri üretilmiş ve ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır [71]. Polimerik yara örtüleri sayesinde gazların geçirgenliği ve yara sıvısının adsorbe edilebilmesi sağlanmıştır.

Günümüzde ise, özellikle son yirmi yılda, hastaya minimum sıkıntı vererek, yara izinin tamamen kapanması ile ilgili yüksek beklentiler, değişik ve cesur uygulamalara adım atılmasına neden olmuştur. Yarayı tamamen kapatmayı hedefleyen, fibriz dokulu ve protein içeren, fazla miktardaki yara sıvısını uzaklaştırıp, yara bölgesine ilaç ve çeşitli aktif biyomalzemeleri salabilen yara örtüleri geliştirmek biyomedikal alanda çalışan araştırmacıların en büyük hedefi olmuştur. Gelişen teknoloji ile yara mekanizmasına etki eden faktörlerin ortaya çıkarılması ve bunları stabilize edecek, aktivitelerini kaybetmeden sentezleyebilecek ve gereğinde salımını gerçekleştirebilecek cihaz ve yöntemlerin geliştirilmesi ile daha fonksiyonel ürünler sentezlenmeye başlanmıştır. Kompozit, jel, film, membran, mikro ve nano partiküllü sistemler yara örtüsü ve doku mühendisliği kullanımları için geliştirilmeye devam edilmektedir. Cilt doku

mühendisliği klinik uygulamalar için cilt yapısını taklit edebilecek yara örtüsü ve sentetik doku gibi malzemeleri geliştirmek amacıyla hızla çalışmalarına devam eden bir alandır [72, 73]. Bu malzemelerin içine sitokin ve büyüme faktörü gibi proteinlerin sabitlenmesiyle, günümüz modern yara örtülerine ulaşılmıştır. Dolayısıyla modern yara örtüleri tedavi için yararlı bir ortam sağlayacak şekilde, giderek daha sofistike hale gelmektedir.

2.5 Yara Örtüleri

2.5.1 Yara iyileşmesi ve fitoterapi

Fitoterapi (Phytomedicine) önemli ölçüde farmakolojik etki gösteren reçeteleri içermektedir. Herbal ajanlar hem topikal hem de sistemik olarak yara onarımında büyük oranda kullanılmaktadırlar [33]. Yara örtüleri yüzyıllar önce şifalı bitkiler, hayvansal yağlar ve bal ile kaba uygulamalar şeklinde başlayıp, günümüzde doku mühendisliğine kadar ulaşmıştır. Özellikle Afrika kıtasında kullanılan pek çok ilaç-bitki antibakteriyal aktivite göstermektedir. Nijerya ve Senegal’de yara tedavisi için kullanılan ‘Guiera Senegalensis’ yaprakları, antibakteriyal özellik göstermektedir. Fakat birçok bitki direk veya ham ekstrakt olarak uygulandığında mikroorganizmalar içerebilirler [74]. Bu durum da enfeksiyon riskine yol açmaktadır. Bu yüzden yara örtüsü uygulamaları geliştirilmiştir [75]. Yara tedavisinde en çok arjuna bark [76], karanfil yağı [77], köpek üzümü [78], tamanu [79], arnica [80], kalendula [81], sarı kantaron [82, 83] yeşil çay [84], mimoza [85], niaoli [77, 86], aloe vera [85], jojoba [87], ginseng [88], biberiye [89], tea tree oil [90], limon [91] kullanılmaktadır. Şekil 2.7’de de yara tedavisi için en çok kullanılan herbal ajanlar gösterilmektedir.



Şekil 2.7 : Yara tedavisinde en çok kullanılan bitkiler.

2.5.2 İdeal yara örtüsü kriterleri

Yara tedavisi için çok farklı yara örtüleri bulunmaktadır. Uygun örtüyü seçerken, uygulanacak yaranın tipi kadar, iyileşme fazı da dikkate alınmalıdır. İdeal bir yara örtüsü malzemesi için en önemli husus kanı çok hızlı bir şekilde tutması ve yara iyileşmesine olumsuz bir etkiye bulunmamasıdır [92]. Uygulamada en önemli problem, yaranın *Staphylococcus aureus* veya *Escherichia coli* gibi mikroorganizmalar tarafından kolonize edilmesidir [93]. Nemli ortamın hızlı yara iyileşmesi sağladığı daha önce de bahsedildiği üzere iyi bilinen bir gerçektir. Yara örtüsü tasarlarken bu faktörler dikkate alınmalıdır. İdeal bir yara örtüsünün genel özellikleri şu şekilde sıralanabilir [71, 94]:

- 1) Kolay uygulanabilmeli,
- 2) Biyoadhezif olmalı,
- 3) Yeterli su buharı geçirgenliği sağlayabilmeli,
- 4) Kolaylıkla sterilize edilebilmeli,
- 5) Bakteriyal saldırıyı baskılayabilmeli,
- 6) Elastik olmalı,
- 7) Mekanik dayanımı iyi olmalı,
- 8) Tedavi ajanlarıyla uyum sağlayabilmeli,
- 9) Optimum oksijen geçirgenliği sağlayabilmeli,
- 10) Biyobozunur olmalı,

- 11) Biyoyumlu olmalı,
- 12) Toksik olmamalı,
- 13) Alerjik reaksiyonlara sebebiyet vermemeli,
- 14) Şeffaf olmalıdır.

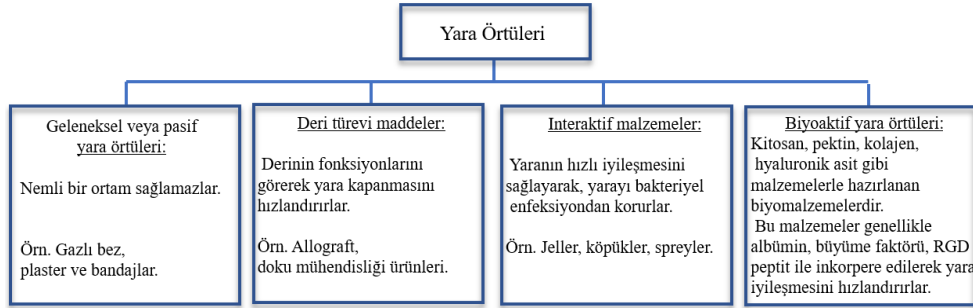
Sağlıklı insan derisinden ortalama su kaybı $250 \text{ g/m}^2\text{gün}$ iken yaralı deride bu değer yaranın cinsine göre $5000 \text{ g/m}^2 \text{ gün}$ değerine kadar çıkmaktadır. İyi bir yara örtüsü bakteri gelişimini engellemek amacıyla bu yüksek eksudayı absorbe edip, uygun su buharı geçirgenliği oranı ile de yarayı kurutmadan, aşırı sıvıdan kurtulabilmelidir. Yara örtüsü aynı zamanda kullanımı kolay olmalı, uygun bir elastisiteye sahip olmalıdır. Yeterli oksijenlenme yara iyileşmesi için çok önemlidir. Bu nedenle örtü malzemesi yaranın oksijen ile temasını sağlayabilmelidir [66]. Yara örtüleri mükemmel biyoyumluluk ile beraber antibakteriyel gereksinimleri karşılamalı, aynı zamanda debriyi absorbe edebilmeli ve iyileşmeyi hızlandırmalıdır. Bunların yanısıra raf ömrü, mekanik dayanıklılık, etkin maliyet, hasta için konforlu kullanıma sahip olması ve biyobozunurluk da bir yara örtüsü malzemesi için en çok aranan özelliklerdendir [94-96].

Ancak, çoğu mevcut yara örtüleri bu özelliklerden azını içerebilmektedir. Bu nedenle, çok işlevli biyoaktif akıllı yara örtüsü çalışmalarına büyük gereksinim vardır [94]. Biyomalzeme temelli yara örtülerinin klinik uygulamaları toksisite problemi ve klinik çalışmaların eksikliği nedeniyle kısıtlanmaktadır. Bu nedenle tamamen biyoaktif, biyobozunur ve sürdürülebilir yara tedavi sistemleri, gereken pozitif yara iyileştirme özelliklerinin gösterdiklerine emin olunması ve aynı anda hem toksisiteyi hem de iltihaplanmayı minimize etmek için çok önemlidir.

2.5.3 Yara örtülerinin sınıflandırılması

Literatürde çok çeşitli yara örtüsü sınıflandırmaları mevcuttur (Şekil 2.8); yaradaki fonksiyonuna göre (antibakteriyel, kapatici, absorben, yapışkan vb.); yara örtüsü hazırlarken kullanılan malzeme cinsine göre (hidrokolloid, aljinat, kolajen vb.); ve yara örtüsünün fiziksel formuna göre (filmler/membranlar, jeller, sprey ve köpükler, kompozitler vb.) [97, 98] dünyada yara örtüsü pazarı genellikle geleneksel ve gelişmiş yara örtüleri olarak iki ana segment altında kategorize edilmektedir [99]. Gelişmiş yara örtüleri köpükler, hidrokolloidler, hidrofiberler, filmler, kolajen, hidrojeller, superadsorbanlar ve diğer gelişmiş yara örtüleri olarak alt sınıflara bölünebilir. Ayrıca

kendi kendine kapanamayacak büyük yaralar için biyomalzeme temelli deri greftleri yara örtüsü olarak gelişmiş yara örtüsü segmenti içinde incelenebilir.



Şekil 2.8 : Yara örtülerinin sınıflandırılması.

2.5.3.1 Geleneksel yara örtüleri

Pamuklu bez, doğal ya da sentetik bandajlar ve gazlı bez hala en çok kullanılan yara ve yanık örtülerindendir [97, 98]. Ancak, kuru oldukları için nemli bir iyileşme ortamı sağlamazlar. Günümüzde genellikle yara tedavisinde ilk müdahale anında kullanılırlar. Yarayı dış ortamdan korurlar ve hızlı dehidrasyon sağlarlar. Ancak, yara yüzeyinden ayrılırken kanamaya neden olup, yeni oluşmuş epitelyuma zarar verebilirler. Geleneksel yara örtülerinden sızan yara sıvısının enfeksiyon riskini arttırması bu tarz yara örtülerinin en büyük problemidir. Ayrıca bu yara örtülerinde, sık sık koton fiberler nedeniyle oluşan ‘yabancı cisim reaksiyonu’ problemiyle karşılaşmaktadır. En büyük avantajları ise düşük fiyatlı olmalarıdır [100].

2.5.3.2 Biyomalzeme temelli yara örtüleri

Biyolojik yara örtüleri genellikle elastin ve lipit içeren kolajen yapıları doğal örtülerdir. Bu örtüler; (i) allograflar, (ii) doku türevleri, (iii) ksenogreft (yabancı doku aşısı) şeklinde 3 farklı grupta kategorize edilebilirler [98, 101].

Bir yarayı tamamen tedavi edebilmek için en iyi yöntem otograftingdir. Ama büyük yaralar için gerekli olan yetersiz donör alanları, yeni doku alanları aramaya sevk etmiştir. Allograf, doku türevleri ve yabancı doku nakli ‘ksenogreft’ şeklinde üç sınıfta incelenebilirler. En önemli problem, immün reaksiyon sonucu vücudun dokuyu reddedebilecek olmasıdır. Enfeksiyon riski yoktur. Hazırlanmaları zordur, raf ömürleri kısadır ve pahalıdır [102].

2.5.3.3 Gelişmiş yara örtüleri

Geleneksel ve biyomalzeme temelli yara örtüleri, stabilite ve enfeksiyon riski problemlerinden dolayı kısıtlı kullanıma sahiptir. Bu durum, yara ve yanık tedavisinde uzun raf ömrü olan, daha etkili ve ucuz polimer tabanlı örtülerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Yara örtüsünde en çok kullanılan sentetik polimerler poliüretan [103 - 106] polikaprolakton [107], polietilen glikol, proplast, metil metakrilat [108] ve silikondur [110]. Yara örtüsü olarak en sık kullanılan doğal polimerler, bağ dokuda yaygın olarak bulunan kolajen [111] ve ECM'in bir elemanı olan karbonhidratlardır. Çizelge 2.1'de dünya marketlerindeki gelişmiş polimerik yara örtülerinin bulunduğu bir liste verilmiştir. Yara örtüsü ve doku mühendisliği çalışmalarında çok yol alınmasına rağmen ürünlerin raf ömrünü uzatmak ve maliyeti azaltmak gerekmektedir.

Çizelge 2.1 : Polimerik yara örtüleri [112].

Yara örtüsü cinsi	Marka adı
Polimerik filmler	Tegaderm Blister Poly-skin II Opsite, Aluderm
Polimerik köpükler	Flexzan Biopatch Crafoams Biatain Cutinova Restron Lyof foam Ivalon
Polimerik hidrokolloidler	Iodosorb Debrisan Sorbex Duoderm

Kronik yaraları tedavi edebilmek için film, gazlı bez, hidrojel, hidrokolloid ve köpük pansuman gibi gelişmiş yapay örtülerine gereksinim bulunmaktadır. Yara tedavisinde fazla sıvıyı uzaklaştırıp yarayı bakteri istilasından koruyabilmek çok önemlidir. Ayrıca, gelişmiş yara örtülerine büyüme faktörü, albümin gibi protein ilavesi de vücut hücrelerinin büyümesini teşvik eder ve iyileşmeyi hızlandırır. Yara iyileşme fazları üzerinde en etkili olabilecek proteinler belirlenmeli, yara örtülerinin jelleşme kinetikleri ve termodinamik özellikleri ile çalışılarak en optimum protein immobilizasyon ve salım koşulları belirlenmelidir.

Filmler: Filmler en ideal yara örtülerindendir ve ticari olarak da bulunurlar. Mikrometre kalınlığından milimetre kalınlığına kadar, farklı kalınlıklarda bir ya da daha fazla polimer ile farklı metotlarla hazırlanabilirler. Polimerik ağ yapısıyla yarayı dış etkenlerden korurlar [98].

Spreyler: Spreyler, solvent ve polimer içeren, uygulandığında yaranın yüzeyinde bir film tabakası oluşturan farmakolojik formlardır. Spreylere en iyi örnek, polihidroksimetil metakrilat toz ve sıvı polietilen glikol ile hazırlanan ‘Hydron ®’dur. Çalışmalarda [113 - 115] spreyleyin ağrıyı azalttığı gözlemlenmiştir. Alt membran sıvısı birikimine sebep olmaları ve zamanla bütünlüğünün bozulması ise önemli dezavantajlarıdır [115].

Köpükler: Köpük yara örtüleri yaraya nemli bir ortam sağlar ve fazla sıvı kaybını ve bakteriyel kontaminasyonu engellerler. Açık gözenek yapısı yüksek su transfer hızı sağlar. Bilhassa, porlu yapıları nedeniyle yüksek miktarda adsorban olduklarından, çok miktarda yara sıvısı tutabilirler. Bu nedenle kısmi ve derin yaralar için uygundur. Fakat kuru epitelize olan yaralar ve kuru yara izli yaralar için uygun değildir [100]. Özellikle yanık yüzeylerde fibrinojen aktivitesini yükseltirler. Ayrıca, EGF enkapsüle edilmiş lipozom sistemlerde, yanık ve yara tedavilerinde partikül taşıyıcı sistem olarak kullanılırlar.

Kompozitler: Yara tedavisi için geliştirilen kompozitler, hem elastiktirler hem de yüksek mekanik dayanıma sahiptirler. Örneğin, Telfa© poliyester filmin koton ile sarılmasından elde edilmiş bir kompozittir [98].

Tanecikli Sistemler: Tanecikli sistemlerin en büyük avantajı, açık yaralara bölgesel olarak uygulandıklarında, kolaylıkla su buharı ve oksijen geçirgenliğini

sağlamalarıdır. Çok partiküllü yapılarından dolayı geniş temas yüzeyleri ve yüksek biyoyapışkanlıkları vardır.

Hidrojeller: Hidrojeller çok farklı biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Özellikle yara iyileşmesi için en etkili malzemelerden biridir [116 - 119]. Hidrojel ve yara yatağı arasında oluşan uyum nedeniyle hidrojeller biyoyumludur ve optimum nemli bir platform sağlar. Ayrıca, uygun modifikasyonlarda bakterileri izole edebilir [120, 121] Geleneksel yara örtüleri ile kıyaslandığında hidrojellerin en önemli avantajı, ayarlanabilir yapışma özelliklerinden dolayı yara yüzeyinden kolaylıkla ayrılabilmesidir. Bu sayede hem iyileşen doku ikinci bir travmaya uğramayacak, hem de hastaya ek bir acı olmayacaktır [122].

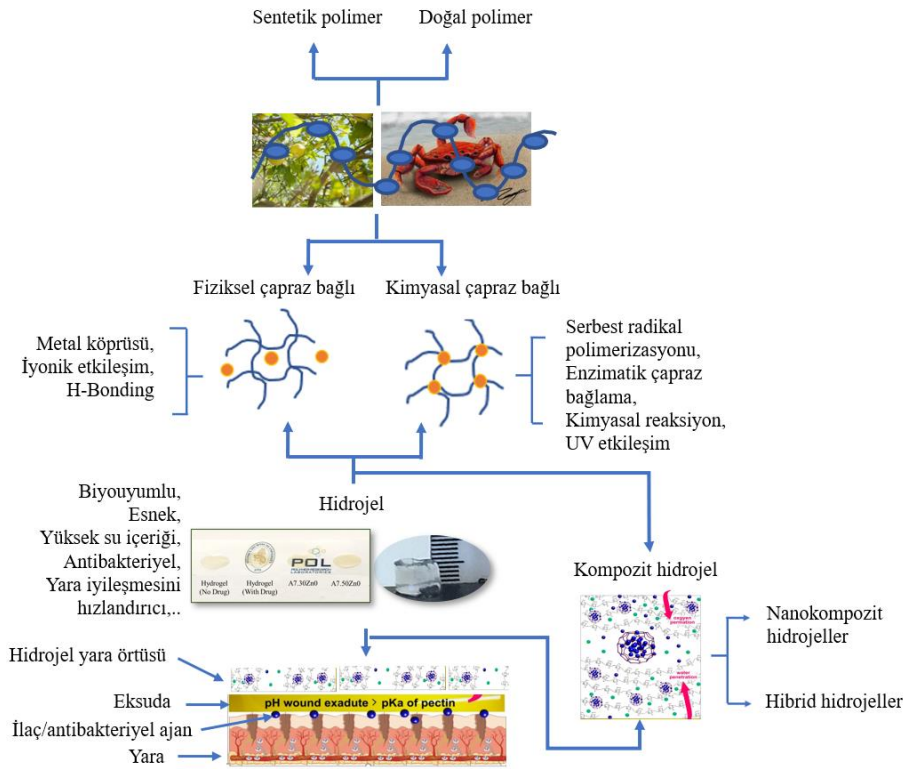
Hidrojeller biyoyumlulukları, geniş bir yapı skalasına sahip olmaları, sentezlenme kolaylıkları ve üstün fiziksel özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalar için en çok tercih edilen malzemelerdendir [92]. Üç-boyutlu çapraz bağlı porlu bir ağ yapı oluşturmakta ve kendi kuru ağırlıklarının onlarca katı sıvı absorblayabilmektedirler [123, 124]. Termodinamik kuvvetler vasıtasıyla sıvıların içinde şişebilmekte ancak çözünmemektedirler [125 - 128]. Bu üç-boyutlu malzemeler, sıvı dengesini iyi ayarlayabilir ve çoğunlukla hastaya sıkıntı vermeden yarayı gözlemlemeye imkan sağlayacak şekilde şeffaf olurlar. Yaraya uygulandıklarında genelde gazlı bez gibi ikinci bir kapama malzemesi gerektirebilirler. Genellikle hidrojel filmlerin yara üstüne uygulanmalarındaki amaç; yarayı bakteriyel enfeksiyondan korumak, otokatalitik debridementi önlemek ve nemli ortam sağlayabilmektir.

Bir yara örtüsü olarak hidrojeller, yara yatağı ile dış ortam arasında bir bariyer görevi görerek yara bölgesine mikrobiyel istilayı engelleyebilmektedirler. Bunun yanısıra antimikrobiyel ajanlar ve yara iyileşmesine yardımcı olacak veya ağrıyı azaltacak ilaçlar da hidrojelin içine fiziksel veya kovalen bağlı olarak yüklenip bakteriyel kontaminasyon ve enfeksiyon riski azaltılarak iyileşme prosesini hızlandırırlar [129, 130]. Optimum oksijen geçirgenliği oluşturmakta, serin bir ortam sağlayarak ağrıyı azaltmaktadırlar. Bütün bu özellikleri hidrojelleri yara tedavisinde üstün kılmaktadır [94, 122, 131].

Hidrojellerin, bölgesel ilaç veya büyüme faktörü salım sistemleri için uygunluğu ve doku oluşumu için matriks oluşturabilmeleri de kullanımlarını artırmıştır. Bu sebeple hidrojeller, yara tedavisinde sadece pasif olarak değil, aynı zamanda aktif bir ajan

olarak yer alabilirler [115]. En önemlisi de ECM yapısına benzeyen hidrojel bazlı polimerik ağ yapılı yara örtüleri antibakteriyel ajanlar ve büyüme faktörleri gibi iyileşme prosesine aktif olarak müdahale edebilmektedirler [132]. Bu nedenle, hidrojeller bu yüksek ilaç yükleme kapasiteleri ile biyomoleküllerin lokal ve sürekli salımı için etkili malzemelerdir [94].

Hidrojellerin farklı sınıflandırılmaları vardır. Bağlanma modlarına göre fiziksel ve kimyasal, malzemenin kaynağına göre ise sentetik ve doğal hidrojeller olarak sınıflandırılmaktadırlar. Sentetik hidrojeller en kaba bir ayırım ile poli(hidroksi alkil metakrilatlar), poli(akrilamid), poli(N-vinil piroolidon), poli(akrilik asit) ve poli(vinil alkol) olarak 5 ayrı grup altında incelenebilir. En çok çalışılan doğal hidrojeller ise polisakkaritler ve peptit temelli hidrojellerdir [133-135]. Şekil 2.9'da polisakkarit temelli hidrojeller, genel özellikleri ve yara iyileşmesi etkilerine genel bir bakış verilmiştir.



Şekil 2.9 : Hidrojel temelli yara örtüleri.

Bu tez çalışmasında bir polisakkarit temelli hidrojel olan pektin hidrojeller tasarlanmıştır. Bu nedenle Bölüm 2.6'da detaylı olarak polisakkarit temelli hidrojeller hakkında bilgi verilmiştir.

2.6 Polisakkarit Temelli Yara Örtüleri

Polisakkaritler yenilenebilir kaynaklardan elde edilirler ve doğada çok bol bulunmaktadırlar. Üretimleri kolay ve düşük maliyetlidir. Yüksek oranda hidrofilik olan polisakkaritlerin yakın zamanlarda ilaç [136], protein [137] ve gen salımı [138] amacıyla ve yara örtüsü [139-141] formunda kullanımları için çok üstün özellikler taşıdıklarının farkına varılmıştır. Biyouyumluluk, biyobozunurluk ve immün sistemi uyarmamaları gibi özellikleri biyomedikal uygulamalarda öne çıkmalarını sağlayan en önemli özelliklerindendir. Çok sayıdaki pendant fonksiyonel grupları çeşitli moleküllerle etkileşime girebilecek bölgeleri bulunmaktadır. Ayarlanabilir üç-boyutlu yapıları ve ağ yapılı morfolojileri sayesinde polisakkarit temelli hidrojelleri ilaç salımı, biyosensör [142] ve yara iyileşmesi alanlarında kullanımı oldukça elverişlidir. Ancak, hidrojelleri uygulanacak alanın ihtiyaçlarına göre hazırlamak önemlidir [92].

Çeşitli monosakkaritlerin hidroliz formu olan polisakkaritler yüksek molekül ağırlıklı karbonhidratlardır. Hayvan, bitki ve mikrobiyel ortamlarda doğal olarak bulunmaktadır ve çeşitli yapısal fonksiyonları vardır. Basit şekerlerin polimerik anhidridi olarak da bilinirler. D-glukoz polisakkaritlerde bulunan en genel monosakkarittir. Bunun yanı sıra D- ve L-galaktoz, d-xyloz, l-arabinoz, d-mannos, d-glukuronik, d-mannuronik asitler, d-glukosamin, d-galaktosamin, d-galakturonik ve amino üronik asitler de polisakkaritlerin bünyesinde bulunmaktadır.

Polisakkaritler, hücrelerin bağlanmasına, yayılmasına ve ayrışmasına yardımcı olan fonksiyonel gruplar taşıdıkları için yara örtülerinin topikal ilaç salımı uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar [143]. Hücreler arası matrikse benzerlikleri, yüksek biyolojik performansları ve düşük maliyetleri dolayısıyla üzerlerinde en çok çalışılan ve umut vaad eden polisakkaritlerin başlıcaları nişasta, aljinat, kitosan, selüloz ve pektin polimeridir. Ticari yara örtüsü olarak kullanılan Algisite©, Kaltostat©, Sorbsan©, Tegagen© yarayı nemlendirme ve kolaylıkla çıkarılabilme özelliğine sahiptirler. Çizelge 2.2’de bazı aljinat temelli ticari yara örtüleri, ticari isimleri ve kompozisyonları verilmiştir. Bunların en önemli problemi maserasyona varan aşırı nemlendirmedir.

Çizelge 2.2 : Aljinat temelli ticari yara örtüleri [144].

Ticari Aljinat temelli yara örtüleri	Kompozisyon
Algicell TM	Sodyum aljinat, % 1,4 gümüş
AlgiSite M TM	Kalsiyum aljinat
Comfeel Plus TM	Sodyum karboksi metil selüloz ve kalsiyum aljinat
Kaltostat TM	Sodyum aljinat
Sorbsan TM	Kalsiyum aljinat
Tegagen TM	Sodyum aljinat
Gurdix-SG [®]	Sodyum aljinat ve polaksomer
Algivon [®]	Kalsiyum aljinat ve Manuka balı
Fibracol TM Plus	Kalsiyum aljinat ve kolajen
Hyalogran [®]	Hyaluronik asit esterleri ve sodyum aljinat
Tromboguard [®]	Sodyum aljinat, kalsiyum aljinat, kitosan, poliüretan ve gümüş katyonları

Polisakkarit temelli hidrojellerin yara örtülerinin tasarımında dikkat edilmesi gereken hususlar:

(1) Biyouyumluluk

Bütün biyomedikal uygulamalarda olduğu gibi biyouyumluluk ilk dikkat edilmesi gereken özelliktir. Polisakkaritler üstün biyouyumluluğa sahiptirler ancak yara örtüsü

sentezlenirken sistemde kullanılan diğer komponentlerin de biyouyumlu olmasına dikkat edilmelidir. Örneğin birçok biyopolimerik doku iskelesi, hidrojel ve kompozitin çapraz bağlanmasında küçük bir molekül olan gluderaldehit çok sık kullanılmaktadır [92]. Gluderaldehitin aldehid grupları hücreler için toksiktir ve vücut içinde çeşitli enflamasyonlara yol açabilir. Bu nedenle zararlı kimyasalları ya kullanmamak ya da dikkatli bir şekilde uzaklaştırmak gerekmektedir. Bu noktada, kendiliğinden jelleşme tekniği çok avantajlıdır.

(2) Degredasyon

Deri yüzeyindeki yaralanmalar için kullanılan yara örtülerinde degredasyon özelliği gerekli değildir. Bazı durumlarda ise degredasyon özelliğinin bulunması tercih edilmektedir. Özellikle kronik yaralar, iç organlarda kanama olma durumu ve derin çatlaklı yaralanmalarda biyodegradasyon son derece gerekli bir özelliktir [92]. Degrade olabilen polimer yavaş yavaş fonksiyonunu elimine edecek, degredasyon ile yerini yeni dokuya bırakacaktır. Hidrojelin yaradan çıkarılması adımını ortadan kaldıran bu strateji hasta dostu bir uygulamadır. Bu uygulamada polisakkaritin degrade olma hızının kontrol edilebilmesi de önemli bir parametredir. Federico ve ark. yaptıkları bir çalışmada Poli(amido-amin) temelli hidrojelin mekanik özellikleri ve degredasyon hızını molekül ağırlığı ve akrilik ko-monomer konsantrasyonunu değiştirerek [145], Qian Xu ve ark. ise farklı alkil uzunluklarında diaminler ve polietilen glikol diakrilatlar [146] kullanarak ayarlayabildiklerini göstermişlerdir.

(3) Dayanım, esneklik ve yapışma

Hidrojelin mekanik özellikleri yaranın cinsi ve uygulama bölgesine göre belirlenmelidir. Özellikle bilek, diz ve dirsek gibi bağlantı yerlerindeki yaralanmalarda yara örtüsü el ve ayağa sarılmalıdır. Ayrıca bu bölgelerin hareketli olduğu da düşünülürse, yara bölgesi ve yara örtüsü arasında uygun bir yapışma da olmalıdır. Hidrojellerin mekanik özellikleri çapraz bağlayıcı cinsi ve konsantrasyonu değiştirilerek ayarlanabilmektedir. Yara örtülerinde malzemenin sertliği ve esnekliği arasında bir denge kurulması gerekmektedir. Bu özellikler çapraz bağlayıcı cinsi ve konsantrasyonu ile ayarlanabildiği gibi başka bir polimer veya inorganik malzeme ile etkileşime girerek de arttırılabilmektedir. Sixuan ve ark. farklı rijiditedeki poli(amidoamin)-poli(n-isopropil akrilamid) hidrojellerle yaptıkları *in vivo* çalışmalarda hidrojelin rijiditesinin yara iyileşmesi prosesinde büyüme faktörleri GF- β 1 ve bFGF'in yara ortamına salımı ve özellikle proliferasyon evresinde hücre aktivitelerini regülasyonunda etki ettiğini, aşırı yüksek veya düşük sertliğin bu etkileri

azalttığını belirlemişlerdir [147]. Xiaomeng ve ark. kullandıkları jelatin metakriol (GelMA) makromerinin konsantrasyonunu değiştirmeden sadece metakriol fonksiyonalitesini değiştirerek jelatin hidrojellerin Young modülünü 3,8 kPa'dan 29,9 kPa'a kadar çıkarmışlardır [148].

Yarayı sütür ile yapıştırmak yerine bu görevi gören hidrojeller de kullanılabilir. Böyle durumlarda hidrojin dokuya iyi yapışabilme özelliği gösterebilmesi gerekmektedir. Ancak bazı yaralanmalarda, yara örtüsünün kolaylıkla çıkarılabilmesi için sınırlı bir seviyede yapışkanlık özelliği göstermesi ya da ilk kullanılmaya başladığında yarayı iyi bir şekilde sarabilmesi için yapışkanlık özelliği yüksek iken yavaş yavaş bu yapışkanlığının azalması istenmektedir.

(4) Terapötik ajan enkapsülasyonu

Özellikle kronik yaralar için tedavi edici ajan enkapsülasyonu tedaviyi hızlandıracaktır. Bunun yanı sıra ağrı dindirici ilaçlar da hastanın acısını azaltması bakımından özellikle yanık yaralanmaları ve kanser nedeniyle oluşan yaralarda çok önemlidir.

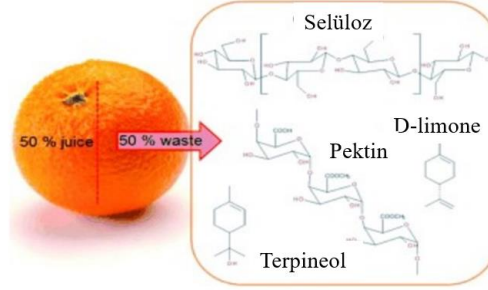
(5) Antibakteriyel aktivite

Aşırı enflamasyon sistemik enfeksiyon oluşmasına neden olacaktır. Bakteriler için enfekte olmuş yaraya yerleşip çoğalmak son derece kolaydır. Hidrojeller mikroorganizmaların yayılımı ve istilası için bir bariyer olmalarına rağmen, antibakteriyel bir ajanla birleştirilerek bu özellikleri daha da geliştirilebilir. Antioksidatif ve antibakteriyel özelliklere sahip hidrojeller yara iyileşmesini önemli oranda hızlandırmaktadırlar.

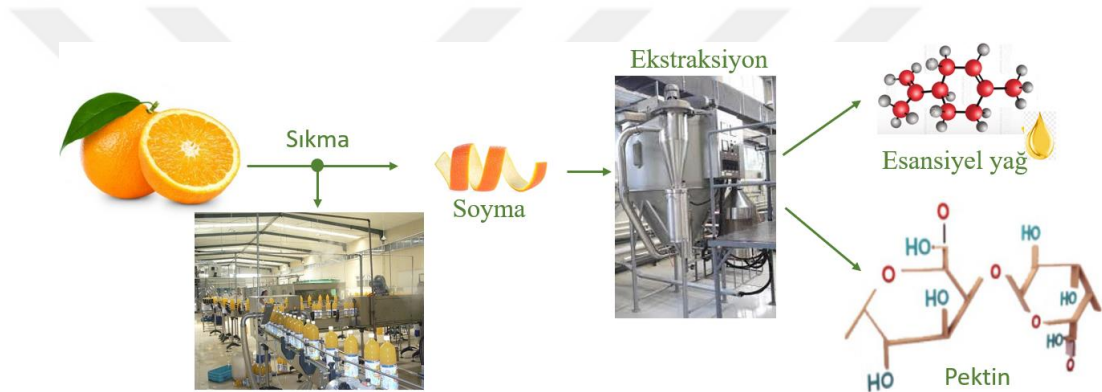
2.7 Pektin

Pektin polimeri yüksek molekül ağırlıklı (50000-150000 Dalton), sulu ortamda şişerek çözünmeyen ağ yapılı hidrojellere dönüşebilen, esnek, dallanmış lineer bir polisakkarittir. Diğer birçok bitki polisakkaritleri gibi hem polidispers hem de polimolekülerdir. Kimyasal veya enzimatik olarak ekstrakte edilebilmektedir. Bitkilerin ana hücre duvarlarının % 30'unu oluşturmalarına rağmen (Şekil 2.10), çok az bitki pektin kaynağı olarak işlenebilir. Uzun yıllardır gıda endüstrisinde özellikle kalınlaştırıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda da biyomedikal uygulamalarda umut vadeden doğal malzemelerden biri haline gelmiştir. Ticari pektinler, meyve suyu (çoğunlukla narenciye ve elma) sanayinin atık yan ürünü olarak üretilmektedir (Şekil

2.10, 2.11). Bu tez çalışmasında geliştirilecek yara örtüsünün ana matrisi olarak pektin polimeri kullanılarak, üretilcek yara örtüsünün maliyeti azaltılacağı gibi atıklar da değerlendirilecektir.

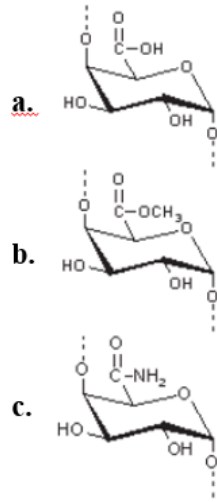


Şekil 2.10 : Pektin kaynağı olarak meyve ana hücre duvarı.



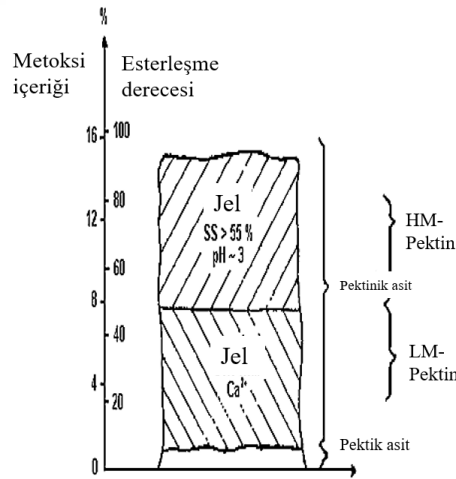
Şekil 2.11 : Pektin polimerinin meyve suyu sanayii yan/atık ürünü olarak üretimi şematik gösterimi.

Pektinin kaynağı ve izolasyon sırasındaki koşullara göre kompozisyonu değişiklik göstermektedir. Yaklaşık 200 yıl kadar önce keşfedilmiştir [149]. Galakturonik asitten (GalA) zengin homogalakturonan (HGA), rhamnogalakturonan-1 (RG-1), rhamnogalacturonan-II (RG-II), xylogalacturonan, arabinogalactan gibi farklı pektin komponentleri bulunmaktadır. Homogalakturonan, çoğunlukla metil esterlenmiş alfa-(1-4) bağlı galakturonik asit (GalA) zincirlerinden oluşmaktadır. Pektin zincirlerinin ana bileşeni olan poligalakturonik asit metoksile edilmiş ve/veya amitli kısımlar içerebilir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 : Pektin zincirlerindeki fonksiyonel gruplar. a) Karboksil
b) Ester c) Amit [150].

Poligalakturonik asit zincirlerinin esterlenmiş karboksil gruplarının esterlenmemiş olanlarına oranına esterlenme derecesi (DE) denilmektedir (Şekil 2.13). DE değerine bağlı olarak pektinler, düşük metoksi (LM için DE < % 50) ve yüksek metoksi (HM için DE > %50) olarak sınıflandırılırlar ve farklı özellikler gösterirler. DE aynı zamanda çapraz bağlanma mekanizmasını da belirlemektedir [151].

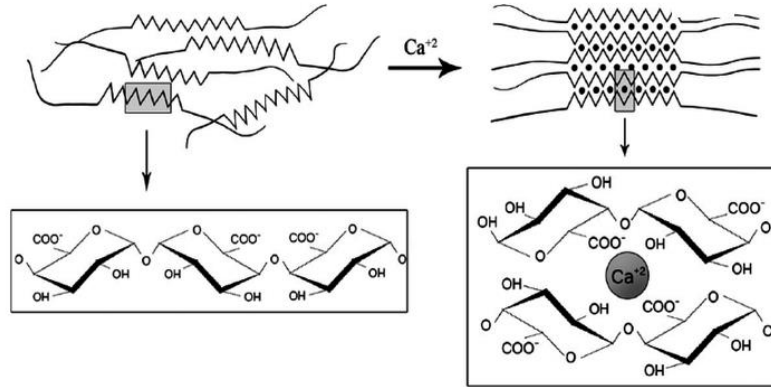


Şekil 2.13 : Pektin zincirlerinin esterleşme derecesi.

HM pektin zincirlerinde düşük pH değerlerinde her bir zincir birbirleriyle hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerle veya yüksek konsantrasyonda ko-solüt (sukroz > % 65 ağı/ağı gibi) varlığında çapraz bağlanmaktadır [152, 153]. DE arttıkça metil ester grupları arasındaki hidrofobik etkileşim de artacağından jel oluşumu daha hızlı olacaktır [153].

LM petkin zincirlerinin çapraz bağlanarak hidrojel oluşturmasına ise geniş bir pH skalasında çok valanslı (zellikle Ca^{2+} iyonu) katyonlar aracılık etmektedirler. Bu konuda detaylı bilgi **Bölüm IV ve V**'de verilecektir. Ca^{2+} iyonuna bağlı jelleşme pektin polimerinin gıda ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmasını sağlayan en önemli fonksiyonel özelliklerinden birisidir [151]. Jel oluşumuna (i) pektinin molekül ağırlığı, (ii) Ca^{2+} ile bağlanan blokların dağılımı, (iii) metilasyon derecesi gibi i faktörler ile (i) poligalakturonik asit konsantrasyonu, (ii) pH, (iii) sıcaklık ve (iv) iyonik kuvvet gibi dış faktörler önemli ölçüde etki etmektedir. Pektin zincirinde yüksek oranda GalA bulunması Ca^{2+} iyonu bağlı hidrojellerin daha yüksek stabilite, mekanik dayanım ve su tutma kapasitesine sahip olmalarını sağlamaktadır [151].

LM pektin zincirlerindeki karboksil gruplarının Ca^{2+} iyonları ile etkileşimi sonucu, şekil 2.14'te grldği gibi 'yumurta kutusu' adı verilen yapı oluşmaktadır. LM pektin zincirleri için varsayılan bu modele göre birbirlerine paralel bakan zincirlerin Ca^{2+} iyonları ile kooperatif bir iyon köprüsü oluşturması sonucu zincirler dimerize olurlar [154].



şekil 2.14 : Pektin zincirlerinin Ca^{2+} iyonlarıyla oluşturduğu 'yumurta kutusu' adı verilen modelin şematik gösterimi [155].

İlk Ca^{2+} iyonunun iki pektin zinciriyle birden bağlanması, zincirlerin birbirlerine göre hizalanmasına yardımcı olacağı için sonraki Ca^{2+} iyonlarının bağlanmasını kolaylaştıracaktır [156]. İki komşu pektin zinciri Ca^{2+} iyonu varlığında elektrostatik etkileşim ile iyon köprülerinin yanısıra van der Waals etkileşimleri ve hidrojen bağları ile de yumurta kutusu modelinin stabilizasyonuna katkıda bulunmaktadır [157, 158]. Ca^{2+} iyonlarının yanı sıra başka üç veya daha fazla valanslı katyonlar da LM pektin ile jel oluşurmada kullanılmaktadır. Ayrıca kitosan gibi pozitif yüklü polisakkaritler veya proteinlerle de çapraz bağ yaparak, anyonik polisakkaritler ile jel oluşturabilirler [159 - 161]. Pektin ve kitosan ile polielektrolit kompleks oluşumu, her ikisinin de iyonize

formda olduğu pH 3-6 aralığında gerçekleşebilmektedir. Ayrıca elektrostatik yüklerin bastırıldığı pH<2 koşulunda hidrojen bağlarının oluşumu ile de jelleşme gerçekleşebilmektedir [162]. Yumurta kutusu modeli ilk olarak pektin ile kiral yapıda olan aljinat polisakkariti için önerilmiş, ardından uzaysal benzerlikleri nedeniyle pektinin Ca^{2+} iyonu ile jelleşmesini açıklamak amacıyla modifiye edilmiştir [163].

Pektin polimeri ve Ca^{2+} iyonu gibi iki valanslı katyonlarla etkileşim sonucu elde edilen mikropartiküllü sistem, gelecek vadeden ve kullanım alanı çok geniş olan tekniklerden birisidir. İyonotropik jelleşme peptitten probiyotiklere kadar çeşitli aktif moleküllerin hedefe ve/veya kontrollü salım amacıyla enkapsülasyonu için kullanılmaktadır. Pektin ağ yapısının porozite, esneklik ve biyoaktif ajan arasındaki etkileşimini kontrol edebilmek amacıyla üç-boyutlu yapının modifikasyonu da sağlanmaktadır. Bu amaçla pektinin kimyasal modifikasyonu, organik veya inorganik katkıların sisteme eklenmesi, çapraz bağlayıcı cinsi veya konsantrasyonunu değiştirmek gibi çeşitli stratejiler uygulanmaktadır [164].

2.7.1 Biyomedikal uygulamalarda pektin temelli jeller

Uzun yıllardır gıda sanayinde kalınlaştırıcı ve stabilize edici ajan olarak kullanılan pektin jeller, basit jel oluşturma mekanizması, kolaylıkla ayarlanabilen fiziksel özellikleri, yüksek oranda su tutma kapasitesi, mukotik dokuya yapışabilmesi, biyouyumlu ve biyobozunur doğal bir polimer olması nedeniyle ilaç [164]. Bu özellikleriyle pektin, hücre [165], gen, protein [166, 167], büyüme faktörü [168] ve ilaçların [169] homojen bir şekilde yüklenebilmesi sayesinde biyomedikal uygulamalarda umut vadeden malzemelerin başında gelmektedir. Pektin jeller uygun form, konsantrasyon ve çapraz bağlayıcılar kullanılarak mikro ve nano partikül, film, kaplama malzemesi, enjekte edilebilir jeller [161, 166], nazal salım veya katı doku iskelesi [161] gibi çok çeşitli fiziksel formlarda oluşturulabilirler. Üç-boyutlu yazıcılarda basılabilmekte, yara örtüsü, kemik doku rejenerasyonu [166, 168, 170] enkapsülasyon, kontrollü [2, 171-173] ve hedefli salım [169, 174] sistemlerinde başarıyla kullanılmaktadır.

2.7.1.1 Nazal ilaç salımında pektin

Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle enjeksiyon ile uygulanamayan ve düşük molekül ağırlıklı ilaçlar, peptit ve proteinlerin hızlı salımlarını gerektiren durumlarda büyük ölçüde vaskülarize olmuş nazal yol (burun yolu) ile sistemik salıma gönderilebilecekleri belirtilmiştir [175]. Burun boşluğu aracılığıyla sistemik dolaşıma katılan ilaç molekülleri karaciğerde metabolize olmadıkları için biyoyararlılıkları da azalmamaktadır. Nazal uygulama ayrıca tabletleri yutmakta zorluk çeken hastalar için de uygundur. Hidrojen bağları sayesinde musin ile etkileşime geçerek mukotik dokuya yapışabilen pektin, nazal ilaç salımı için oldukça uygun bir polimerdir [176 - 178]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, uygun konsantrasyonda pektin ve aljinat nanopartikülleri ile deksametason [179], pektin ve hidroksipropil metilselüloz karışımının melatoninin nazal salımını [180] başarı ile gerçekleştirdiği, fentanil sitrat ile pektinin etkileşimi sonucu hazırlanan nazal spreyin kanser hastalarında özellikle radyoterapi uygulaması sonrası başlayan önüne geçilemeyen ağrıları azaltmada [181] etkili olduğu belirlenmiştir.

2.7.1.2 Kanser hedefli ilaç salımında pektin

Literatürde özellikle düşük metoksi ve düşük molekül ağırlıklı pektin fragmentlerinin başta kolon ve barsak olmak üzere kanser metastazını engellediği [182] ve çeşitli kanser tiplerinde birincil tümör büyümesini önlediğine dair çalışmalar bulunmaktadır [174- 183, 184]. Bu engelleyici etkinin pektinin galaktan komponentlerinin galektin-3 tarafından tanınması vasıtasıyla oluştuğu düşünülmektedir. Galektin-3 kanserin ilerlemesi ve metastazı, anjiojenesis ve sitotoksik ilaçlara neoplastik hücre yanıtı gibi çeşitli kanser kademelerinde rol almaktadır [185]. Özellikle limon ve portakaldan elde edilen kanser tedavisi için kullanılan sitotoksik ilaçlarla yüklü pektin polimerinin neoplastik hücre apoptosisini başlatacağı ve geleneksel kemoterapi tedavisinin verimliliğini arttıracığı düşünülmektedir [182].

2.7.1.3 Doku mühendisliğinde pektin jeller

Doğal polimerler, doku rejenerasyonunu sağlamak amacıyla çeşitli hücre fonksiyonlarını uyarmak ve hücre-hücre etkileşimlerini yönlendirmek için, çoğunlukla büyüme faktörleri ile yüklenerek yapı iskelesi olarak kullanılmaktadırlar [186]. Pektin hidrojel hücrelere karşı çok yapışkan olmadığı için doku rejenerasyonu için yaygın olarak kullanılmamaktadır. Ancak özellikle kemik-doku mühendisliği

uygulamalarında uygun fizyolojik koşullar sağlandığında mineral fazın çekirdeklenmesini sağladığı için umut vaatetmektedir [166]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, biyoaktif seramik-pektin hidrojel nano boyutta kemik dokusuna benzerliği nedeniyle kullanılmış ve hücre yapışması ve yayılımını desteklediği belirlenmiştir [170].

2.7.1.4 Üç- boyutlu baskı tekniğinde pektin jeller

Üç-boyutlu baskı tekniği şekil ve porozite gibi spesifik yapısal özellikler sağlaması kabiliyeti nedeniyle köklü atılım yapacak bir teknoloji olarak öne çıkmaktadır. Bu teknoloji, ekstrüzyon (doğrudan mürekkeple yazma), mürekkep püskürtmeli ve isteğe bağlı bırakma sistemleri gibi çeşitli teknikleri içermektedir. Burada en önemli faktör biyomürekkebin basılabilme ayarlarının geliştirilebilmesidir [187]. Biyomürekkepler, üç-boyutlu baskı kullanarak tasarlanmış/ yapay canlı doku üretmek için kullanılan malzemelerdir. Üç-boyutlu biyobaskı tekniği son zamanlarda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında, *in vitro* doku iskelesi üretmek için en umut vadeci tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir [188]. Alexandra ve ark. çok yakın zamanda yaptıkları bir çalışmada üç-boyutlu baskı tekniği ile pektin-selüloz temelli bir biyomürekkep geliştirmişlerdir. Bu hidrojellerin reolojik özelliklerini şırınga iğneleri ile enjekte edilebilecek şekilde ayarlamışlardır. Pektin konsantrasyonu arttıkça sertlikte artış belirlenmiştir [187]. Jingjunjiao Long ve ark. termosensitif yara örtüsü olarak kullanılmak amaçlı lidokain hidroklorid yüklü kitosan-pektin karışımı başarılı bir şekilde üç-boyutlu baskı tekniği ile hazırlayıp, liyofilize etmişlerdir. Elde edilen malzeme ilacı hızlı ancak kontrollü bir şekilde salmıştır [189]. Lapomarda ve ark. (3-glicidiloksisilanol) trimetoksisilan (GPTMS) kullanarak pektin zincirlerini çapraz bağlamış ve üç-boyutlu baskı tekniğini kullanarak biyomalzeme üretmişlerdir [190]. GPTMS kullanılması sayesinde herhangi bir destek kullanmadan farklı anatomik şekillerde üç-boyutlu baskı ile doku iskeleleri üretebilmişlerdir. Gao ve ark. [191] jelatin ve Tallia ve ark. [192] politetrahidrofuron/polikaprolaktam karışımına GPTMS eklenmesinin malzemenin üç-boyutlu basılabilme yeteneğini önemli oranda arttırdığını belirlemişlerdir [190].

2.7.1.5 Yara örtüsünde pektin jeller

Pektin ve pektin türevi malzemeler yara iyileşmesi uygulamaları için son derece uygundur [193]. Pektin gibi çeşitli doğal ve biyoyumlu hidrofilik polisakkaritler

günümüzde doğal yapışkanlık, nemli ortam sağlama ve iyileşme prosesini uyarma kabiliyetleri nedeniyle yara örtüsü olarak kullanılmaktadır [194 - 196]. Yüksek su içeriği deri ile uyumlu olmasını sağlamaktadır. Pektin jel yara sıvısı ile temas ettiğinde havaya karşı geçirgen olurken, çözünmesi ile oluşan asidik ortam bakteri ve virüslere karşı geçirimsiz bir bariyer sağlayarak yara iyileşmesini hızlandırmaktadır [194]. Bir yara iyileşirken, etraftaki hücreler, yarada yayılmak (prolifere olmak) ve büyümek için büyüme faktörleri tarafından stimüle edilirler. Pektin yaraya eklendiğinde, bir bağlanma ajanı gibi davranır ve büyüme faktörlerini parçalanmaktan korur [197]. Hidrofilik pektin partikülleri yara sıvısı ile temas ettiğinde yara üstüne yumuşak bir jel oluşturarak fazla eksudayı adsorblamaktadır. Pektin zincirlerindeki esterlenmiş galakturonik asit kalıntıları, inflamasyon prosesindeki en önemli iki enzim olan iNOS ve COX-2 gibi enzimlerin salgılanmasını bastırarak kuvvetli bir anti-enflamasyon etki sağlamaktadırlar [198 - 200]. Bu yüksek anti-enflamasyon etki özellikle yanık ve diyabet yaraları için çok önemli bir özelliktir. Pektin türevleri, pozitif amin ve/veya negatif karboksil grupları olmak üzere yüksek yük yoğunluğuna sahiptir ve derinin derinliklerine nüfuz edebilir, böylece ilacın deride kalış süresini uzatarak, penetrasyonu zenginleştirir [30]. Pektin zincirleri özellikle geç iyileşen yaralarda etkili olan oksidatif stresi düşüren anti-glikoliz ajanı olarak da davranmaktadır.

LM-pektinin pH 3,5 civarındaki pKa değeri, ilaç moleküllerinin bu pH değerinin üstünde kolaylıkla salınabilmesini sağlamaktadır [201]. Yaralı eksuda pH değeri yaklaşık pH 7,15–8,90 [202] aralığında olduğundan, yaralı dokuda kullanımı özellikle bu pH değerlerinde yük yoğunluğu az olan kitosan gibi katyonik polimerlere göre çok daha avantajlıdır. Bunun yanı sıra, bakterilere karşı bariyer oluşturabilecek asidik bir ortam oluşturma, yüksek mukoadhezyon ve aynı zamanda eksudadaki biyoaktif ajanlarla bağlanarak yara sıvısını kontrol edebilme [162] gibi özellikleri, pektini yara tedavisinde öne çıkaran diğer özellikleridir.

Pektin-kolajen [203], okside pektin –jelatin [193], pektin-kitosan [159, 199, 204, 205], pektin-aljinat [196] jelleri ile yapılmış yara örtüsü çalışmalarından başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bunun yanı sıra pektin hidrojelatin antibiyotik, ağrı kesici [172, 189, 206] büyüme faktörü [207, 208] gibi yara iyileşmesi ve doku onarımı için gerekli ajanları başarılı bir şekilde taşıdığı rapor edilmiştir. Pektin filmler düşük termal stabilite ve mekanik özellik göstermeleri nedeniyle, genellikle bu özelliklerini geliştirmek için başka bir polimer ile karıştırılırlar.

2.8 Kontrollü Salım

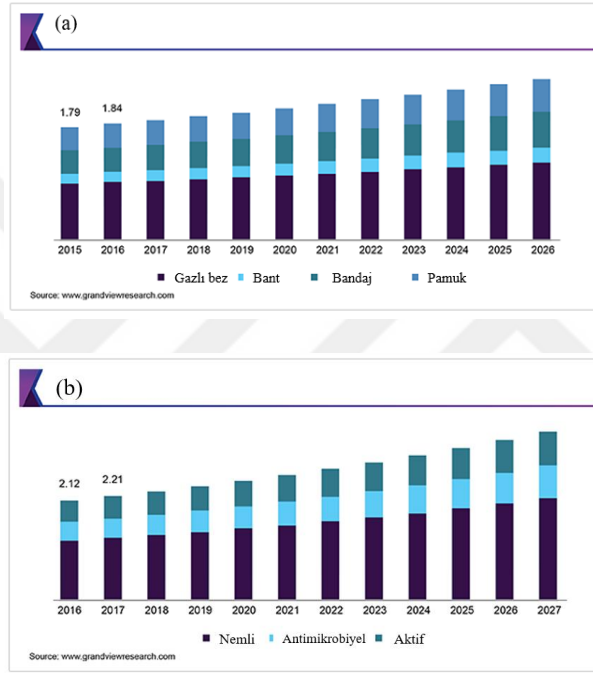
Kontrollü salım sistemlerinin amacı ilacı, vücutta istenilen bölgeye, tedavi için gerekli hız ve miktarda verilmesini sağlamaktır. Kontrollü ilaç salım sistemleri öncelikli olarak ilacın biyoyararlılığını ve hastanın konforunu arttırmayı hedeflemektedir. Bu sistemler vasıtasıyla ilaç bir polimer ya da lipid sistem içine hapsedilerek, ilaç bozunması ve kaybı azaltılmakta, hedef bölgedeki ilaç birikimi istenilen dozda tutulabilmekte, öte yandan hasta olmayan dokulardaki toksik etkiler azaltılmaktadır [209, 210]. Bütün bu avantajlarına karşın kontrollü ilaç salım ile ilgili yara örtüsü çalışmaları henüz gelişme aşamasındadır. Bu alandaki ilk ticari ürün Spansules® adlı üründür.

Kontrollü salım sistemleri membrana difüzyon ve matrise difüzyon olmak üzere iki farklı metot ile gerçekleştirilebilmektedir. Membran sistemlerde ilaç toz halde veya bir sıvıda disperse olmuş şekilde çekirdek/ membran bölüme hapsedilmiştir. İlacın salımı bu membran tarafından yönetilmektedir [211]. Matriks sistemlerde ise ilaç, polimer bir yapı içinde dağıtılmıştır. Bu sistemlerde ilacın salım hızını polimer matriks denetlemektedir [212]. İlacın polimer sistemden salımı temelde 4 farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir: (i) İlacın sistemden difüzyonu, (ii) sistemin şişmesi veya ozmoz yoluyla ilacın salımı, (iii) kimyasal ya da enzimatik bir reaksiyon sonucunda sistemin bozunarak ilacın salımı, (iv) fizyolojik bir gereksinime cevap olarak salım. Bazı durumlarda bu mekanizmaların kombinasyonu gerçekleşmektedir.

2.9 Dünyada ve Türkiye’de Yara Örtüsü Pazarı

Yara örtüsü pazarı, geleneksel örtüler ve gelişmiş örtüler olmak üzere iki ayrı segment altında incelenmektedir [213]. Yara örtülerine artan ihtiyaç, trafik kazalarındaki artış, ayaktan cerrahi merkezleri sayısındaki artış, hastanede kalış süresine olan ihtiyacın azalması, cerrahi prosedürlerin artışı ve kronik hastalıkların artışı nedeniyle oluşmaktadır. Kronik yaraların Amerika Birleşik Devletleri’ndeki ortalama yıllık ekonomik yükü 50 milyar \$ olarak rapor edilmiştir [214 - 216]. Şekil 2.15’te ABD temel alınarak hazırlanan geleneksel ve gelişmiş yara bakım ürünleri eğilim grafikleri görülmektedir. Küresel ölçekte geleneksel yara tedavisi pazar büyüklüğü 2018’de 5,43 milyar ABD doları olarak değerlendirilmiş ve 2019’dan 2026’ya bileşik yıllık büyüme oranında %3,6 oranında büyüme beklenmektedir. Özellikle dünya çapında artan trafik kazalarının pazar büyümesini artırması beklenmektedir. Örneğin, Dünya Sağlık

Örgütü'nün (WHO) 2018 Yol Güvenliği Küresel Durum Raporu'na göre, karayolu kazaları, 5-29 yaş arası çocuklar ve genç yetişkinler arasında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir. Modern, gelişmiş yara örtüleri pazarı 2019 yılında 6,24 milyar dolara yükselmiştir ve % 5,2 yıllık büyüme hızı beklenmektedir. ABD Ulusal Sağlık Enstitüleri'ne (NIH) göre, kronik yaralar ABD'de her yıl yaklaşık 6,5 milyon kişiyi etkilemekte, bu hastaların tedavileri için yılda 25 milyar ABD dolarından fazla harcanmaktadır.



Şekil 2.15 : ABD geleneksel yara iyileşmesi pazar büyüklüğü yan ürünler
(a) geleneksel yara örtüleri (b) gelişmiş yara örtüleri.

Gelişmiş yara bakım ürünlerinin, kronik yaraların yanı sıra akut vakalarda da büyük ölçüde pansuman yapmak ve kazadan kaynaklanan yaralanmaların hızlı iyileşmesi için kullanılmaya başlanması beklenmektedir. Bu nedenle, önümüzdeki yıllarda bu ürünlerin pazar payının artacağı düşünülmektedir. Akut yara segmenti 2019 yılında yanık yaraları, travma ve cerrahi operasyonların artışı sonucu en yüksek pazar payına sahip olmuştur. DSÖ'ye göre her yıl yaklaşık 180,000 ölüm vakası yanık yaralanmalarından dolayı oluşmaktadır. Özellikle diyabet gibi kronik hastalıkların ve yaşlı nüfusun artışının bu segmentin artışındaki payı büyüktür.

Yara örtüsü pazarında faaliyet gösteren kilit firmalar arasında Smith & Nephew PLC acquired Osiris Therapeutics, Inc., Kinetic Concepts, 3M, BSN medical, Covidien,

ConvaTech, Derma Sciences, Integra LifeSciences, Baxter International ve Coloplast sayılabilir.

Yara örtüsü pazarının büyümesine etki eden faktörler aşağıdaki gibi listelenebilir;

1) Artan kronik yaralar ve diyabet, hızla yaşlanan nüfus ve malzeme bilimindeki gelişmeler pazardaki büyümeyi yönlendirmektedir. Arteriyel ve diyabetik ayak ülserleri gibi bacak ülserlerinin başlıca nedeni olan diyabetin artan prevalansı, Dünya çapında yara pansuman pazarını besleyen başlıca faktördür.

2) Hemşireler, doktorlar ve hastalar arasında gelişmiş yara pansumanına ilişkin artan farkındalık pazardaki büyümeyi desteklemektedir.

3) Yatağa bağımlı olan ve uzun süreli hareketsizliklerinden dolayı basınç ülseri geliştirmeye yüksek derecede duyarlı olan hastalarının pazar büyümesine en büyük katkı sağlayanlardan biri olması beklenmektedir.

Yara örtüsü pazar büyümesini sınırlayan faktörler ise şu şekildedir:

1) Gelişmiş yara bakım örtülerinin çok yüksek maliyetli olması. Ülkemiz açısından bakıldığında ise, artan döviz kuruna bağımlılık maliyetin artarak yükselmesine neden olmaktadır.

2) Yeni teknolojiler için yüksek geri ödeme, pazar büyümesini sınırlayan bir faktördür.

T.C. Kalkınma Bakanlığı Onuncu Kalkınma Planı (2014-2018) tarafından hazırlanan ‘Tıbbi Cihaz ve Tıbbi Malzeme’ çalışma grubu raporuna göre, gelişmiş yara örtüleri ülkemizde üretim şansı olduğu düşünülen tıbbi cihazlardan kabul edilmiştir [217].

3. MOLEKÜLER MODELLEME VE SİMÜLASYON YÖNTEMLERİ

Hesaplamalı kimya temel olarak Moleküler Dinamik (MD) ve Kuantum Mekanik (QM) olarak iki ana yaklaşıma dayanmaktadır. Moleküler modelleme ile MD veya QM yaklaşımları aracılığı ile termokimyasal ve kinetik hesaplamalar, adsorban-adsorbent sistemleri, ilaç tasarımı ve malzeme tasarımı yapılabilmektedir [218]. Bu yaklaşımlar en genel ifade ile “bir molekülün davranışı atomlarının davranışı ile açıklanabilir ve bu da atomik bileşenlerinin davranışına karşılık gelmektedir” şeklinde tasvir edilebilir.

MD simülasyonu çalışmaları 1950’lerin sonlarından itibaren gelişmeye başlamıştır. İlk MD protein simülasyonu 1977 yılında McCammon ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir [219]. Biyolojik makromoleküllerin incelenmesi için çok yönlü ve yaygın olarak kullanılan tekniklerinden en önemlisi olan MD simülasyonları, günümüzde farmasotik çalışmalarında önemli bir rol oynamaktadır [220, 221]. Bir sistemdeki farklı zaman aralıklarındaki konformasyonel değişimler gibi dinamik davranışları anlamak için çok değerlidir. Bu *in silico* simülasyon sonuçları, *in vitro* deneyler ile ölçümü zor olan bazı mikroyapısal değişimleri açıklığa kavuşturmaktadır. Yapılan simülasyon çalışmalarının uygun modeller kullanıldığı takdirde gerçek deneylere yakın sonuçlar verdiği görülmüştür. Böylece *in vitro* deneylerde uygun olmayan koşullar elenerek yeni ilaç/malzeme adayları klasik yöntemlerle kıyaslandığında çok daha hızlı ve düşük maliyetli bir şekilde elde edilebilmektedir [219]. Büyük makromoleküler sistemlerin modellenmesinde atomistik yöntemlerin uzun bir başarı geçmişi bulunmaktadır. *Ab-initio* yöntemlerin daha basitleştirilerek büyük sistemler için kullanılır hale getirildiği yarı-empirik moleküler mekanik yöntemler ile tayin edildiği protein ve karbonhidratlar gibi binlerce atomu olan büyük sistemlerde, atomların pozisyon ve hızlarının kullanılarak sistem dinamiği milisaniye seviyelerine dek incelenebilmektedir.

MD simülasyonları davranışları kovalent olmayan etkileşimlere bağlı olan sistemler için son derece uygundur. Özellikle sıcaklık, basınç, ve konsantrasyona bağlı koşullardaki polimer zincir konformasyonunun incelendiği sistemler için deneysel

Çalışmalardan önce atomistik simülasyonlar ile sistemi incelemek hem deneyleri önceden tasarlamak hem de deney sonuçlarını doğru yorumlamak için önemli bilgiler sağlar. Atomistik model ile gerçekleştirilen simülasyonlar;

- (i) bilinen bir morfolojideki spesifik atom seviyesindeki etkileşimler,
- (ii) zincir içindeki moleküller arası etkileşimler veya zincir ve solvent/katkı/iyon arasındaki etkileşimler,
- (iii) birbiri ile bağlanan veya kompleks oluşturan iki polimer arasındaki etkileşimlerin çalışıldığı sistemler için oldukça uygundur.

Atomistik MD simülasyonları aracılığı ile bir sistem içindeki monomer seviyesindeki dalgalanmalar veya monomer-monomer etkileşimleri incelenebilmektedir [222, 223]. Bunun yanısıra bir polimer kompozit içindeki spesifik bir nanopartikül yakınında monomerlerin ve segmentlerin nasıl düzenlendiğini gösterebilmektedir [224, 225]. Atomistik model, polimer membranların porlarına gaz veya küçük moleküllerin çözünürlük, adsorbsiyon, difüzyon çalışmaları için de kullanılmaktadır [226]. Yüklü makromoleküler sistemlerde elektrostatik etkileşimler ve/veya entropi itici güç olmaktadır. Bu gibi durumlarda atomistik yaklaşım, karşıt iyonların neden ve nasıl yüklü polimerle etkileşime girdiğini ve yüklü parçacıkların konformasyonel değişimlerini irdeleyebildiği için kullanılışlıdır [226, 227]. Polimer malzemelerle atomistik yaklaşım metotları kullanılarak başlıca makromoleküler dinamik [228], polimer/kil nanokompozitleri [229], ara yüzey kimyası, polimer membranlar [230], kristal yapılar, difüzyon olayları, ayırma prosesleri, tribolojik özellikler ve çatlak (crack) gelişimi [231], ince filmler ve yüzeyler, likit kristalin polimerler, polimerik sistemlerin reolojisi [232], polimer degradasyonu [233], hidrojel yapılar [234], peptit ve proteinler [235], kontrollü ilaç salımı [173, 235, 236], virüsü tanıma, ilaç ve açı geliştirme [237, 238] üzerinde çalışılmaktadır.

Atomik ölçekte yapılan polimer sistemleri simülasyonlar temelde iki ana yaklaşım ile gerçekleştirilmektedir:

1. Olasılık yaklaşımı (Monte Carlo - MC)
2. Deterministik yaklaşım (Moleküler Dinamik - MD)

Diğer yöntemlerin çoğu, bu yaklaşımlar üzerinden oluşturulmuş melez metotlardır [239].

3.1 Monte Carlo Simülasyonları

Monte Carlo (MC) yöntemleri belirli dağılım fonksiyonlarını değerlendirmek veya Newton hareket eşitliğini ilgili integral formunda çözmek için kullanılmaktadır. MC yöntemi, 1950’li yılların başlarında rastgele gelişen durumları incelemek üzerine yapılan çalışmalar sonucu Nicholas Constantine Metropolis ve ark. tarafından ortaya atılmıştır [240]. Temelinde yatan rastgelelik nedeniyle sistemlere ait konfigürasyonel uzay çok etkili bir şekilde taranabilmektedir.

3.2 Moleküler Dinamik Simülasyonları

Deterministik yaklaşım kullanılan MD yönteminin doğuşu MC yönteminden daha sonra olmasına rağmen, dayandığı temel prensip çok daha eski olan Newton hareket kanunudur [218]. Fransız Matematikçi Laplace 1814 yılında yayınladığı makalesinde “Evrendeki en büyük varlıklardan en küçük atomlara kadar her şeyi hesaba katarak bir hesap yapılırsa, hiçbir şey belirsiz değildir.” şeklindeki “Laplace’ın şeytanı” olarak bilinen yorumu deterministik yaklaşımların amacını özetlemektedir. MD yöntemleri 1950’lerin sonunda ilk önce asil gaz moleküllerinin simülasyonları için kullanılmıştır. Daha sonra teknolojinin gelişmesiyle daha büyük sistemler daha geniş zaman dilimlerinde çalışılmaya başlanmıştır. Günümüzde, malzeme ve biyomolekül modellenmesi için MD simülasyonları oldukça yoğun olarak kullanılmaktadır [241].

MD simülasyonları karbonhidratlar, protein ve nükleik asit gibi makromoleküllerin zamana bağlı dalgalanmaları ve konformasyonel değişikliklerini hesaplayan en önemli araçlardan birisidir [242]. Biyolojik sistemlerde özellikle protein stabilitesi, dinamik prosesler, protein katlanması ve iyon transportu gibi karmaşık mekanizmalar araştırılmaktadır [243]. Bu yöntem aynı zamanda farmasotik teknolojilerde akademik ve endüstriyel sahada yeni ilaç sistemlerinin geliştirilmesinde rutin yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir [244].

MD simülasyonları sistemdeki parçacıkların mikro seviyedeki pozisyon ve hızlarını inceleyerek makro seviyedeki yapı ve davranışları hakkında veri üretmektedir [242].

Sistemin mikroskobik seviyede incelenmesinin en önemli katkıları;

- (i) deneysel verileri anlama ve yorumlama,
- (ii) deneysel verileri yarı kantitatif metotlar ile tahmin etme,

(iii) deneysel verileri labaratuvar ortamında üretilemeyecek olan durumlar için interpolasyon veya ekstrapolasyon yapabilme olanağı sağlamasıdır.

Mikroskobik davranış ile makroskobik özellikler arasındaki bağlantı istatistik mekaniği yaklaşımıyla topluluk ortalaması kullanılarak yapılmaktadır[245]. Bir sistemin termodinamik durumu, o sistemin sıcaklık (T), basınç (P), parçacık sayısı (N) gibi özellikleri yardımıyla belirlenmektedir. Sistemin durumu hakkında bilgi ise atomik konum (q) ve momentum (p) yardımıyla belirlenmektedir. MD simülasyonlarında makroskobik ve termodinamik özellikleri eşit olup, mikroskobik özellikleri farklı olan sistemler topluluk (ensemble) olarak adlandırılmaktadır. Bu topluluklar sistemin bulunduğu koşullara göre değişiklik göstermektedir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 : Simülasyonlarda en çok kullanılan topluluklar [246].

Topluluk adı	Sabit tutulan termodinamik özellikler	Ayrırma fonksiyonu (Z)	Pi
Mikrokanonik	N, V, E	$\sum_i \delta(E_i - E)$	$\frac{\delta(E_i - E)}{Z_{NVE}}$
Kanonik	N, V, T	$\sum_i e^{-\beta E_i(N,V)}$	$\frac{e^{-\beta E_i(N,V)}}{Z_{NVT}}$
Grand kanonik	V, T, μ	$\sum_i e^{\beta N \mu} Z_{NVT}$	$\frac{e^{-\beta(E_i - \mu N)}}{Z_{VT\mu}}$
İzotermal-isobarik	N, P, T	$\sum_i e^{\beta p V_i} Z_{NVT}$	$\frac{e^{-\beta(E + P V_i)}}{Z_{NPT}}$

Atomik seviyedeki N-cisim problemini klasik fizik yaklaşımı altında nümerik olarak çözmektedir [247, 248]. Bu yaklaşımda sistemin atomlarının hareketlerinin atom çekirdeklerinin hareketi ile açıklandığı, atom ve moleküllerin hareketleri ve

etkileşimlerinin Newton fiziğine göre çalıştığı yaklaşım referans alınmaktadır [244, 248].

$$m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = F_i(t), \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (3.1)$$

Burada m_i , i . atomun kütlesi, r_i , i . atomun uzaysal koordinatları (genellikle Kartezyen koordinatlar alınır), F_i i . atoma uygulanan net kuvvettir. Net kuvvet potansiyel enerji $U(r)$ 'nin koordinatlara göre birinci türevinin tersi olarak da hesaplanabilir.

Sistemde birbiri ile kovalent ya da kovalent bağ yapmayan atomlar için Newton hareket eşitliliği sayısal yöntemle entegre edilir, atomların ve moleküllerin gezingeleri oluşturulur [249]. Nümerik entegrasyon için en yaygın olarak Verlet (velocity Verlet) algoritması kullanılmaktadır. Burada temel fikir, birim süredeki konumlara üçüncü dereceden Taylor açılımlarını $r(t)$ uygulamaktır. Newton hareket denkleminde ivme $a(t)$, kuvvetin kütleye oranı, kuvvet ise konumların $r(t)$ bir fonksiyonudur. Buna göre hızları v , ivmeleri a olarak ve r 'nin t 'ye göre üçüncü türevlerini;

$$\begin{aligned} r(t + \Delta t) &= r(t) + \frac{dr}{dt} \Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2 r}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \\ r(t - \Delta t) &= r(t) - \frac{dr}{dt} \Delta t + \frac{1}{2!} \frac{d^2 r}{dt^2} \Delta t^2 + \dots \end{aligned} \quad (3.2)$$

Denklem 3.2'deki iki eşitlik toplanıp düzenlendiğinde aşağıdaki eşitlik oluşacaktır:

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + \frac{1}{2!} \frac{d^2 r}{dt^2} \Delta t^2 \quad (3.3)$$

Oluşan bu denklem (Denklem 3.3) Verlet algoritmasının temel ifadesidir. Bu denklem yardımıyla moleküllerin hızlarını hesaplamadan pozisyonları belirlenebilir [250]. Kolaylıkla uygulanabilen Verlet algoritması aynı zamanda uzun zaman adımları boyunca enerjiyi koruyabilmektedir.

MD simülasyonlarında algoritmayı başlatmak için daima konum ve hızlara ihtiyaç duyulmaktadır. Atomların konumları bir koordinat sisteminde belirtildikten sonra, başlangıç hızları belirlenen belli bir sıcaklık değeri için genellikle Maxwell-Boltzmann

hız dağılımı yardımıyla hesaplanmaktadır. Seçilen bu başlangıç konfigürasyonları çok büyük olasılıkla denge durumuna karşılık gelmemektedir. Bu nedenle uygun zaman aralıkları seçilerek sistem dengeye getirilmeye çalışılır. Zaman adımı simülasyonun gerçek zamanını belirlemektedir. Zaman aralığı hareket eşitliğinin hesaplanmasında kullanıldığı için, yanlış zaman aralığı seçimi özellikle momentum eşitliğinin korunmasında problem oluşturacaktır. Atomik seviye için 1 veya 2 femtosaniye zaman aralığı en başarılı sonuçları vermektedir.

Atomistik detayların gerekli olduğu ancak hidrojen atomlarının açık bir şekilde gösterilmesine gerek olmayan durumlarda, hidrojenin çok yüksek frekanstaki hareketinden dolayı küçük alınması gereken zaman adımı süresini arttırabilmek için birleşik atom modeli sıklıkla tercih edilmektedir. Bu durumda hidrojen atomları açık şekilde gösterilmez ancak kütle ve sahip oldukları pozisyon bağlı olduğu daha ağır bir atom üstünden temsil edilir [218]. Bu şekilde hesaplamalı verimlilik artırılır. Bir başka yaklaşım olan SHAKE algoritması ile ise hidrojenlerin bağ uzunlukları sabit tutulur ve zaman adımı bu şekilde 2 fs olarak alınır.

Hesaplamalar esnasında atomlara diğer atomlar tarafından uygulanan kuvvetlerin tanımlandığı, kuvvet alanı olarak adlandırılan atomlar arası mekanik kuvvetlere gereksinim vardır.

3.3 Kuvvet Alanı

Moleküler mekanikte kullanılan kuvvet alanları sistemdeki parçacıkların potansiyel enerjilerini tanımlamak amacıyla kullanılan bir dizi parametredir. Atomik etkileşimlerin temelini oluşturan fiziksel etkiler kuvvet alanı ya da potansiyel enerji fonksiyonu olarak adlandırılan bu parametreleştirilmiş skaler enerji fonksiyonu yardımıyla tanımlanmaktadır [251, 252]. Kuvvet alanı kullanmanın en büyük avantajı QM'e göre atomların ve moleküllerin davranışlarını ortaya çıkarmak için kullanılan hesaplamaları büyük oranda hızlandırmaktır.

Kuvvet alanları genellikle;

- (i) kütle,
- (ii) kısmi yükler,
- (iii) bağ titreşimleri, açılı bükülmesi ve dihedral açılarının değişimi gibi bağlı etkileşimler,

(iv) elektrostatik ve van der Waals etkileşimler olarak hesaplanan, molekül içi ve moleküller arası uzun mesafeli, bağlı olmayan etkileşimleri dikkate almaktadır (Eşitlik 3.4) [251].

Moleküller arası elektrostatik etkileşimler, çekirdeklerin etrafındaki elektronik dağılımın heterojen olmasından kaynaklanmaktadır ve her etkileşim bölgesine nokta yükleri atayarak hesaplanmaktadır. van der Waals etkileşimler ise çekici ve itici güçlerden oluşmaktadır. van der Waals etkileşimleri 6/12 Lennard Jones potansiyeli, elektrostatik etkileşimler ise Coulomb potansiyeli ile tasvir edilir [253]. Kuvvet alanları genellikle Denklem 3.4'te belirtildiği gibi bağlı ve bağlı olmayan enerjilerin katkılarını içermektedir.

$$E_{total} = E_{bağ \text{ içermeyen etkileşimler}} + E_{bağlı etkileşimler} \quad (3.4)$$

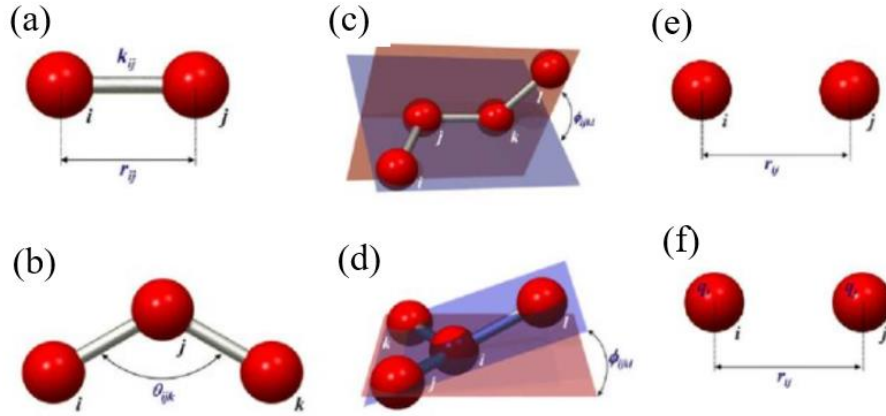
Burada $E_{bağ \text{ içermeyen etkileşimler}}$ bağ içermeyen, $E_{bağlı etkileşimler}$ ise kovalent bağlı etkileşimleri ifade etmektedir. Bağ içermeyen etkileşimler elektrostatik ve van der Waals etkileşimleri olarak iki alt bölüme (eşitlik 3.5),

$$E_{bağ \text{ içermeyen etkileşimler}} = E_{elektrostatik} + E_{vdw} \quad (3.5)$$

bağlı etkileşimler ise bağ, bükülme, dihedral ve çapraz (bağ-bağ ve bağ-açı-bağ) etkileşimlerini içermektedir.

$$E_{bağlı etkileşimler} = E_{bağ} + E_{bükülme} + E_{dihedral} + E_{çapraz} \quad (3.6)$$

üzerinden enerjetik terimler hesaplanmaktadır. Şekil 3.1'de atomların arasındaki kovalent olan $E_{bağ}$, $E_{bükülme}$, $E_{dihedral}$, $E_{çapraz}$ (Şekil 3.1 (a)-(d)) ve kovalent olmayan bağlar E_{vdw} ve $E_{elektrostatik}$ (Şekil 3.1 (e) ve (f)) etkileşimleri küresel olarak tasvir edilen atomlar arasında şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1 : Bağ içeren ve içermeyen etkileşimler (a) kovalent bağ, (b) bağlı açı, (c) dihedral açı (d) çapraz terim (e) uzun mesafe van der Waals (f) elektrostatik etkileşimlerin şematik gösterimi.

Moleküler simülasyonların öngörü gücünü geliştirmek amacıyla özellikle kırk yılı aşkın süredir biyomoleküler kuvvet alanı geliştirme çalışmaları devam etmektedir. Literatürde hem genel kullanımlar için hem de nükleik asitler, lipid membranlar ve karbonhidratlar gibi farklı kategorideki moleküller için uyarlanmış kuvvet alanları mevcuttur. Hesaplamalardan elde edilen sonuçların güvenilirliği büyük ölçüde kuvvet alanının parametreleştirilmesine ve doğruluğuna bağlı olduğundan, kullanılan sisteme en uygun kuvvet alanının seçimi esastır. Günümüzde, biyomoleküler simülasyonlarda AMBER [254], OPLS [255], GROMACS [256], CFF [257] ve CHARMM [258] gibi kuvvet alanları sıklıkla kullanılmaktadır. Büyük yapıların yanı sıra küçük organik moleküller için ise spesifik parametrizasyonlar ayrıca tedarik edilmelidir. Küçük moleküller için son derece zahmetli uğraşlar ve hataya açık prosedür sonucu AMBER kuvvet alanı için GAFF [259], CHARMM için CGenFF [260] gibi spesifik parametrizasyon setleri geliştirilmiştir.

3.3.1 Karbonhidratlar için en yaygın kullanılan kuvvet alanları

Polisakkarit karbonhidratlar, birbiri ile glikoliz bağı ile bağlanmış monosakarit birimlerinden oluşmaktadır. Enerji depolama, moleküler taşınım, yapı iskelesi ve moleküler tanımlamada önemli rolleri bulunmaktadır. Polisakkarit içeren biyomoleküllerin moleküler mekanik kuvvet alanlarının en doğru şekilde tanımlanması için yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır [261]. Yakın zamanlarda yüksek kaliteli deney verileri elde edilebilmesi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını alanındaki gelişmeler ve aynı zamanda model sistemlerde

çok çeşitli konformasyonel enerji dağılımının oluşturulmasının karbonhidrat kuvvet alanlarının (CarbFF) geliştirilmesinde büyük katkıları olmuştur [261, 262]. Bilgi işlem kaynaklarının artan kullanılabilirliği ile de çoğunlukla glikoz ve onun diastereomerlerine odaklanılarak karbonhidratların yapısal enerjisi yakalanmaya çalışılmıştır. Böylece karbonhidratların protein ve lipidler gibi diğer biyomoleküller ile etkileşiminin fiziksel temelini anlaşılmaya da izin verecek olan atomik seviyede detaylı incelemesi yapılabilmektedir [263].

Karbonhidratlar için kuvvet alanı geliştirirken bağlarının kuvvetli şekilde polar olması, anomerik etki, birçoğunun hem lineer hem de farklı yönlerden dallanmış oligosakkaritlerden oluşmuş olmaları, bağlantı bölgelerinin çokluğu gibi bir dizi zorlukla karşılaşmaktadır [264].

Karbonhidrat kuvvet alanları en genel şekilde tasarım felsefelerine göre kategorize edilebilirler. CHARMM, GLYCAM, GROMOS, OPLS gibi birçok kuvvet alanı büyük biyolojik sistemleri modellemek ve simüle etmek için geliştirilmişlerdir. TRIPOS, MM3, MM4 gibi diğer bir grup ise geniş bir grup organik molekülleri temsil etmekte ve karbonhidratların üç boyutlu modellenmesi için kullanılabilmektedir [264, 265]. CHARMM36, GLYCAM06, GROMOS ve OPLS-AA-SEI kuvvet alanları karbonhidrat ve gliko-konjuge moleküller için en yaygın kullanılan kuvvet alanlarından [266].

Bu tez çalışmasının **4. bölümünde** yapılan MD çalışmalarında **PCFF** [267], **6. bölümünde** ise **CHARMM36** kuvvet alanı kullanılmıştır. Her iki kuvvet alanı da biyolojik moleküller için geliştirilmiş kuvvet alanlarından [266]. CFF (Consistent Force Field) ailesinin temeli Warshel ve Lifson'un 1968 ve 1970 yıllarındaki çalışmalarına dayanmaktadır. CFF kuvvet alanlarından birisi olan PCFF (Polimer CFF) en çok kullanılan polimerlerin fonksiyonel gruplarını içermektedir. CFF ailesinin en son geliştirilmiş kuvvet alanı ise COMPASS (Condensed Phase Optimized Molecular Potentials for Atomistic Simulation Studies) kuvvet alanı özellikle yoğunluk ve kohezyon enerji yoğunluğu tahminleri için geliştirilmiştir.

CHARMM36 kuvvet alanı, modern karbonhidrat parametreleri ile [265] CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics) tüm-atom biyomoleküler kuvvet alanı üzerinden geliştirilmiştir [268]. CHARMM36 parametrizasyonu sulu çözeltilerindeki karbonhidratların modellenmesi [269] için olduğu kadar aynı zamanda

da çok sayıda monosakkarit 1→1, 1→2, 1→3, 1→4 ve 1→6 glikosidik bağları, bunların hem alfa hem de beta anomerleri [263] kompleks karbonhidratlar ve glikoproteinler arasındaki glikosidik bağlar, monosakkaritlerle bağlı sülfat ve fosfat grupları, asiklik karbonhidratlar ve alditoller [270] için de gerekli parametreleri içermektedir.

CHARMM kuvvet alanı potansiyel enerji fonksiyonu (E), protein, nükleik asit, lipid, karbonhidrat ve ilaç gibi küçük moleküller için ayrı parametre ve topoloji dosyaları içermektedir [261, 271]. CHARMM 36 Denklem 3.7’de gösterildiği gibi kovalent bağ içeren ve içermeyen terimlerden oluşan bir potansiyel enerji fonksiyonu kullanmaktadır.

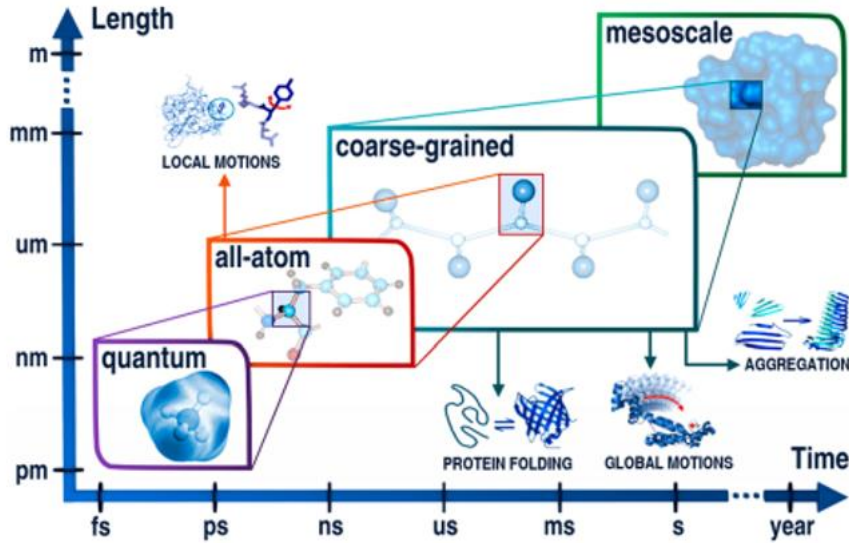
$$\begin{aligned}
 E_{bağlı} = & \sum_{bağ}^{kovalent} K_b (b - b_0)^2 + \sum_{açı} K_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \\
 & \sum_{imp.dihedral} K_\phi (\phi - \phi_0)^2 + \sum_{dihedral} \frac{1}{2} \sum_{n=1}^6 K_n (1 + \cos(n\phi - \delta_n)) \\
 E_{bağlı olmayan} = & \sum_{iyon\ çifti}^{bağlı olmayan} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \|r_i - r_j\|} + \\
 & \sum_{iyon\ çifti}^{bağlı olmayan} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{min,ij}^{12}}{\|r_i - r_j\|^{12}} \right) - 2 \left(\frac{R_{min,ij}^6}{\|r_i - r_j\|^6} \right) \right] \\
 E_{UB} = & \sum_{Urey-Bradley} K_{UB} (r_{1,3} - r_{1,3,0})^2
 \end{aligned} \tag{3.7}$$

CHARMM kuvvet alanı diğer kuvvet alanlarından farklı olarak, valans açısını tanımlayan terminal (1,3) atomları arasındaki harmonik potansiyel Urey-Bradley terimini kullanmaktadır. Denklem 3.7’deki ilk 4 terim ve Urey-Bradley terimi kovalent bağ içeren etkileşimlere aittir. Bunlar K_b , K_θ , K_ϕ , K_ϕ ve K_{UB} sırasıyla bağ, valans açısı, improper dihedral açısı, dihedral açısı ve Urey-Bradley açısı kuvvet sabiti parametreleridir. b , θ , ϕ , ve r ise sırasıyla bağ mesafesi, valans açısı, hatalı açığı düzelten terim, dihedral açısı ve Urey-Bradley açısı 1,3 mesafesi ve değerleridir. 0 alt imgesi dengedeki değeri ifade etmektedir. Bunlara ilave olarak, dihedral açı için n çokluk (multiplicity) ve δ kosinüs serisinin faz açısıdır. Bütün bağlı olmayan ij atom çiftleri Lennard Jones (LJ) 6-12 van der Waals etkileşim ve Coulomb terimi ise

elektrostatik etkileşimleri ifade etmektedir. ϵ_{ij} LJ kuyu derinliği, $R_{min,ij}$ LJ enerji minimumunda iken atomlar arası mesafe, q_i ve q_j kısmi atom yükleri ve r_{ij} i ve j atomları arasındaki mesafedir. Lorentz-Berthelot birleştirme kuralı farklı atom tipleri için LJ parametrelerini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır [261]. Hidrojen bağı etkileşimleri için ayrı bir terim bulunmamaktadır. Bu etkileşimler LJ ve Coulomb enerjilerinin içinde hesaba katılmaktadır.

Su moleküllerini tanımlamak amacıyla rijid üç- taraflı TIP3P modelinin modifiye edilmiş bir versiyonu [272] ve su moleküllerini rijid tutarak hidrojen atomları arasındaki bağları ve kovalent olarak bağlandıkları daha ağır atomları denge değerlerinde sabit tutmak amacıyla SHAKE algoritması [273] kullanılmaktadır. Uzun mesafeli Coulomb etkileşimleri gerçek kesme mesafesi değeri c kullanılarak partikül mesh Ewald yöntemi ile hesaba katılmaktadır [274]. Moleküler dinamik simülasyonlarında, izotermal-izobarik topluluğu için Nose-Hoover termostadı [276, 277], basınç düzenlemesi için ise Langevin piston barostat [278] kullanılmaktadır. Sulu simülasyonlarda periyodik sistem olarak kesilmiş oktehedron açık çözücü olan su moleküllerinin sayısını azaltmak için uygundur. Sulu simülasyonlarda, hücre boyutları hedef basıncı korumak amacıyla izotropik olarak değişmektedir. Buna karşın kristal simülasyonlarda hücre kenar uzunlukları bir kurala bağlı olmadan değişebilmektedir. Bu simülasyonlarda açısız hücre parametreleri 90° olarak alınmaktadır.

Moleküler modelleme ile çalışılacak olan sistemlerde ilk dikkat edilmesi gereken husus, çalışılacak olan modelin yapısına en uygun, en iyi simülasyon yaklaşımını belirlemektir (Şekil 3.2). Burada ‘en iyi model’, cevaplanması istenilen sorulara bağlıdır. Genel olarak polimer sistemlerde klasik simülasyonlar için çoğunlukla atomistik veya kaba-taneli (CG, *coarse-grained*) modeller kullanılmaktadır. Eger amaç geniş bir uzay ve zamanda polimer sistemlerin tasarım parametrelerini, genel yapı ve morfolojisini tahmin etmek ise CG model kullanarak çalışmaya başlamak en iyi çözüm olacaktır. CG model, seçilen atomları bir monomer/bütün bir monomerde gruplayarak/bir grup monomer/Kuhn segment olarak bir tanecik içine alarak serbestleşme derecesini azaltmaktadır.



Şekil 3.2 : Farklı süre ve vibrasyonel hareket mesafelerinde tavsiye edilen moleküler modelleme uygulama aralıkları: kuantum (quantum) , tüm atom (all-atom), kaba taneli (coarse-grained) ve orta ölçek (mesoscale) [279].

4. DÜŞÜK METOKSİ- VE YÜKSEK METOKSİ-PEKTİN ÇAPRAZ BAĞLI ZİNCİRLERİNİN MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARI

4.1 Giriş

Polisakkaritlerin jelleşme mekanizmaları üzerinde uzun süredir çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Özellikle pektin ve aljinat zincirlerinin Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} ve Mg^{2+} gibi iki değerlikli katyonlarla oluşturduğu çapraz bağlanma mekanizması ve ‘yumurta kutusu’ modeli, üzerinde çok çalışılan konulardandır [280]. Braccini ve Perez MM3 kuvvet alanını kullanarak, dimerlerin konformasyonel değişikliklerini incelemişler, zincirlerin kalıcılık uzunluğu ve (ϕ, ψ) dihedral açı çiftlerinin oluşturduğu haritayı incelemişler, kalsiyum etkileşimlerinin polisakkaritlerin moleküler dayanıklılık ve stereokimyasını etkilediğini belirlemişlerdir [281]. Daha sonra, üronat zincirlerinin Ca^{2+} ile dimerler oluşturduğu bir model üzerinden, üç-boyutlu yapının meydana gelmesinde önemli olan dimer-dimer etkileşimlerini ve dimerlerin agregasyonunu incelemişlerdir [282]. Ardından Plazinski bu çalışmalardan hareketle, GROMOS 53a6 kuvvet alanını kullanarak hem moleküler dinamik (MD) hem de yarı amprik ZINDO-1/Monte Carlo metotları ile Ca^{2+} ve poliüronat zincirlerinin sulu çözeltilerindeki doğal etkileşimlerini incelemiştir [283]. Elde edilen sonuçlara göre, Ca^{2+} - poliguluronat komplekslerinin polimer zincirlerinin birbirlerine göre hem paralel hem de antiparalel şekilde düzenlendiği; klasik yumurta kutusu modelinin aksine, iki farklı poliguluronat zinciri üzerindeki dört adet karboksil grubuna ait oksijeni koordine eden Ca^{2+} modelini önermiştir. Bu çalışmadan kısa bir süre sonra ise Plazinski ve Darch, tek bir α -L-guluronat anyonu ve oligo α -L-guluronat zincirini modellemiş, sistemin bir bölgesine kuantum mekaniği yaklaşımının (Gaussian 09, DFT, B3LYP/6-311++G) ve moleküler mekanik yaklaşımının (GROMACS 4.55 yazılımı) beraber uygulandığı melez bir MD tekniği ile çalışmıştır [284]. Bu şekilde, α -L-guluronat anyonu ve oligo α -L-guluronat zincirleri arasındaki etkileşimlerin serbest enerji profilleri çıkartılmış, Ca^{2+} iyonlarının negatif yüklü karboksil grupları ile su molekülleri arasındaki öncelikli etkileşimleri belirlenmiştir. Hidroksil gruplarındaki ve halkadaki oksijenlerin Ca^{2+} koordinasyonunda bir etkisi olmadığını söylemişlerdir.

Assifaoui ve çalışma arkadaşları düşük metoksi (LM) pektin çözeltisinde Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının polimerik zincirleri çapraz bağlama mekanizmaları arasındaki farkı MD simülasyonları ile incelemiştir [285]. Pektin zincirlerini galakturonat monomerleri ile modellemişler, CHARMM kuvvet alanı altında şemsiye örnekleme/MD simülasyonları ile iki valanslı katyonların karboksilik asit grupları ve su molekülleri ile yaptıkları etkileşimlerin kuvvetini araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgular Ca^{2+} iyonlarının Zn^{2+} iyonlarına göre daha homojen çapraz bağlı bir yapı oluşturduğunu; Zn^{2+} iyonunun galakturonik asit üstündeki karboksilik ve hidroksil grupları ile etkileşirken, Ca^{2+} iyonlarının sadece karboksilik asit grupları ile etkileşime girdiği sonucuna varmışlardır. Bu grubun bir sonraki çalışmasında ise suya ilgileri ve büyüklükleri farklı olan dört farklı iki valanslı katyon (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) ile yine CHARMM kuvvet alanı kullanılarak poligalakturonik asit zincirlerinin MD simülasyonları yapılmıştır. Mg^{2+} katyonunun suya ilgisinin çok fazla olması nedeniyle galakturonik asit birimine çok zayıf bağlandığı, Ca^{2+} iyonunun Zn^{2+} ve Ba^{2+} katyonlarına göre suya ilgisinin daha orta düzeyde olması nedeniyle daha esnek bir çapraz bağlı ağyapı oluşturduğunu belirlemişlerdir [286]. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada da Fe^{2+} iyonlarının poligalakturonik asit birimleriyle etkileşimi CHARMM36 karbonhidrat kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirilen MD simülasyonları ile incelenmiştir [280].

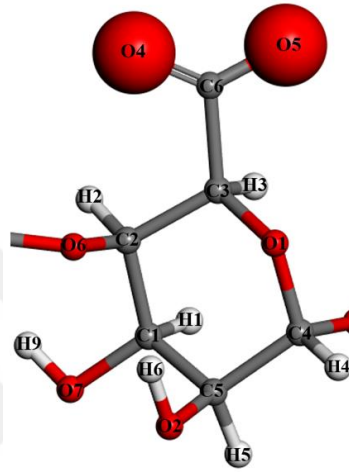
Yapılan bu çalışmalardan da görüldüğü gibi literatürde pektin zincirleri için yapılan jelleşme mekanizmasına yönelik MD çalışmaları, sadece karboksilik asit içeren galakturonik asit monomeri üzerine yoğunlaşarak gerçekleştirilmiştir [282, 285, 287, 288]. Halbuki, gerçekte pektin zincirleri üzerinde amitli ve esterli fonksiyonel gruplar da bulunmaktadır. Dolayısıyla, zincirdeki farklı yük yoğunluğuna ve boyuta sahip bu monomerlerin zincir içindeki dağılımları ve miktarları, zincir üzerinde birbirlerine göre olan uzaklıkları ve zincirin stereo-kimyası, yumurta kutusu oluşumuna ve dolayısıyla ilaç difüzyonuna etki etme olasılığı oldukça yüksektir. Pektin hidrojel matrikse ilaç immobilizasyonu ve salım çalışmalarında, hidrojel oluşmadan hemen önce pektin, ilaç ve çapraz bağlayıcı bir çözeltide karışım halinde olup, bu aşamadaki moleküler etkileşimlerin doğası kontrollü ilaç salım performansını büyük ölçüde etkilemektedir.

Bu nedenle literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmak amacıyla, tezin bu ilk bölümünde, LM ve yüksek metoksi (HM) pektin zincirlerinin kontrollü ilaç salımında

4.2 Başlangıç Modellerinin Oluşturulması

21 adet GN, GE and GA monomerinden oluşan iki farklı oligomer pektin zinciri modellenmiştir. HM-pektin 3 adet GA, 6 adet GN ve 12 adet GE; LM-pektin 12 adet GA, 3 adet GN and 6 adet GE kullanılarak MS programının *Build* modülünde oluşturulmuştur. Zincirlerde monomerler birbirlerine O1/ O4 oksijenlerinden bağlanmıştır. GA monomerinin atom numaralandırması Şekil 4.2’de verilmiştir. LM-pektin için üretilen polimer zinciri konfigürasyonu, GN GA GA GA GE GE GN GA GA GA GE GE GN GA GA GA GE GE; HM-pektin için ise GN GA GA GE GE GE GE GN GA GA GE GE GE GN GA GA GE GE GE GE şeklindedir. LM-pektin zincirlerinde amitli ve esterli gruplar oligomerin uçlarında olacak şekilde, HM-pektin modelinde ise yüksüz bölümler deprotonlanmış galakturonik asit rezidüleri arasına

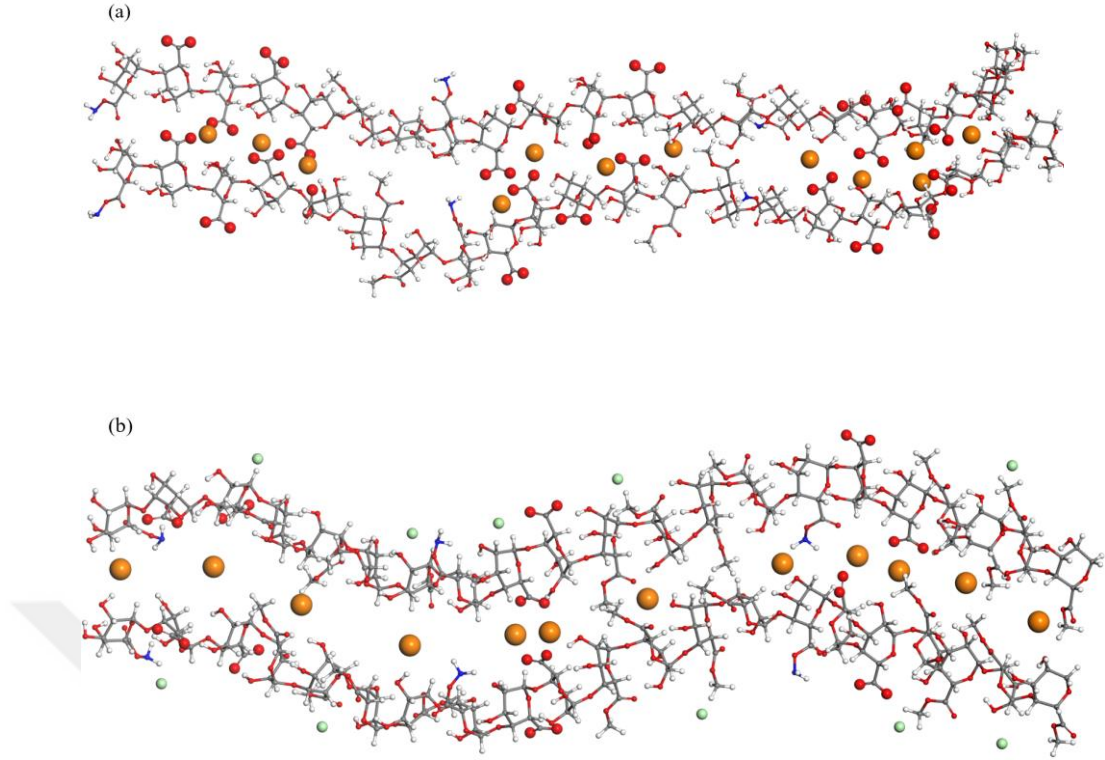
gelişi güzel serpilmiştir. LM-pektin modeli, bu tez kapsamında deneysel çalışmalarda kullanılan LM-pektin ile denk oranlarda karboksil asit, ester ve amit grupları içermektedir. Zincirin esnek bölümünde bulunan ve glikoliz bağlarını oluşturan C(2) ve C(4) karbon atomları, fiziksel jel modellerine uyacak şekilde sabitlenmiştir. Diğer karbon atomları daha rijit olan halka bölüme bağlıdır. Bu nedenle, zincir konformasyonunda önemli bir parametre olan glikoliz bağındaki dehidral açısı ϕ başlangıç yapısında 160° olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 4.2 : Galakturonik asit atomlarının numaralandırılması. Karboksilli grup üzerindeki oksijenler büyük gösterilmiştir.

Yapıların geometri optimizasyonları *Forcite* modülünde pcff kuvvet alanı [290] altında gerçekleştirilmiştir. Minimizasyon için smart algoritması (ardışık steepest descent ve quasi-Newton yöntemleri) kullanılmıştır. Elektrostatik etkileşimler ve bağ içermeyen Lennard-Jones mesafesi 12,5 Å olarak ayarlanmıştır. Elektrostatik etkileşimler Ewald yöntemi [291] ile hesaplanmıştır. Enerji toleransı olarak 0,001 kkal/mol alınmıştır.

Her bir sistemde, MD simülasyonlarının başlangıç konformasyonu olarak iki oligomer zinciri birbirlerine paralel olacak şekilde el ile programın ara yüzünde hizalanmıştır. Simülasyon kutusuna, pektin oligomeri zincirlerinden çapraz bağlı bir yapı oluşturmak ve zincirlerin yük nötralizasyonunu sağlamak amacıyla LM-pektin zincirine 12 adet Ca^{2+} , HM-pektin zincirlerine ise 12 adet Ca^{2+} ve 12 adet Cl^- eklenmiş, ve başlangıç konformasyonunda Ca^{2+} iyonları zincirler boyunca dağıtılmıştır (Şekil 4.3). Simülasyon kutusunun net yükünün sıfır olmasına dikkat edilmiştir. Oluşturulan bu sistemlere *Amorphous cell* modülünde su molekülleri eklenmiştir.



Şekil 4.3 : 21 monomer uzunluktaki pektin zincirleri ve Ca^{2+} iyonları (turuncu) başlangıç konfigürasyonu. (a) LM model (b) HM model. $-\text{COO}^-$ üzerindeki oksijenler büyük gösterilmiştir. Su molekülleri saklanmıştır.

Sulu sistemin enerjisi yukarıda açıklandığı gibi minimize edildikten sonra, arka arkaya enerji minimizasyonu – MD simülasyonu protokolü MS yazılımının *Forcite/Quench* menüsünden uygulanmıştır. Bu yaklaşım ile sistemin düşük enerjili konfigürasyonları örneklenmiş, başlangıç konfigürasyonun çevresi klasik MD simülasyonlarına kıyasla daha etkili bir şekilde taranmıştır. Toplamda 500 ps süren MD simülasyonları pcff kuvvet alanı altında periyodik sınır şartlarında, NVE topluluğunda gerçekleştirilmiştir. Zaman adımı olarak 1 fs alınmıştır. Hacim Berendsen barostatı [292] ile sabit tutulmuştur. Elektrostatik etkileşimler Ewald yöntemi ile hesaplanmıştır. Enerji minimizasyonları 10 ps’lik bir frekansla, yukarıda detaylandırıldığı şekilde yapılmış ve sistemin koordinatları kaydedilmiştir. Tüm analizler kaydedilen koordinatlar üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4.3 Gezinge Analizi

MD simülasyonlarında yapısal hareketliliğin analizi veri yorumlamada anahtar bir rol oynamaktadır. Modellerin Ca^{2+} ile etkileşme seviyeleri, COO^- grupları ile Ca^{2+} arasında oluşan etkileşimlerin neticesindeki konumlanma radyal dağılım fonksiyonu (RDF, $g(r)$) ile hesaplanmıştır. Pektin jellerinin yapıları ayrıca bükülme açıları (ϕ , ψ) dağılımı, dönme yarıçapı (R_g), uçtan uca mesafe (R_n), karşılıklı çapraz bağlı monomerler arası mesafelere odaklanılarak detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu yolla karboksil asit, ester ve amit içeren rezidüleri bünyesinde barındıran LM ve HM modellerinin jelleşme seviyeleri ve stabilitelerindeki değişimi aydınlatmak üzere bilgi elde edilmiştir.

4.3.1 Radyal dağılım fonksiyonu (RDF)

RDF $g(r)$, bir korelasyon fonksiyonudur ve yapısal ve termodinamik özelliklerin statik olarak tanımlanmasını ve karakterize edilmesini sağlayan bir fiziksel niceliktir. Belirli mesafelerin oluşabilme sıklığı ile ilgili bilgi vermekte, sistem içindeki herhangi bir atomun etrafındaki atomların ortalama dağılımını temsil etmektedir. RDF, belirli bir atom merkezli küresel bir kabukta, birbirlerinden dr mesafedeki atomik merkezlerin sayısının, kabuk hacmi ve kütle sayı yoğunluğuna bölünmesiyle aşağıdaki şekilde elde edilir [292].

$$g(r) = \frac{\text{Pr}(r)}{4\pi r^2 \rho_0}$$

$$\text{Pr}(r) \equiv \langle \sum_{n \neq m} \delta(r - r_{mn}) \rangle \quad (4.1)$$

Burada, r uzaklık ve r_{mn} (m, n) çifti arasındaki uzaklık ($\text{\AA}$), $g(r)$ ise birimsiz (m, n) çifti dağılım fonksiyonudur. RDF gezinge boyunca seçilen atom çiftleri veya gruplarının mesafe dağılımlarını vermektedir. Bu şekilde hidrojen bağı, katyon-dipol bağı gibi kovalent bağ içermeyen etkileşimlerin yoğunluğu kantitatif olarak etkileşimde bulunan atom grupları için ortaya çıkarılır. Örneğin, hidrojen bağı yapan grupların arasındaki ($-\text{O} \cdots \text{H}-$ gibi) uzaklık $2.0 \text{ \AA}$ civarında stabildir ve $g(r)$ fonksiyonu r 'ye göre çizildiğinde bu değerde bir pik verir.

4.3.2 Uçtan uca uzaklık (R_n) ve dönme yarıçapı (R_g)

Konformasyon, bir molekülün atomları arasındaki bağlar etrafındaki dönme hareketiyle alabileceği her türlü geometrik düzenlemeyi kapsar. Doğrusal polimer zincirleri en uzun ve tam büzülmüş halleri arasında sonsuz sayıda rastgele bükülmüş geometrilerde bulunabilirler. Uçtan uca uzunluk (R_n ; *end to end distance*) polimer zincirinin iki uç atomunun arasındaki mesafedir. Polimer zincirinin çözücü içindeki büyüklüğünü belirleyen önemli bir parametredir. Çözücünün cinsine, net etkileşim kuvvetlerinin büyüklüğüne ve zincirdeki yinelenen birim sayısına bağlı olarak değişmektedir.

$$\sqrt{\bar{R}_N^2} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{R}_N^2} \quad (4.2)$$

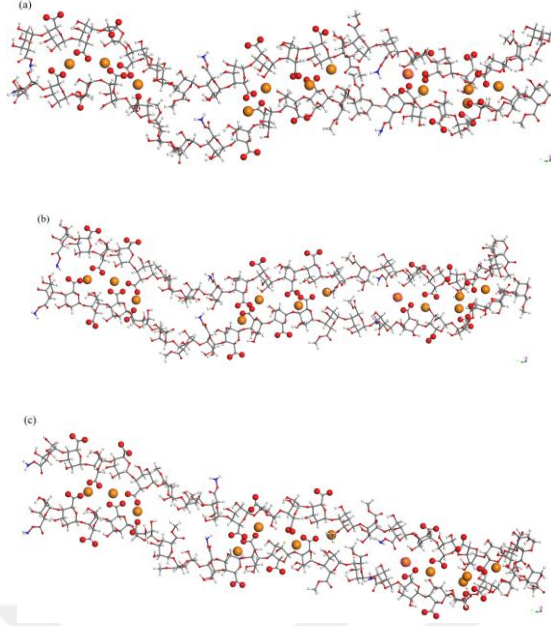
eşitliği ile monomerlerin uçtan uca uzunluklarının kareleri ortalamasının karekökü olarak hesaplanmaktadır.

Dönme yarıçapı (R_g ; *radius of gyration*), bir kütlenin kütle merkezinden bir eksen etrafında dönme atalet momentini değiştirmeden, tüm kütlenin konsantre olabileceği bir kütle merkezinden olan mesafedir. Bir cismin kendisi ile aynı kütleye sahip sanal halkanın yarıçapına denilmektedir. Polimerin yapısal ve gerinim özelliği hakkında bilgi vermektedir. R_g değeri büyüdükçe polimerin uzun, azaldıkça bükülmüş geometriye geçtiği anlaşılmaktadır. Genellikle ışık saçılması gibi yöntemlerle deneysel olarak ölçülmektedir. Herhangi bir m_i kütleli atom veya grup ile kütle merkezi arasındaki mesafe r_i olarak alınırsa, dönme yarıçapının karesi Denklem 4.3 ile hesaplanmaktadır:

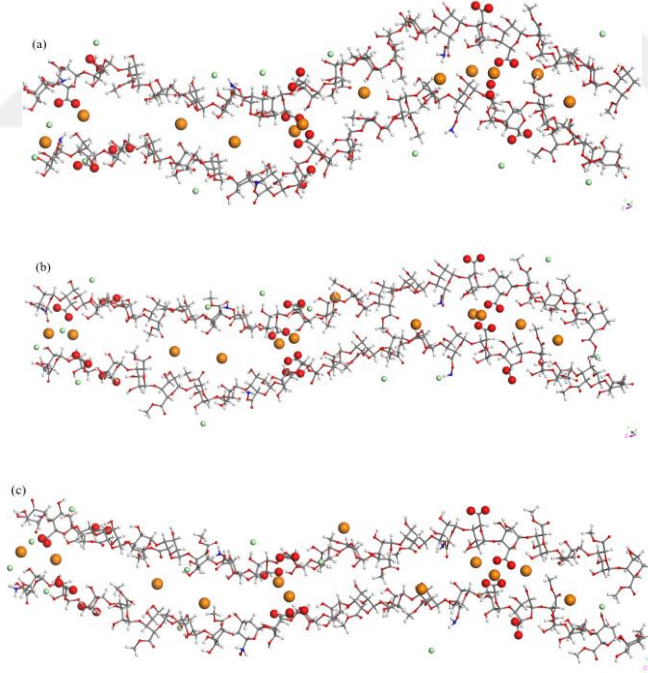
$$R_g^2 = \frac{\sum_{i=1}^N m_i d_i^2}{\sum_{i=1}^N m_i} \quad (4.3)$$

4.4 Sonuçlar ve Tartışma

HM-pektin ve LM-pektin zincirlerinin Ca^{2+} iyonları ile etkileşerek oluşturdukları kompleks yapıların çeşitli zaman adımlarındaki görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.

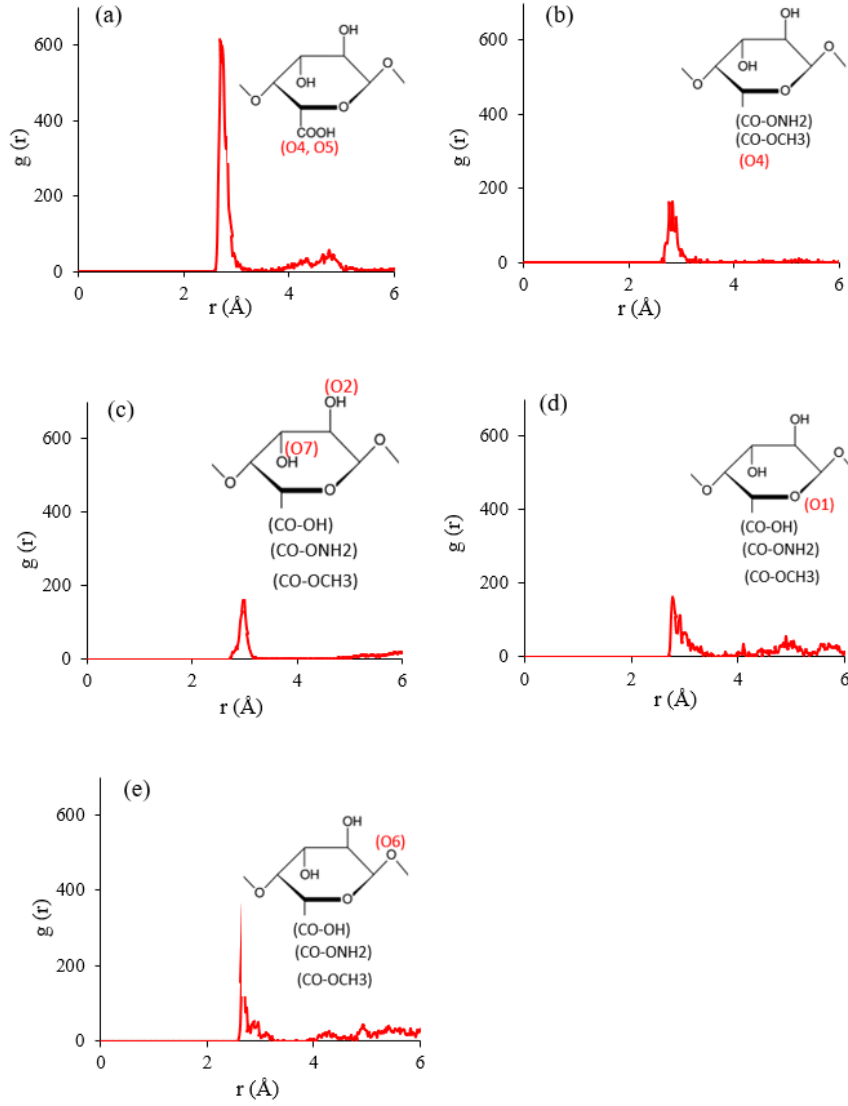


Şekil 4.4 : LM-pektin zincirleri yumurta kutusu sisteminin anlık görüntüleri; (a) $t = 0$ ps, (b) $t = 250$ ps, ve (c) $t = 500$ ps. $-\text{COO}^-$ grupları üzerindeki oksijenler (kırmızı) büyük gösterilmiştir, Ca^{2+} iyonları turuncu renktedir.

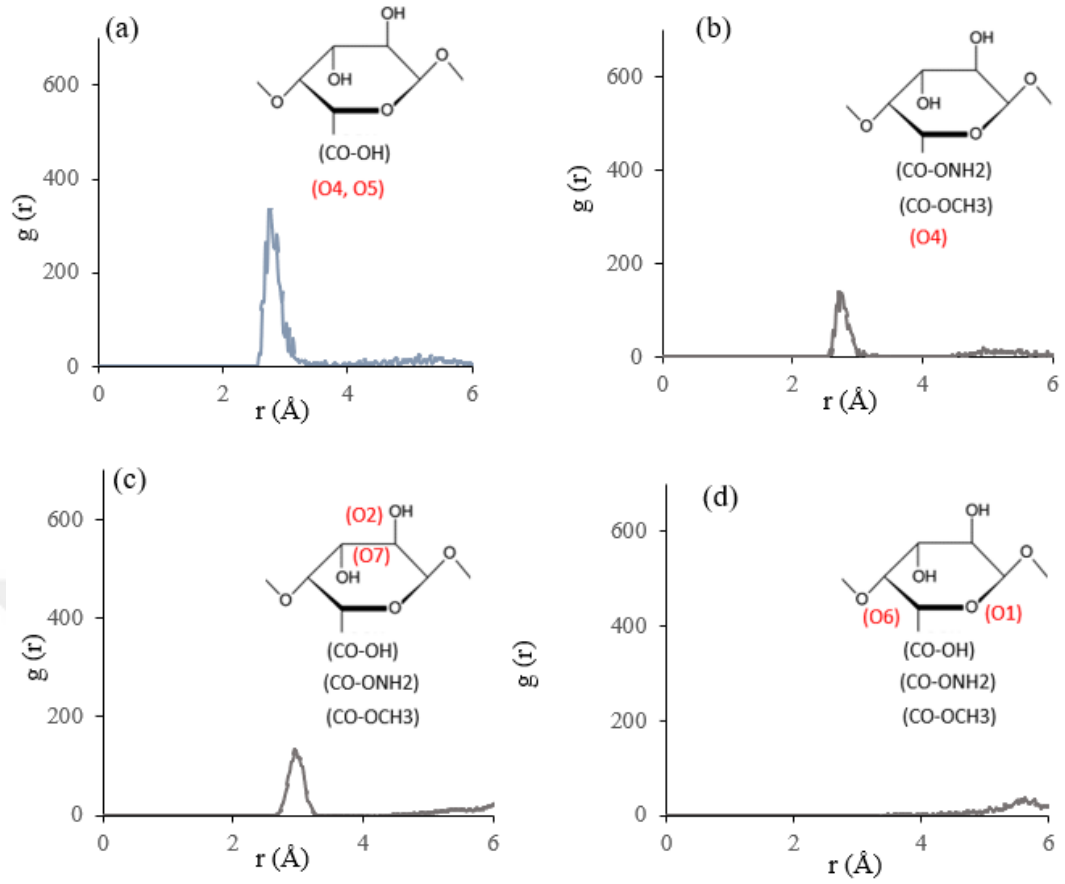


Şekil 4.5 : HM-pektin zincirleri yumurta kutusu sisteminin anlık görüntüleri; (a) $t = 0$ ps, (b) $t = 250$ ps, ve (c) $t = 500$ ps. Gösterim ve renklendirme Şekil 4.4'teki gibidir.

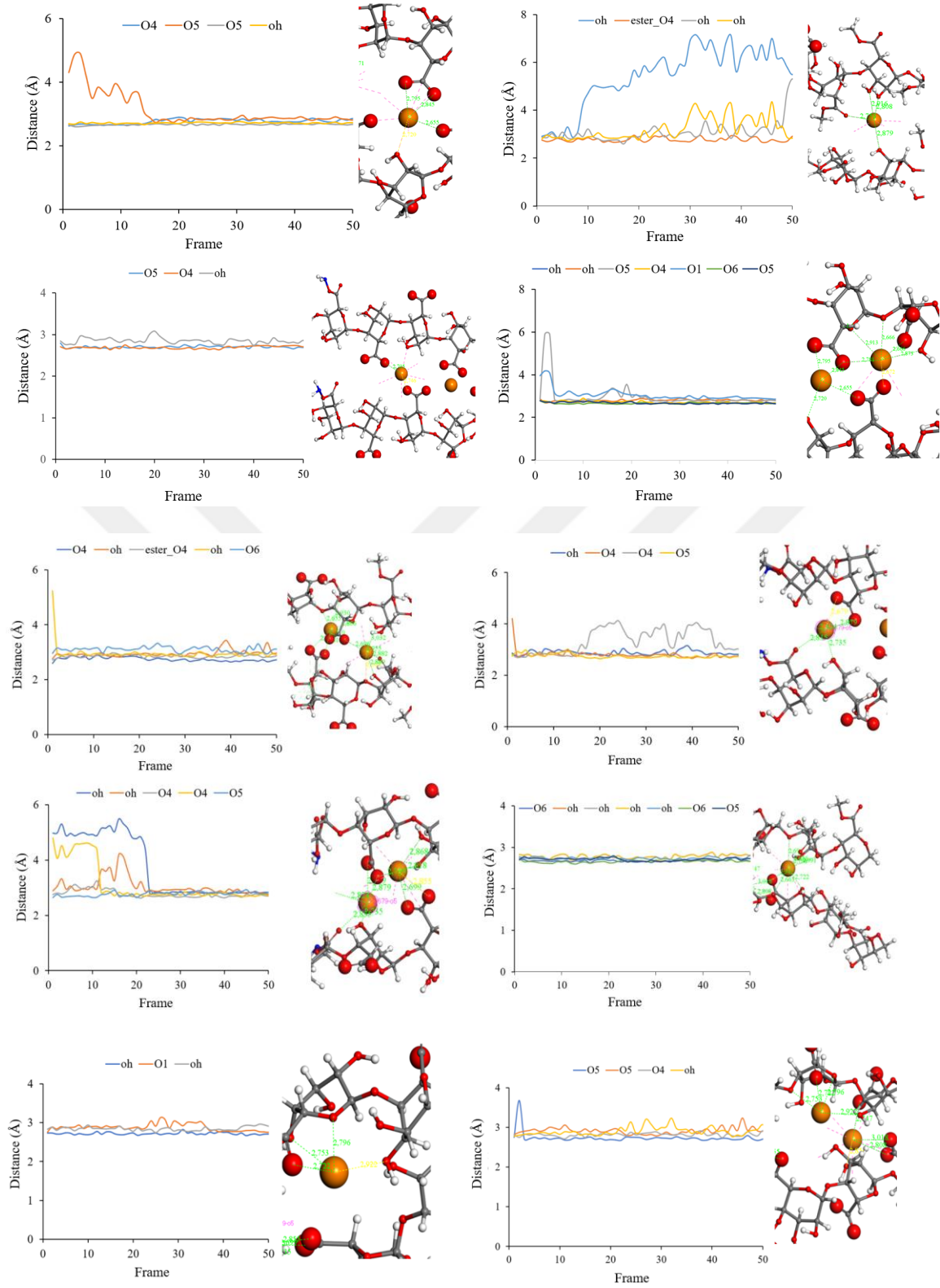
Her iki yapıdaki zincir içi ve zincirler arası moleküler etkileşimlerin kapsamını anlamak amacıyla radyal dağılım fonksiyonu (RDF) kullanılmıştır. Ca^{2+} iyonlarının başlıca karboksil atomları ile olmak üzere, aynı zamanda halka oksijenleri ve su molekülleri ile etkileştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6 - 4.10). Her iki yapıda da Ca^{2+} iyonlarının halka oksijenleri ile 2.73 Å -2.95 Å uzaklığında, su molekülleri ile ~2.8 Å mesafesinde etkileştiği hesaplanmıştır. Ca^{2+} iyonunun yaptığı bu koordinasyonlar vektörlerin yönüne ve monomerlerin zincir içindeki konumuna göre de değişiklik göstermektedir. Braccini ve Perez de [2001] benzer bulgular öne sürmüşlerdir. Yapılar yakından incelendiğinde (Şekil 4.4 ve 4.5) her iki metoksi yapıda da Ca^{2+} iyonlarının genellikle -COO^- ve -OH^- grupları yakınında olmayı, -CH_3 ve -NH_2 gruplarından (ester karbonil oksijenlerinden) uzakta kalmayı tercih ettiği belirlenmiştir (Şekil 4.6 - 4.10). Esterli ve amidli rezidülerde Ca^{2+} iyonları -OH (O2 ve O7) ve O4 atomları yakınında bulunmaktadır. Braccini ve Perez'e [296] göre de Ca^{2+} iyonları -COO^- veya -OH^- grupları yakınında durma eğilimindedir. Bu koordinasyonlarda stereokimya kendini açık bir şekilde belli etmektedir. Özellikle karboksil gruplarının dış yöne baktığı bölgelerde Ca^{2+} koordinasyonu çoğunlukla diğer halka atomları üzerinden gerçekleşmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



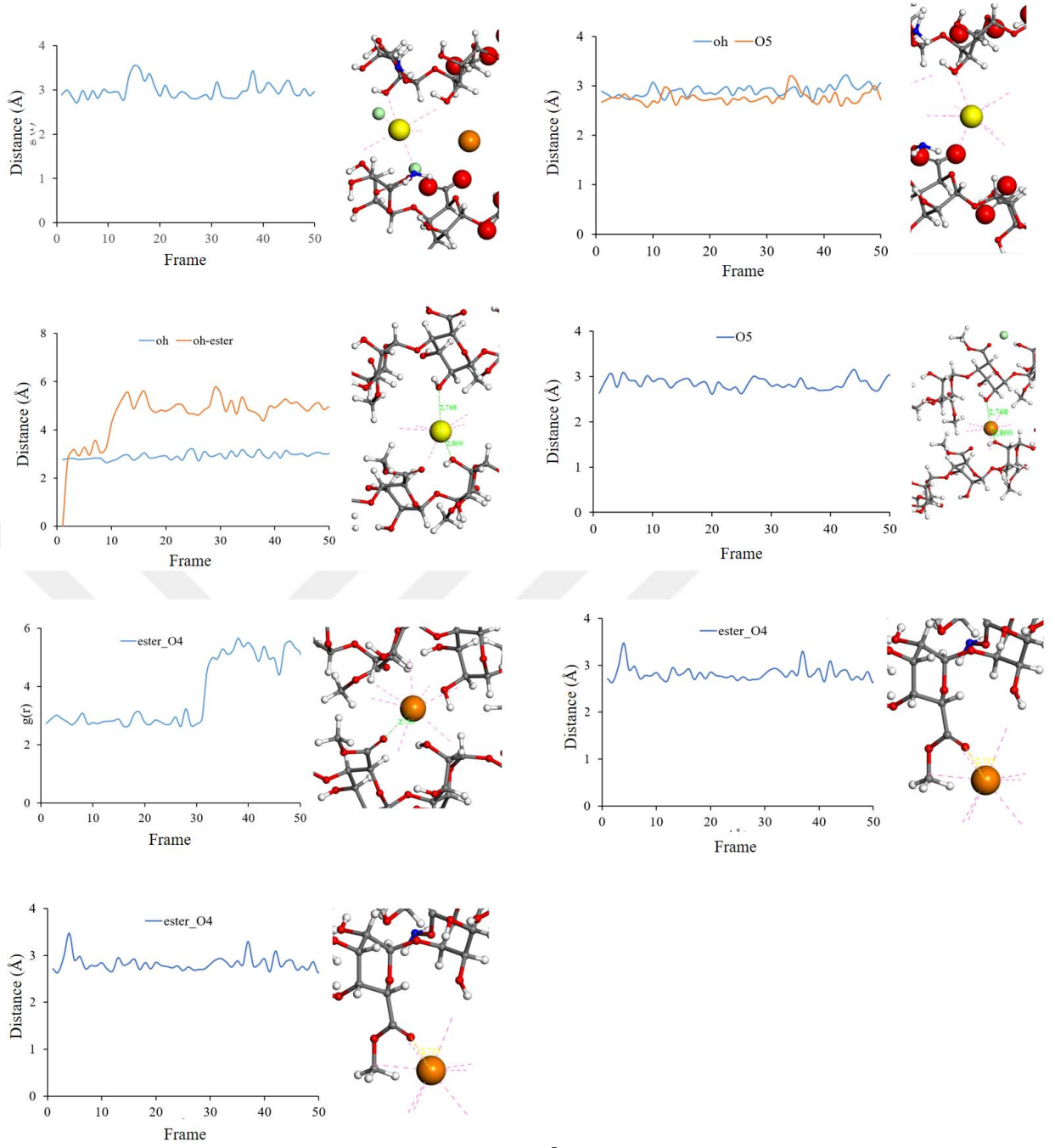
Şekil 4.6 : LM-Pektin yapısı Ca^{2+} iyonu ile halka atomları arasındaki RDF analizi: (a) Ca^{2+} - COO^- , (b) Ca^{2+} - O4- (ester&amit), (c) Ca^{2+} - OH grupları, (d) Ca^{2+} - O1 , (e) Ca^{2+} - O6 .



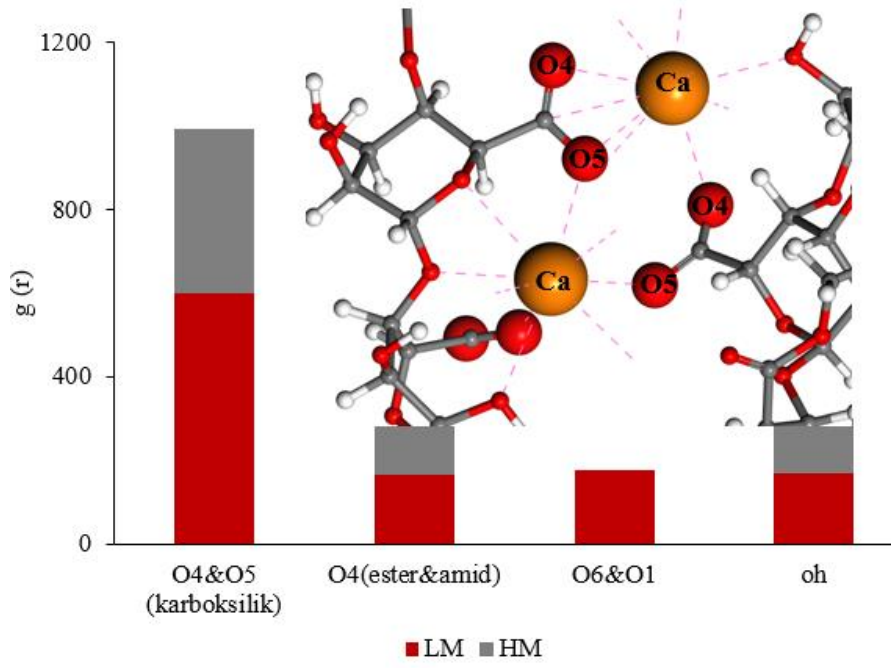
Şekil 4.7 : HM-Pektin yapısı Ca iyonu ile halka atomları arasındaki RDF analizi: (a) Ca^{2+} - COO⁻, (b) Ca^{2+} - O4- (ester&amit), (c) Ca^{2+} - OH grupları, (d) Ca^{2+} - O1, (d) Ca^{2+} - O6.



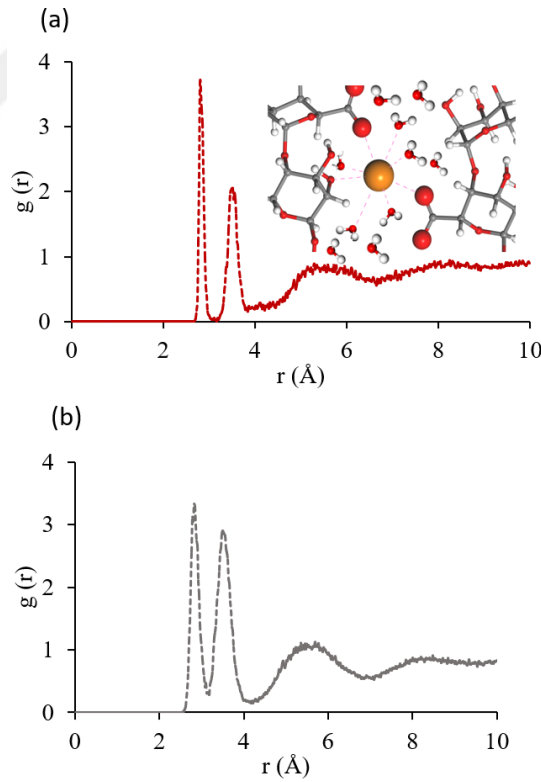
Şekil 4.8 : LM-pektin yapısında Ca^{2+} iyonlarının gezinme boyunca zincir atomlarıyla yaptığı etkileşim.



Şekil 4.9 : HM-pektin yapısında Ca^{2+} iyonlarının gezeinge boyunca zincir atomlarıyla yaptığı etkileşim.



Şekil 4.10 : Halka oksijenleri ile Ca iyonları RDF analizi.



Şekil 4.11 : (a) LM-pektin, ve (b) HM-pektin sisteminde Ca^{2+} iyonları ile su molekülleri için RDF analizi.

Elde edilen RDF verilerine göre HM-pektin ve LM-pektin yapılarının Ca^{2+} ile bağlanmasında önemli farklar gözlenmiştir. LM-pektin yapısında Ca^{2+} iyonlarının zincir ile etkileşimlerinin HM yapısına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Hem LM hem de HM yapılarında Ca^{2+} iyonları, zincir atomlarından başlıca karboksil oksijenleri (O4, O5) olmak üzere diğer halka oksijeni atomları ile de (O2, O3, O7) etkileşime girmiştir. Bu durum literatürde de rapor edilmiştir [284]. Esterli ve amitli monomerlerde Ca^{2+} iyonu çoğunlukla hidroksil gruplarına bağlı O2 ve O7 atomlarının yanı sıra O4 atomu ile de önemli miktarda koordinasyon oluşturmuştur (Şekil 4.6 - 4.10). Halka üstündeki O6 oksijeni ve glikosidik köprüsünün O1 oksijeni sadece LM-pektin yapısında çapraz bağlanmaya katkıda bulunmuştur. Bu atomlar HM-pektin yapısında Ca^{2+} iyonları ile etkileşime girmemiştir. Bu farklılığa yapılar üzerindeki atomların kısmi yük yoğunluğu farkının etki ettiği düşünülmektedir (Çizelge 4.1). Glikosidik köprüsündeki O6 oksijeninin kısmi yükü LM-pektin zincirinde -0.557 iken, HM pektin zincirinde bu değer -0.266'ya düşmüştür. Bunun yanı sıra C3, C6 ve O5 atomlarının da kısmi yükleri bağlı bulundukları monomerin karboksilik, ester (Çizelge 4.1). LM- ve HM-pektin yapılarında bu fonksiyonel grupların oranları da farklı olduğu için bu kısmi yük değişikliğinin etkisi belirgin olacaktır. Halka eter ve hidroksil oksijeni atomları Ca^{2+} iyonları ile çoğunlukla amitli ve esterli rezidülerde etkileşime girmiştir (Şekil 4.6 - 4.10). RDF verilerine göre, LM-pektin yapısındaki zincir atomları ile Ca^{2+} koordinasyonları simülasyon boyunca stabil kaldığı halde, HM-pektin yapısında Ca^{2+} -zincir etkileşiminin stabilitesinin sık sık kesintiye uğradığı, bazı durumlarda tamamen kaybolduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

Çizelge 4.1 : Zincir atomlarının LM ve HM modelindeki yük dağılımları.

Atom adı	LM-karbok	HM-karbok.	LM-ester	HM-ester	LM-amit	HM-amit
C1, C2, C5	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
C3	-0.15	-0.15	0.08	0.08	0.08	0.08
C4	0.027	0.021	0.027	0.021	0.027	0.021
C6	0.297	0.297	0.702	0.702	0.534	0.534
H9,H6	0.424	0.424	0.424	0.424	0.424	0.424
H1,H2,H3,H4	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053	0.053
O1	-0.266	-0.266	-0.266	-0.266	-0.266	-0.266
O2,O7	-0.557	-0.557	-0.557	-0.557	-0.557	-0.557
O4	-0.53	-0.53	-0.53	-0.53	-0.53	-0.53
O5	-0.533	-0.533	-0.396	-0.396	-0.0284	-0.0284
O6	-0.557	-0.266	-0.557	-0.266	-0.557	-0.266

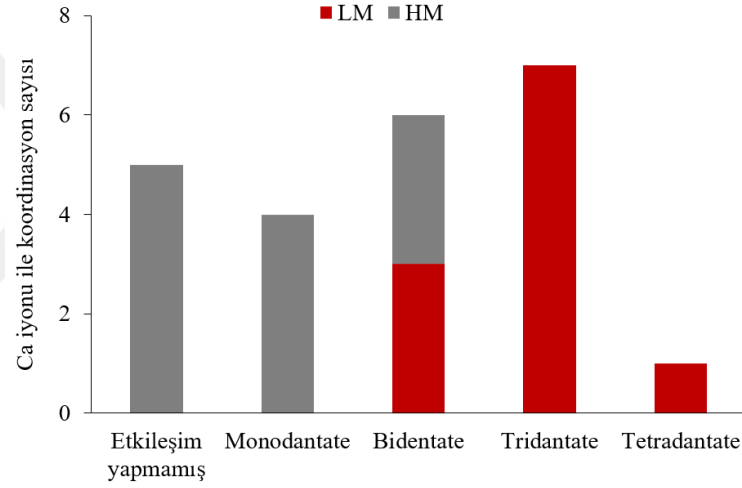
Grant ve arkadaşlarının poligalakturonik asit için önerdiği yumurta kutusu modeline göre [297], moleküler seviyede Ca^{2+} iyonlarının iki adet hidroksil oksijenleri (O2 ve O7), iki eter oksijeni (O1 ve O6) ve bir adet karboksil oksijeni (O5) ile etkileşime geçebilir. Braccini ve Perez ise Ca^{2+} iyonlarının karbonhidrat komplekslerinde genellikle 7 veya 9 adet oksijen atomu ile koordine olabileceğini belirtmişlerdir [298]. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ise, Ca^{2+} iyonları LM-pektin zincirlerinde ortalama 5 adet pektin zinciri oksijeni, HM-pektin zincirlerinde yaklaşık 1,4 adet zincir oksijeni ile etkileşime girdiği tespit edilmiştir.

LM-pektin yapısında, Ca^{2+} iyonlarının galakturonik asit zincirlerinin karboksilat grupları ile yaptığı etkileşimler, guluronat zincirlerinde olduğu gibi çoğunlukla polidentate yapıdadır (Şekil 4.12). Öte yandan HM-pektin yapısında zincir iyonu ile etkileşime girmeyen 5 adet Ca^{2+} iyon bulunmaktadır (Şekil 4.13, Çizelge 4.2). LM-pektin yapısındaki 12 adet Ca^{2+} iyonunun 11 adeti aynı anda her iki zincirle de etkileşime girerken, HM-pektin yapısında sadece 1 adet Ca^{2+} iyonu iki zincirle de etkileşime girebilmiştir. Bu durum esasen nokta benzeri çapraz bağlanma ile monokompleks oluşumuna neden olması gerekirken [299], HM modelinin gezinme ekran

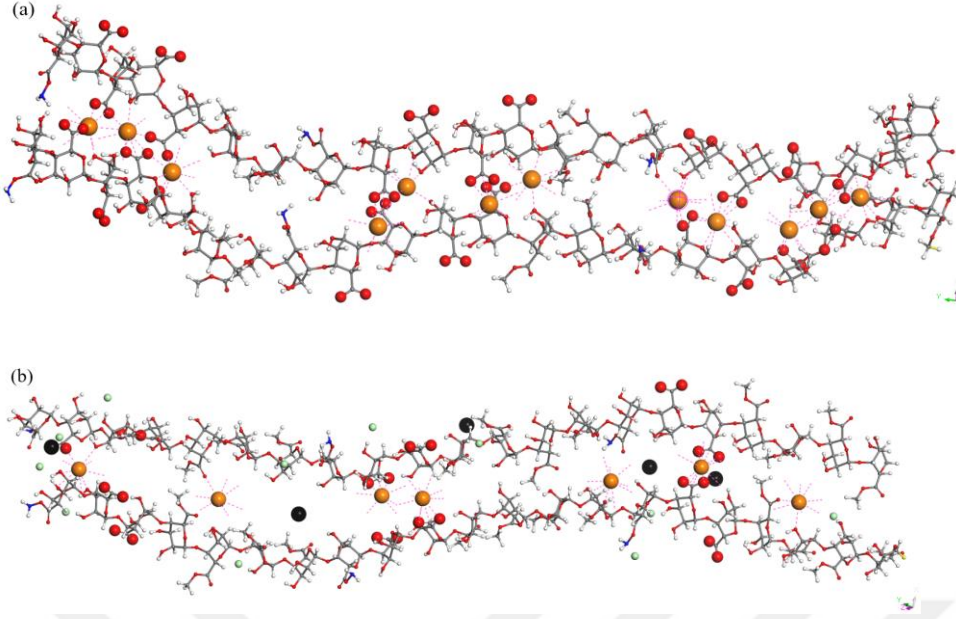
görüntüleri incelendiğinde, polikondenzasyon benzeri bir yapı sergilediği görülmüştür.

Çizelge 4.2 : Ca iyonunun HM ve LM yapılarında, simülasyon sonunda etkileşime girdiği monomer ve zincir adetleri.

Ca numarası		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
HM	Monomer adeti	-	3	2	-	1	1	-	1	-	2	-	2
	Zincir adeti	-	2	2	-	1	1	-	1	-	2	-	1
LM	Monomer adeti	3	3	3	3	4	2	3	3	3	2	3	3
	Zincir adeti	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2

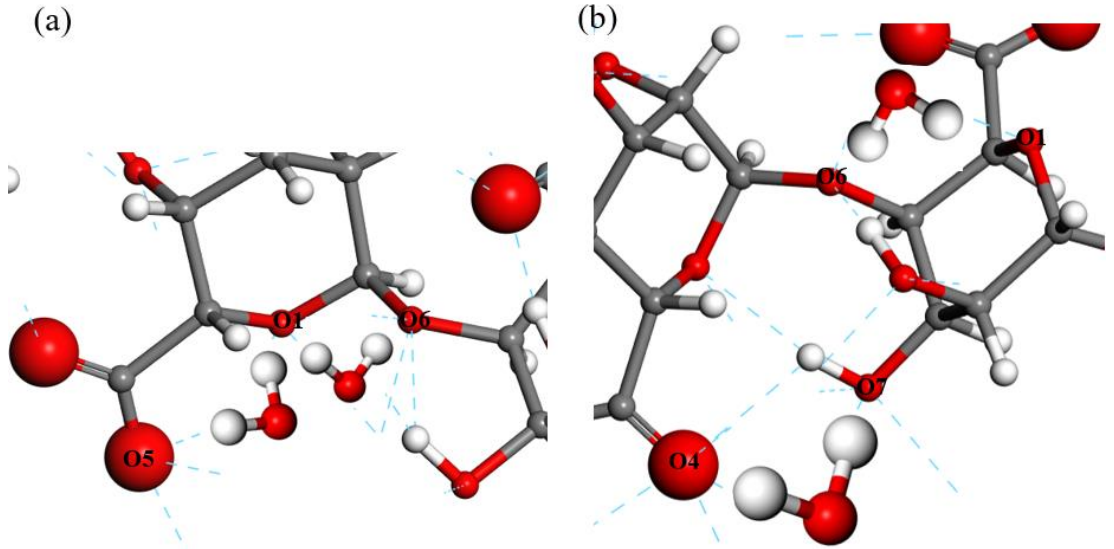


Şekil 4.12 : Simülasyon sonundaki pozisyonlarına göre Ca^{2+} iyonlarının zincir atomları ile ortalama koordinasyon sayıları.



Şekil 4.13 : (a) LM ve (b) HM-pektin sistemleri $t=500$ ps zamanında Ca^{2+} iyonu ile etkileşimleri. Ca^{2+} iyonunun zincirler ile yaptığı etkileşimler pembe kesikli çizgiler ile gösterilmiştir. HM yapısındaki siyah renkli Ca^{2+} iyonları, simülasyon sonunda, zincirler ile koordine olmayan Ca^{2+} iyonlarıdır.

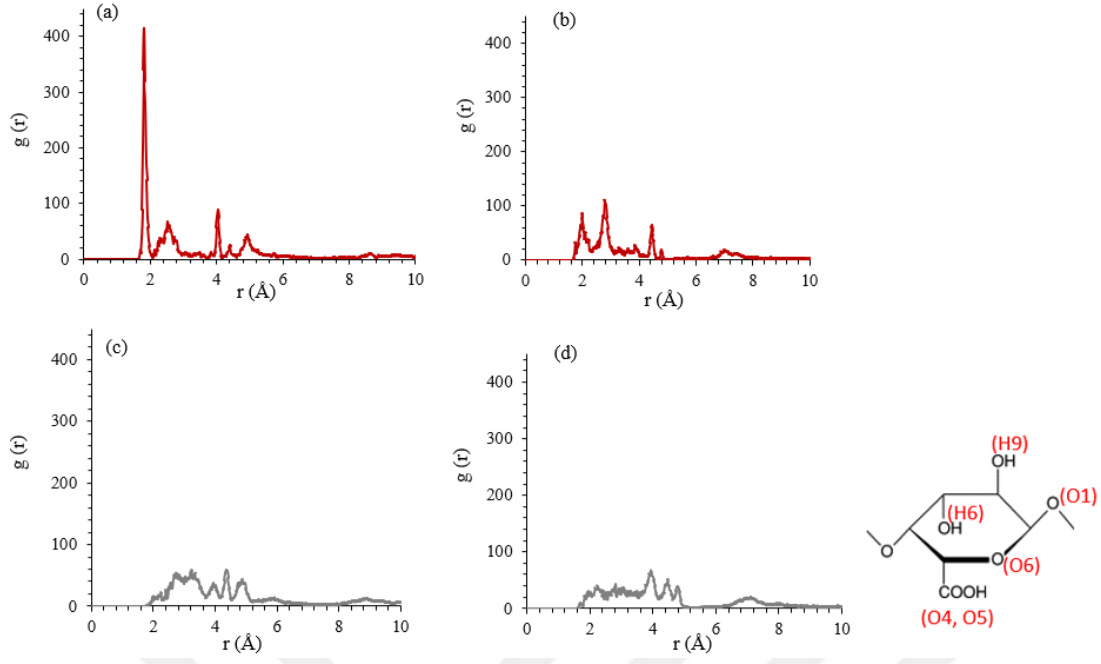
Her iki model de su moleküllerinin Ca^{2+} iyonları ile bağlanmasına (Şekil 4.11) olarak tanımlanmaktadır ki bu durum kalsiyum şelatlanmasının genellikle su moleküllerinin oksijen atomları ile etkileşerek gerçekleştiği bilgisi ile uyumludur [300]. Plazinskinin poligalakturonik asit için önerdiği modele göre de [283], buradaki çalışmada olduğu gibi, Ca^{2+} iyonları sadece zincir oksijen atomları ile değil aynı zamanda su molekülleri ile de etkileşime girmektedir. $g(r)$ eğrilerine göre LM-pektin modelindeki Ca^{2+} iyonlarının su molekülleri ile koordinasyonun, HM-pektin modeline göre fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Su molekülleri komşu zincir veya monomerlerdeki atomları ile hidrojen bağı yaparak ekstra çapraz bağlanma sağlar. Bu çalışmada da, LM-pektin yapısında önemli miktarda intra ve intermoleküler ortak su koordinasyonları oluşmuştur (Şekil 4.14). Su koordinasyonları en çok, O5 (O4) ve O1, O6 ve O1, O4 ve O7 (O9) atomları arasında oluşmuştur. Ortak su koordinasyonları sayesinde, her iki uçtaki atomlar aynı su molekülü ile bağlanarak zincir stabilitesine arttırmışlardır.



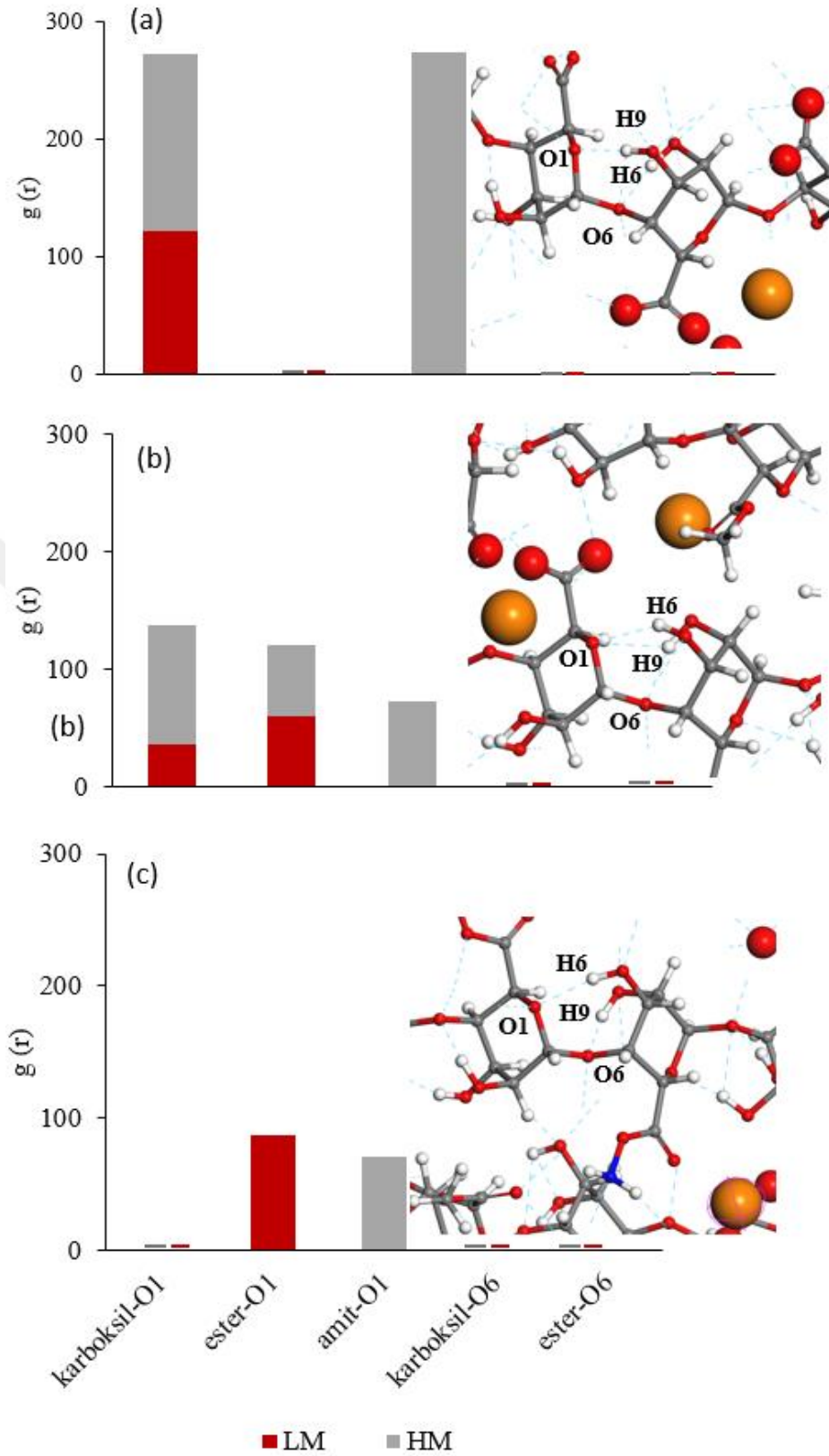
Şekil 4.14 : (a) O5---O1, O1---O6, (b) O4---O7, O1---O6 atomları arasındaki ortak su koordinasyonları.

Sistemlerdeki hidrojen bağları ve zincirlerin (ϕ, ψ) burulma açıları incelenmiş, dönme yarıçapı (R_g), uçtan uca mesafe (R_n) zamana karşı hesaplanmıştır. Çapraz bağlı zincirlerin sulu ortamda açılması monomerler arasındaki ilk andaki mesafenin değişiminin analizi ile incelenmiştir.

Pektin zincirlerinin hidrofilikliği nedeniyle sistemde önemli miktarda hidrojen bağı oluşmaktadır (Şekil 4.15). RDF analizine göre LM-pektin modelindeki hidroksil (-OH) gruplarının hidrojen atomları (H6 ve H9, adlandırma Şekil 4.2’de verilmiştir) glikosidik köprüsündeki O6 atomu ile önemli oranda hidrojen bağı oluşturmaktadır (Şekil 4.15 ve 4.16). Özellikle H6 veya H9 --- O6 arasındaki inter-glikosidik hidrojen bağlarının pektin zincirlerinin kristalin yapısının stabilizasyonuna önemli oranda katkıda bulunduğu daha önce rapor edilmiştir [281]. HM-pektin zinciri modelinde ise H6 veya H9 --- O6 arasındaki hidrojen bağlarının, LM-pektine kıyasla çok daha az olduğu görülmektedir.



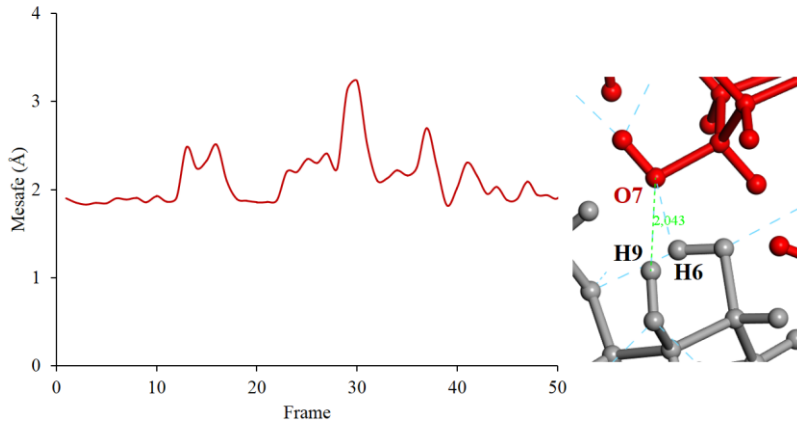
Şekil 4.15 : (a) LM-pektin zinciri -OH hidrojenleri H6 ve H9---O1 arasındaki, (b) LM-pektin -OH hidrojenleri H6 ve H9---O6 arasındaki, (c) HM-pektin zinciri -OH hidrojenleri H6 ve H9---O1 arasındaki, (d) HM-pektin zinciri -OH hidrojenleri---O6 arasındaki hidrojen bağlarını gösteren RDF grafikleri.



Şekil 4.16 : (a) karboksil asitli (b) esterli (c) amitli rezidürlere bağlı hidroksil hidrojenlerinin (H6, H9) halka oksijenleri ile etkileşim RDF analizleri.

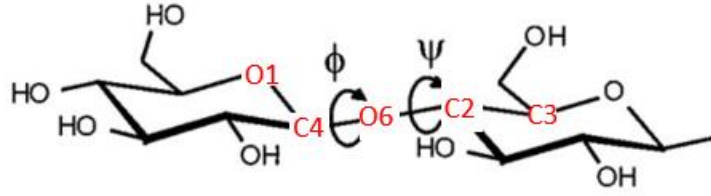
Yine -OH grupları üzerindeki hidrojenlerin zincir üzerindeki O1 ve O6 atomlarıyla yaptığı hidrojen bağları, bağlı bulunduğu monomerin fonksiyonel gruplarına göre daha detaylı incelenmiştir. Karboksilli asit içeren monomerdeki -OH üzerindeki H atomlarının hem LM- hem de HM-pektin zincirinde karboksilli asit içeren monomerdeki O1 atomları ile etkileştiği görülmüştür. Aynı hidrojenlerin (H6 ve H9), HM-pektin modelinde amitli monomerin O1 atomları ile hidrojen bağı yaptığı, buna karşın esterli ve amitli gruplardaki O6 atomları ile bu bağı oluşturamadığı belirlenmiştir (Şekil 4.16). Esterli monomer üzerindeki -OH hidrojen atomlarının ise her iki zincir modelinde de (HM-pektin modelinde daha fazla olmak üzere) karboksilli ve esterli monomerlerin O1 atomları; HM modelinde bunlara ilave olarak amitli gruptaki O1 atomu ile hidrojen bağı oluşturduğu hesaplanmıştır. Amitli grupların üzerinde bulunan H6 ve H9 atomlarının LM modelinde esterli ve HM modelinde ise sadece amitli monomerin O1 atomları ile hidrojen bağı oluşturabildiği belirlenmiştir.

RDF hesaplamalarına göre HM modelinde monomerler arası hidrojen bağlarının, LM modelindeki monomerler arası hidrojen bağlarına göre biraz daha fazla olduğunu söylenebilir (Şekil 4.16 ve 4.17). HM modelinde sadece zincir içi hidrojen bağları oluşurken LM modelinde az sayıda da olsa zincirler arası hidrojen bağları kurulduğu ve zamanla korunduğu görülmüştür (Şekil 4.17).



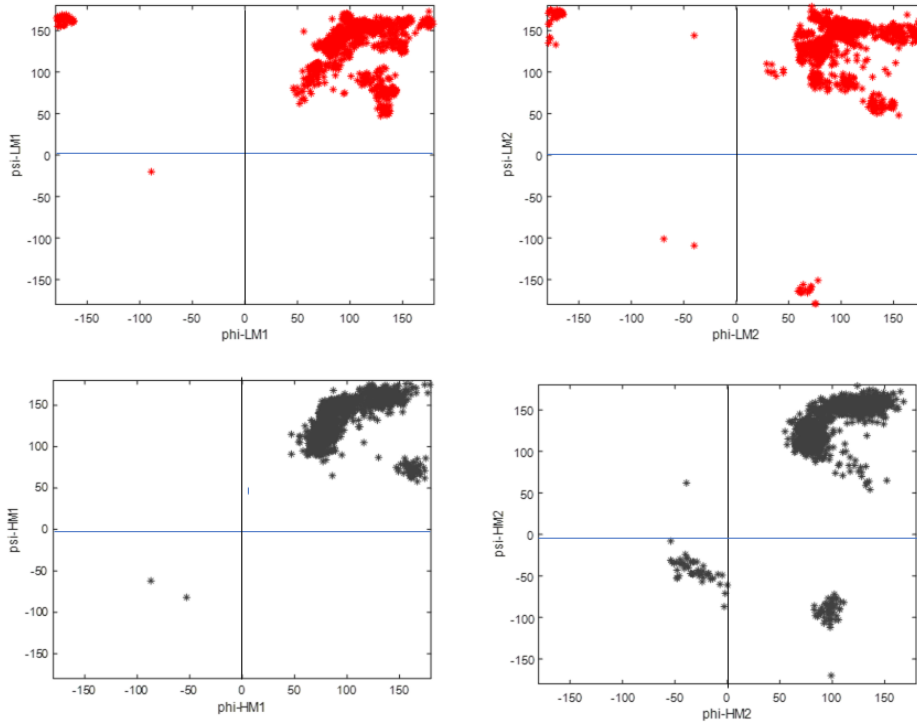
Şekil 4.17 : LM-pektin zincirinde oluşan iki zincir arası hidrojen bağının simülasyon süresi boyunca değişimi.

Polisakkaritlerin konformasyonu önemli ölçüde glikosidik (ϕ, ψ) burulma açlarına bağlıdır (Şekil 4.18). Bu nedenle LM- ve HM-pektin modellerinde Ca^{2+} koordinasyonuna bağlı konformasyonel değişimleri takip edebilmek amacıyla simülasyon boyunca (ϕ, ψ) açıları hesaplatılmıştır (Şekil 4.19).



Şekil 4.18 : Galakturonik asit rezidüsü için $\phi = \text{O1}'\text{-C4}'\text{-O6-C2}$ $\psi = \text{C4}'\text{-O6}'\text{-C2-C3}$ şeklinde tanımlanmıştır.

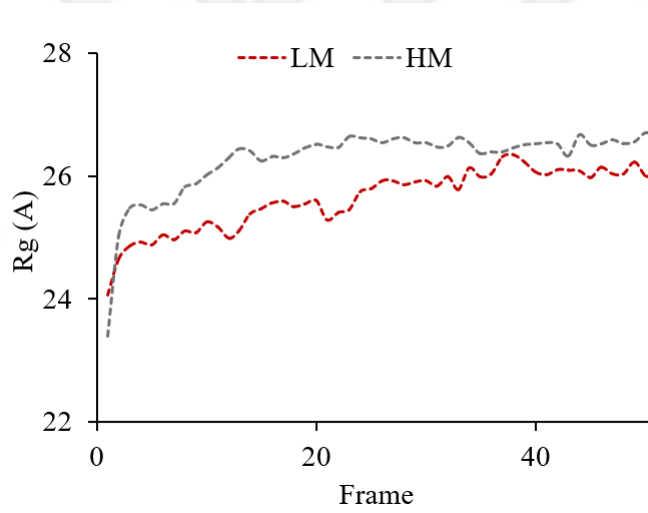
HM-pektin modelinin bir zinciri dışında her iki metoksi modeli için çizdirilen (ϕ, ψ) grafikleri, literatürde bildirilen digalakturonik asit yapısı için hesaplanan (ϕ, ψ) grafikleri ile büyük oranda benzerlik göstermektedir [281]. LM-pektin yapısındaki açılar daha dar bir alana sıkışması, bu modelde hidrojen bağlarının daha çok olması ve Ca^{2+} iyonu ile daha iyi etkileşim kurmasına bağlanabilir. Ancak HM-zinciri modelinde de büyük sapmalar gözlenmemiştir.



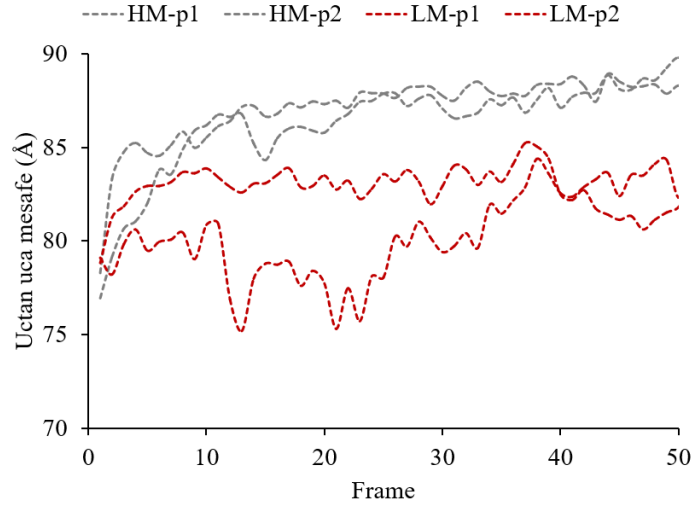
Şekil 4.19 : Modellerin simülasyon boyunca (ϕ, ψ) açıları.

Simülasyon boyunca polimer zincirlerinin dinamiği çapraz bağlı zincirlerin dönme yarıçapı (*Radius of gyration*; R_g) ve uçtan uca mesafe (*End-to-end distance*; R_n) profilleri ile de incelenmiştir (Şekil 4.20 ve 4.21). Buradan elde edilen sonuçlar çapraz bağlı zincirlerin jelleşme için uygun konformasyonları, globüler hareketleri ve toplam esneklikleri hakkında bir fikir vermektedir. Zincirlerin ortalama R_g değeri, LM-pektin

zincirleri için 26,5 Å, HM-pektin için ise 25,6 Å olarak hesaplanmıştır. Esterli ve amitli fonksiyonel grup içeren monomerler karboksilli asit grubu içeren monomerden yaklaşık 1 Å daha uzun oldukları için (esterli monomer 7,8 Å, amitli monomer 7,97 Å, karboksillik asitli monomer 6,6 Å) (Şekil 4.1), ortalama R_g değerleri 6. Bölümde detayları verilen CHARMM kuvvet alanı kullanılarak modellenen poligalakturonik asit modeli için hesaplanan 17,4 Å değeri ile uyumludur. Uçtan uca mesafe dağılım R_n ortalama değeri ise LM-pektin zincirleri için, 80,4 Å, HM-pektin zincirleri için 82,8 Å olarak hesaplanmıştır. Bu değer, yukarıda belirtildiği gibi amidli ve esterli grupların uzunluk farkları (Şekil 4.1) dikkate alındığında, bu tez çalışmasının Bölüm 6'da CHARMM kuvvet alanı kullanılarak hesaplanan 42,5 Å R_n medyan değeri, literatürde GLYCAM kuvvet alanı kullanılarak modellenen 30-40 Å arasında R_n dağılımı gösteren düşük metoksi pektin dekamerleri [301] sonuçları ile uyumludur.

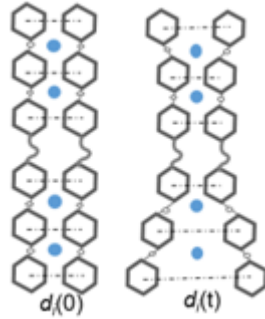


Şekil 4.20 : Modellenen çapraz-bağlı zincirlerin simülasyon süresi boyunca dönme yarıçapı R_g .



Şekil 4.21 : Modellenen zincirlerin simülasyon süresi boyunca uçtan uca mesafeleri R_n .

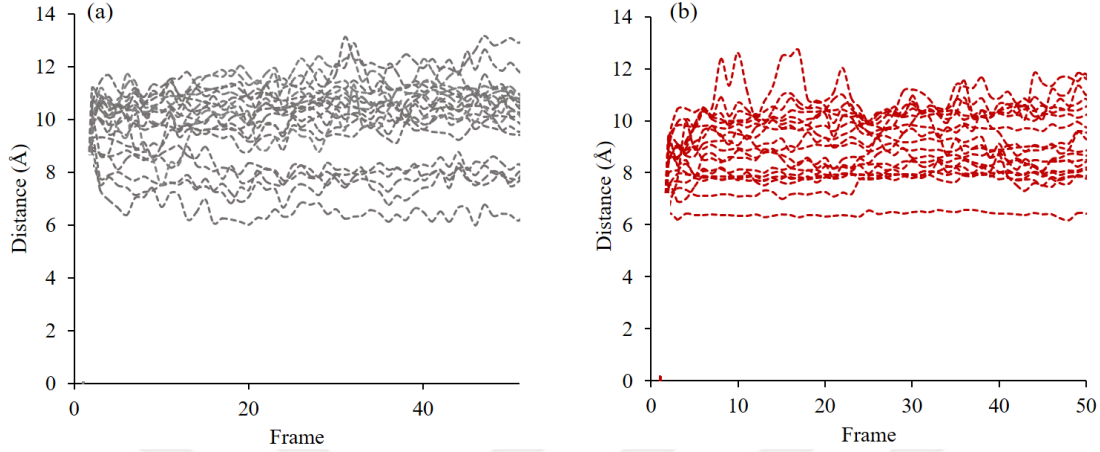
Modellerin çapraz bağlanma seviyeleri ve yapı esneklikleri ile ilgili daha detaylı bir analiz yapabilmek amacıyla karşı zincirler arasındaki en yakın monomer çiftlerinin kütle merkezleri arasındaki mesafenin zamanla değişimi $d_i(t)$ Şekil 4.22’de gösterildiği gibi hesaplanmış; 21 adet monomer çifti için sonuçlar verilmiştir (Şekil 4.23 ve 4.24).



Şekil 4.22 : Karşılıklı monomerler arasındaki mesafe hesaplamaları.

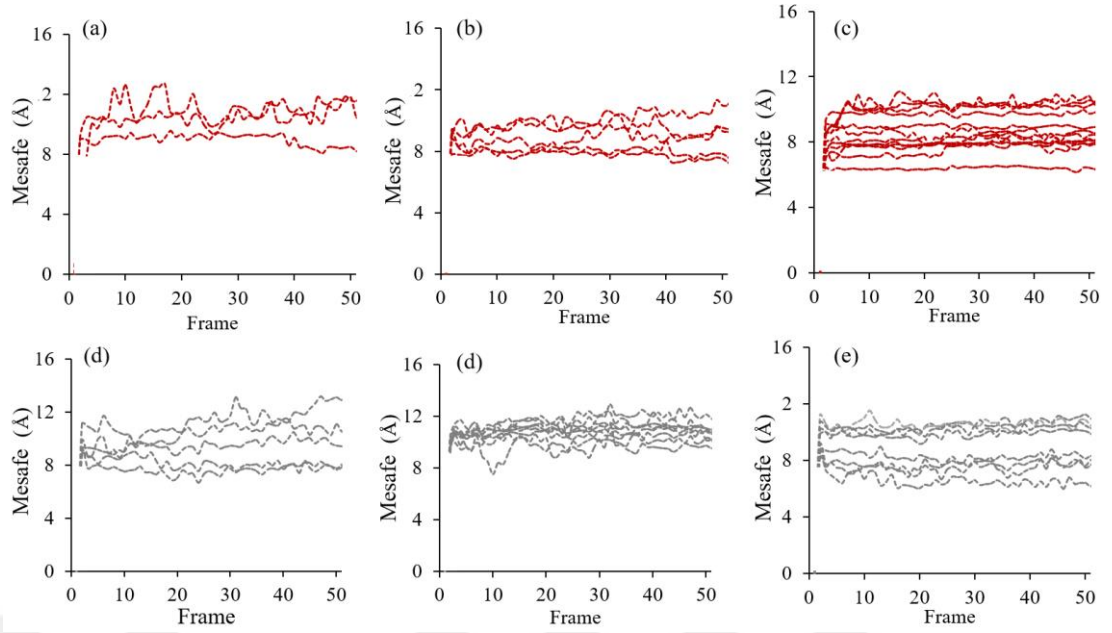
Çapraz bağlı HM-pektindeki mesafelerdeki dalgalanmanın, çapraz bağlı LM-pektin yapısına göre biraz daha fazla olduğu görülmektedir. LM yapısında simülasyon başında ortaya çıkan mesafe, simülasyon boyunca çok az değişmesine rağmen, HM pektin yapısında bir miktar daha fazla mesafe dalgalanmaları gözlenmektedir. Bunun, HM zincir atomlarının Ca^{2+} iyonu ile koordinasyonu stabilitesinin, LM yapısına göre daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşın her iki modelin de mesafe dalgalanmaları birbirine yakın dağılım vermiştir. Bu nedenle bu yapıların farklı yapılar olduğuna emin olabilmek amacıyla, t-testi uygulanmış ve LM ve HM

modellerinin monomerler arası mesafe dağılımlarının farklı bir dağılıma sahip oldukları $p=0.0262$ değeri ile ortaya konulmuştur.



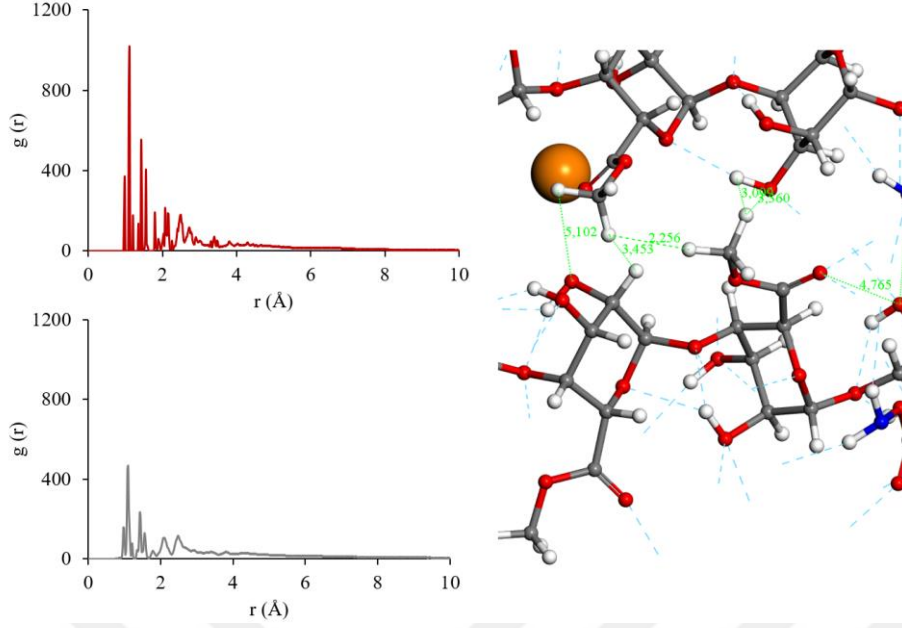
Şekil 4.23 : Karşılıklı monomerler arasındaki mesafe hesaplamaları (a) HM pektin (b) LM pektin.

Mesafe değişimleri fonksiyonel gruplara göre incelendiğinde, her iki metoksi yapıda da amitli grupların daha büyük dalgalanma gösterdiği, mesafe değişimini tüm simülasyon boyunca en stabil tutan grubun ise karboksilli asit grubu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 : Fonksiyonel gruplara göre monomerler arası mesafe hesaplamaları. LM-pektin için (a) amitli rezidüler, (b) esterli rezidüler, (c) karboksil asitli rezidüler. HM-pektin için (d) amitli rezidüler, (e) esterli rezidüler, (f) karboksil asitli rezidüler.

HM-pektin modelinde Ca^{2+} ile koordinasyon LM-pektin modeline göre çok daha az olmasına rağmen, phi-psi dağılımı, R_g , R_n değerleri ve mesafe değişimleri değerlerinin birbirine yakın çıkmasında HM-pektin yapısındaki monomerler arası hidrojen bağlarının ve hidrofobik etkileşimlerin etkili olduğunu düşündürmektedir. Hidrofobik etkileşimlerin seviyesini incelemek amacıyla her iki yapıdaki esterli monomerlere odaklanarak RDF analizi yapılmıştır (Şekil 4.25). LM modelinde 1.79 Å mesafesinde, HM modelinde ise 2.1 Å mesafesinde $g(r)$ piki gözlemlenmiştir. Her iki modelde de hidrofobik etkileşimlerin de önemli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.25 : Zincirlerdeki ester ester etkileşimleri RDF analizi.

4.5 Vargılar

Genel bir değerlendirme yapılacak olursa, literatürde belirtildiği gibi, oligo-galakturonik asit modellerine benzer şekilde düşük metoksi (LM) modelinin Ca^{2+} iyonları ile çapraz bağlanmaya çok daha uygun olduğu gözlenmiştir. HM- ve LM-pektin modellerin phi-psi açıları, monomerler arası mesafe, R_g ve R_n dağılım hesaplamaları farklı ancak birbirlerine yakın değerler vermişlerdir. Bu nedenle HM yapısının da Ca^{2+} iyonu varlığında bir kompleks yapı oluşturabileceği söylenebilir. HM modelinde bu kompleks yapının oluşumu,

- (i) az sayıda da olsa karboksilli grupların O4 ve O5 atomları,
- (ii) esterli ve amitli gruplarının O4 atomları
- (iii) hidroksil gruplarının O2 ve O7 atomlarının Ca^{2+} iyonları ile oluşturduğu etkileşim,
- (iv) hidrojen bağları,
- (v) ester-ester grupları arasındaki hidrofobik etkileşimleri ile gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

Metil ester grupları kuvvetli antienflamatuvar etkiye sahiptir. Elde edilen bu verilere göre kuvvetli antienflamatuvar etkiye sahip olan bir pektin film kullanılması gerektiği durumlarda, Ca^{2+} iyonu ve HM yapıda pektin hidrojeni kullanılabileceği belirlenmiştir.

Yapı stabilitesini arttırmak amacıyla organik veya inorganik bir katkı malzemesi ilave edilmesi tavsiye edilebilir.

Tezin deneysel çalışmalarında, Ca^{2+} varlığında daha düzenli bir çapraz bağlanma olacağı öngörüldüğünden ve bu yapının kontrollü ilaç salımı için daha iyi sonuç vereceği düşünüldüğünden ötürü LM-pektin kullanılmasına karar verilmiştir.





5. PEKTİN HİDROJELLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

5.1 Giriş

Pektin polimerinin jelleşmesi (i) pektin cinsi, (ii) metilasyon derecesi, (iii) çözelti konsantrasyonu, (iv) ortamdaki iyon konsantrasyonu, (v) çapraz bağlayıcı cinsi ve konsantrasyonu gibi iç etkenler ile (i) pH, (ii) karıştırma hızı ve (iii) kurutma koşulları gibi dış etkenlere önemli ölçüde bağlıdır [52, 171, 303, 304] Düşük metoksili (*low methoxy*, LM) pektin zincirlerinin biraraya gelmesi üç tip etkileşim ile gerçekleşmektedir;

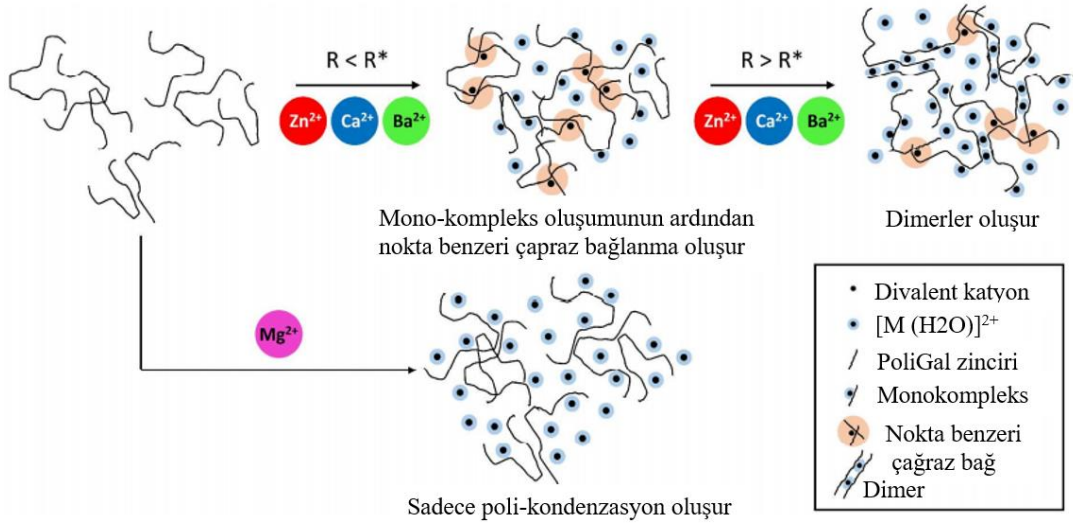
- (i) Sınırlı sayıda metil ester gruplarının düşük enerjili hidrofobik etkileşimi [302, 305],
- (ii) Galakturonik asit rezidüsünde –OH ve –COOH grupları üzerinden oluşan ve jel yapısını kuvvetlendirip, stabilize eden zincir içi veya zincirler arası oluşan hidrojen bağları [302, 305 - 308],
- (iii) Jelleşme mekanizmasını önemli ölçüde domine eden çapraz bağlayıcı metal iyonlarının galakturonik asit rezidüsü ile oluşturduğu tuz köprüleri ve iyonik jelleşme [285, 298, 302, 309, 310].

Jelleşme prosesinde çözücü, polimer zincirlerinin birleşmesini başlatan bağlantı bölgeleri ile birbirine bağlanan üç boyutlu ağ yapıdaki boşluklara sıkışmaktadır [309].

LM pektinler glutraldehid, diiminler veya iki valanslı metal iyonları varlığında jelleşerek kontrollü ilaç salımı için uygun yapıya sahip olmaktadır. İlaç yükleme verimliliği ve salım profili, kullanılan çapraz bağlayıcı moleküle ve konsantrasyonuna büyük oranda bağlıdır [285, 311].

Başta Ca^{2+} olmak üzere, iki valanslı metal iyonlarının (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+}) pektin veya aljinat zincirleri ile bağlanma mekanizması ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır [285, 299, 312]. Galakturonik asit rezidüleriyle bağlanmalarının büyük oranda metal iyonun iyonik çap, yük yoğunluğu, su molekülleri ile koordinasyon sayısı, valans elektron kabuğu gibi özelliklerine bağlı olduğu belirlenmiştir [299]. Yapılan çalışmalarda Zn^{2+} , Fe^{3+} ve Ca^{2+} ile oluşturulmuş

hidrojellerin, Mg^{2+} ile oluşturulan hidrojellere göre çok daha dolaşık bir yapıda olduğu, ancak Mg^{2+} iyonunun su moleküllerine olan yüksek afinitesinden dolayı uygun jel oluşturmada rapor edilmiştir (Şekil 5.1) [299, 312]. Mn^{2+} iyonları kullanılarak yapılan bir çalışmada ise Mn^{2+} iyonlarının yeterli sayıda zincir molekülleri arası birleşme oluşturmada gözlenmiştir [314, 315]. Reolojik incelemelerde Mn^{2+} ile sentezlenen hidrojellerin, Ca^{2+} ile hazırlananlara göre çok daha zayıf olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.1 : Poligalakturonik asit zincirleri ile farklı divalent katyonların (Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , ve Mg^{2+}) birleşme adımlarının şematik gösterimi. R, $([Me^{2+}]/[GalA])$ molar oranı ve R^* mono kompleks oluşumu ve nokta benzeri çapraz bağlanmadan dimerlerin oluşumu sınır molar oranıdır. [299] referansından adapte edilmiştir.

Ca^{2+} konsantrasyonunun pektin hidrojelinin jel oluşumuna etkisi ve ilaç salım profiline etkisini belirlemek amacıyla 70, 100 ve 150 mg $CaCl_2/g$ -hidrojel kullanarak labotatuvarımızda yakın bir zamanda gerçekleştirdiğimiz bir çalışmada kontrollü salım yapabilen en yüksek ilaç salım performansı 70 mg $CaCl_2/g$ -film kullanarak hazırlanan hidrojel ile elde edilmiştir [303]. Fraye ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise pektin çözeltisi ve Ca^{2+} iyonu konsantrasyonu arttıkça depolama ve kayıp modüllerinin arttığını ve daha yoğun ve elastik bir ağ yapı oluştuğunu belirlemişlerdir.

LM-pektin zincirlerinin jelleşme mekanizması, açıkta bulunan $-COO^-$ grupları ve oluşan hidrojen bağı sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Jelleşme $-COO^-$ ile çapraz bağlayıcı katyon arasındaki kuvvetli iyon köprüleri ile gerçekleşeceğinden, ortalama bir pH değerinde ortamda belirli miktarda $-COO^-$ bulunmadığında jelleşme oluşmamaktadır.

Buna karşın, pektin konsantrasyonu çok arttırıldığında ise zincirlerin birbirleri ile etkileşimi ve dolaşıklık artacağından, pektin tamamen çözölemeyecektir. Bu nedenle 6 mg/l'nin altı ve 25 g/l'nin üstü konsantrasyonlarda çalışılması önerilmemektedir. Çözelti konsantrasyonu arttıkça zincir dolaşıklığının artışı ile hareketliliğin kısıtlanması sonucu akış özellikleri de değişmektedir. Pektin polimeri bir polielektrolitik çözelti olduğu için polimer konsantrasyonun, dolayısıyla zincir dolaşıklığının artması ve dönme çapının azalması sonucu artan kuvvetli elektrostatik etkileşimler ve oluşan hidrojen bağlarından dolayı pektin zincirleri çok daha sıkı hale gelmektedir [317]. Yakın zamanda laboratuvarımızda yaptığımız bir çalışmada, pektin çözelti konsantrasyonunun ilaç salım difüzyon mekanizmasına etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada % 4 ve % 6'lık pektin çözeltilerinin Newtonian olmayan bir akış profili sergiledikleri belirlenmiştir. Bu nedenle % 4 ve % 6'lık çözeltiler ile sentezlenen hidrojellerin dolaşıklık oranlarının daha yüksek olmasının yanı sıra elde edilen jellerin por yapıları daha küçük ve düzensiz olacağından özellikle büyük moleküllerin kontrollü salımında sıkıntılar yaşanacağı öngörölebilir. Bu verileri dikkate alarak, bu tez kapsamında %2'lik pektin çözeltisi ile çalışılmasına karar verilmiştir. Yine bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında [171], Ca^{2+} ile hazırlanan hidrojellerin Zn^{2+} ile hazırlanan hidrojellere göre daha kontrollü ve yüksek miktarda ilaç salımı ve şişme oranı gerçekleştirdiğini belirlenmiştir. Benzer sonuçları Assifaou ve ark. da elde etmişlerdir [285, 318, 319]. Moleküler dinamik simölasyonlarından elde ettikleri bulgulara göre Zn^{2+} iyonları galakturonik asid rezidüsünün hem $-COO^-$ hem de $-OH^-$ gruplarına bağlanırken, Ca^{2+} iyonları sadece $-COO^-$ gruplarına bağlanmakta; böylece Zn^{2+} iyonu ile çok daha sıkı bir yapı oluşmaktadır [285, 297]. Buna karşın Ca^{2+} iyonu ile çapraz bağlanan jel çok daha homojen bir yapıya sahip olmaktadır [285]. Bu nedenle, Ca^{2+} iyonun yara iyileşmesinin, özellikle hemeostazis aşamasında bilinen yararlarını da dikkate alarak [320] tez çalışmasında pektin hidrojelinin Ca^{2+} iyonu ile jelleştirilmesine karar verilmiştir.

Ca^{2+} iyonları ile deprotone haldeki karboksil gruplarının stokiyometrik oranı, jel yapısına önemli ölçüde etki etmektedir. Bu oran $R=2[Ca^{2+}]/[COO^-]$ eşitliği ile hesaplanmaktadır. Pektinin Ca^{2+} iyonları ile çapraz bağlanması karboksil gruplarının pektin zinciri üstünde (rastgele ya da bloklar halinde) dağılımına da bağlıdır. Aljinat ve LM-pektinin Ca^{2+} iyonu varlığında jelleşme mekanizmasını tanımlayan 'yumurta kutusu' adlı düzenli porlu yapının oluşabilmesi için yaklaşık 6 –14 arası deprotonate -

COO⁻ grubunun ard arda gelmesi gerekmektedir [154, 302, 321, 322]. Rastgele dizilmiş karboksil grupları ile ise daha geniş bir porlu yapı oluşabilir [282]. Bunun yanı sıra -COO⁻ gruplarının zincirin solvent tarafına uzanması gibi çeşitli sınırlamalardan dolayı da bütün -COO⁻ grupları çapraz bağ yapmayabilir. Bu durum, bütün yapı homojen olduğu halde aralarda küçük heterojen bölgeler oluşturabilir. Jel dayanımı çapraz bağlanma oranı yani Ca²⁺ iyonu konsantrasyonu arttıkça kritik bir noktaya kadar artacak, bu kritik noktanın ötesinde ise zayıflamaya başlayacaktır. Bu zayıflama aşırı çapraz bağlanma sonucu homojen olmayan bir matriksin ortaya çıkması nedeniyle gerçekleşmektedir. Bu durum ise daha büyük yüzey alanı da oluşturarak ilaç salımının aşırı derecede hızlanmasına neden olacaktır [323].

Pektin jellerinde iyonotropik jelleşme ısıtma olmadan da gerçekleşebilmektedir [302, 324] Öte yandan, LM pektin zincirlerinin jelleşme mekanizmasına pH'ın kuvvetli bir etkisi bulunmaktadır [316, 325]. konformasyonel düzen ve (i) elektrostatik itme kuvvetlerinin baskılanması, (ii) karboksil gruplarının hidrojen bağı donoru olarak davranması gibi iki farklı mekanizmayı devreye sokmaktadır [326]. 1 Hz kayma (shear) hızındaki Ca²⁺ iyonu konsantrasyonu ve pH değerinin LM-pektin çözeltileri ve jellerinin kayma modülleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, pH 3,0 koşulunun amitli olmayan pektinin kayma modülü azalırken, amitli pektine yükseltici etki yaptığını belirlemişlerdir. LM-pektinin düşük pH değerlerinde kendiliğinden jel oluşturduğu bilinmektedir. pH 2,5 değerinin altında 3-katlı yapının oluşmasıyla jelleşme geçişi olmaktadır. Bu düşük pH'da çok sayıda moleküller arası birleşme yerleri oluşarak büyük zincir kümeleri meydana gelmektedir [326]. Sawayama ve ark. [328] pH 2,5 altında seyreltik çözeltilerde dahi kümeleşme oluştuğunu tesbit etmişlerdir. Gilsenan ve ark.'nın elde ettikleri sonuçlara göre LM-pektinlerde sıcaklık ve pH düşüşü, tersinir bir şekilde daha yoğun 3-boyutlu bir yapının oluşmasına neden olmaktadır. Zincirlerin önemli ölçüde yüksüz duruma geçtiği çok düşük pH değerlerinde, aşırı kümeleşme ile 3 katlı helikal pektin yapısının antiparalel dimerler oluşmasıyla gerçekleşmektedir [326].

Diğer bir önemli dış faktör ise kurutma yöntemidir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada [303], aynı koşullarda ve formülasyonda hazırlanmış 25 ve 50 °C sıcaklıkta kurutulan LM-pektin hidrojelardan, 50 °C sıcaklıkta kurutulan hidrojin daha yavaş bir salım profili gösterdiği tespit edilmiştir. Kurutma koşulları hidrojin por büyüklüğüne ve nem miktarına etki etmekte, böylece ilaç salım profilini

etkilemektedir. Kalsiyum pektinat hidrojellerinin liyofilizasyon metodu ile kurutulduğunda, yüksek patlama salım profili verdiği, ilaç salımının çok hızlanarak kontrollü bir salım yapamadığı gözlemlenmiştir (yayınlanmamış veri, Banu Kocaaga.).

Laboratuvarımızda gerçekleştirdiğimiz paralel çalışmalar sonucunda 1 gram LM-pektin hidrojelin 70 mg CaCl_2 kullanılarak hazırlanmasına karar verilmiştir. Tezin bu bölümünde, ilaç salım performanslarının tek katmanlı olarak incelendiği [303] karıştırma, ve absorpsiyon veya şişme metotları kullanılarak sentezlenen çok katmanlı (multi layer) LM-pektin hidrojellerin katman sayısının ilaç salım performansına etkisi incelenmiştir. Kullanılan bu farklı metotlarla ilaç moleküllerinin sisteme farklı aşamalarda difüze olması sağlanmıştır [304]. Katmanlarda farklı konsantrasyonlarda çapraz bağlayıcı kullanılarak, çapraz bağlayıcı konsantrasyonunu salımı kontrol etme özeliğinden yararlanılması planlanmıştır. Özellikle ilaç salım hızının düşürülmesinin istendiği veya birden fazla ilaç molekülünün salımın yapılması gerektiği durumlarda oldukça kullanışlı olacağı düşünülen bu yöntem pektin hidrojelin uyumluluğu araştırılmıştır. Literatürde, çok katlı polimerler farklı polimerlerin etkisinden yararlanmak amacıyla farklı polimerler kullanılarak sentezlenmiştir [329, 330]. Tez çalışmasının bu bölümünde, farklı ikinci bir polimer kullanmadan, sadece pektin hidrojelin farklı hazırlama metotları ile ekonomik bir şekilde çok katlı olacak şekilde hazırlayarak, katman sayısının kontrollü salıma etkilerini incelenmiştir. Bu çalışmada, iç katmandaki ilaç yüklü pektin polimer depo bölüm olarak kullanılmış, etrafı pektin matriks ile sarılmıştır. Yapılan bu çalışma, tek bir cins polimerin hem membran hem de matriks olarak kullanıldığı özgün bir çalışmadır.

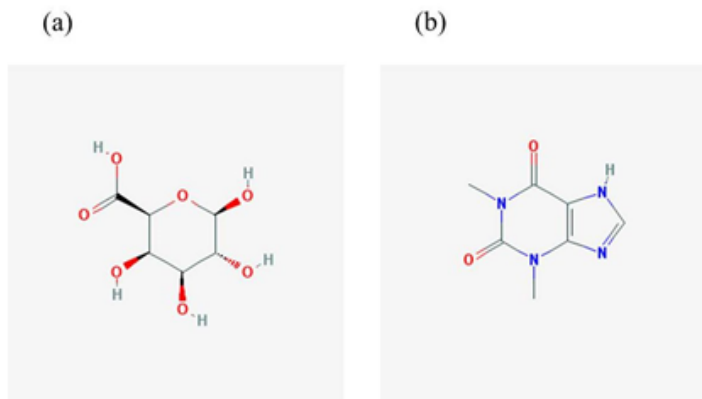
5.2 Malzeme ve Yöntemler

5.2.1 Malzemeler

Düşük metoksi (LM) amitlenmiş (%31) pektin Herbstreith & Fox firmasından temin edilmiştir. Gliserinin, molekül ağırlığı 92,09 g/mol, Labkim markadır. Teofilin Sigma-Aldrich (Düsseldorf, Almanya)' dan alınmıştır CaCl_2 ZAG marka ve 147,02 g/mol molekül ağırlığındadır.

5.2.2 Hidrojel filmlerin hazırlanması

Hidrojel filmler, %2 (ağ/ağ) LM-pektin kullanılarak iyonik jelleşme metoduyla hazırlanmıştır. Bu çalışmada plastikleştirici olarak gliserin, çapraz bağlayıcı olarak CaCl_2 , model ilaç olarak teofilin (30 mg/g-film) kullanılmıştır (Şekil 5.2). Matrise difüzyon mekanizması göz önüne alınarak hazırlanan kalsiyum-pektinat hidrojeller, CaCl_2 'nin pektin zincirlerinin deprotonlanmış karboksil gruplarıyla etkileşerek çapraz bağlamayı gerçekleştirdiği 'iyonotropik jelleşme yöntemi' kullanılarak hazırlanmıştır. Deneylerde ultra deionize su kullanılmıştır. 300 mg/ g-film (% 5 ağ/ağ) gliserin çözeltisi, 600 mg / g-film %2'lik pektin çözeltisi üzerine yavaş yavaş eklenerek iki saat boyunca oda sıcaklığında 150 d/d dönme hızındaki bir manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Ardından model ilaç teofilin sulu çözeltisi halinde bu pektin-plastikleştirici karışımlarına eklenerek, aynı koşullarda karanlık bir ortamda karıştırılmaya devam edilmiştir. Bu çözelti 24 saat sonunda, petri kaplarındaki 10 ml'lik CaCl_2 70 mg/ g-film çözeltileri üzerine dökülmüş ve $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulan 100 d/d hızında karışan bir orbital karıştırıcı içinde kendiliğinden iyonotropik jelleşme gerçekleşmiştir. Çapraz bağlanma adımının ardından örnekler kurutulmuştur. İyonotropik jelleşmeyi gerçekleştiren zincir içi veya zincir arası çapraz bağlar, pektin zincirlerindeki deprotonlanmış karboksil ve hidroksil grupları ile Ca^{2+} arasındaki etkileşim sayesinde çok hızlı bir şekilde oluşmuştur.



Şekil 5.2 : (a) Galakturonik asit monomeri (b) Teofilin molekülü.

5.2.3 Çok katmanlı filmlerin hazırlanması

Hidrojellerin katman sayısı ve film kalınlığının ilaç salım profiline etkisini belirlemek için iki katmanlı filmler hazırlanmıştır. Membran film sisteminin difüzyondaki bilinen üstünlüğünü kullanabilmek amacıyla birinci katmanda ilaç yüklü kuru pektin film çekirdek tabaka olarak kullanılmış, bu tabakanın etrafı pektin- gliserin çözeltisi ile

kaplanarak çapraz bağlanmış ve ilaç yüklü iki katmanlı hidrojel hazırlanmıştır. Çok katmanlı hidrojel filmler hazırlanırken (i) film kalınlığı, (ii) çapraz bağlayıcı (30, 50 veya 70 mg CaCl₂/ g-film) konsantrasyonu ve (iii) ilaç yükleme metodu (şişme, absorpsiyon veya karıştırma) olmak üzere üç farklı tasarım parametresinin ilaç salım profiline etkisi incelenmiştir.

İlaç yükleme metodu olarak kullanılan şişme metodunda, kuru hidrojel ilaç çözeltisi içine daldırılmış ve orbital karıştırıcı üzerinde kuruyana kadar karıştırılmıştır. Adsorpsiyon yönteminde ilaç çözeltisi, 4 saat boyunca CaCl₂ çözeltisi ile etkileşmiş olan çapraz bağlı ıslak hidrojele eklenmiş ve orbital karıştırıcı üzerinde karıştırılarak kurutulmuştur. Karıştırma yönteminde ise ilaç çözeltisi, pektin-gliserin çözeltisine eklenerek 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılıp ardından çapraz bağlanarak kurutulmuştur. Bütün deneyler, aynı koşullar altında en az üç defa tekrarlanmıştır.

5.2.4 İlaç salım performansı

İlaç yüklü filmler, belirli çapta kesilmiş, tartılmış, 60 ml dinamik yara sıvısı ortalama pH değerini taklit edebilen TRIS biyolojik tampon çözelti (pH 6,4) içeren kapaklı viallere konulmuş ve orbital çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 100 d/d'de karıştırılmıştır. İlaç salım ortamından belli zaman aralığında 700 µl sıvı numune alınarak UV-vis spektrofotometre yardımıyla, teofilin molekülünün karakteristik dalga boyu olan 271 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Kümülatif ilaç salım miktarı, bir çözeltiden geçen ışık miktarının ışığın çözelti içinde aldığı yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters, absorplanan ışık miktarı ise doğru orantılı olduğunu gösteren Lambert-Beers kanunu (Swinehart, 1962) (denklem 5.1) ile, önceden hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi (E.1, E.2) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$I = I_0 \times e^{-kc} \quad (5.1)$$

Burada I ; geçen ışığın şiddet, I_0 ; gelen ışığın şiddeti k ; absorpsiyon katsayısı, c ise konsantrasyondur. Bütün deneyler, aynı koşullar altında en az üç defa tekrarlanmıştır.

5.3 Sonuçlar ve Tartışma

Hazırlanan hidrojel filmlerin yüzeylerinde göz ile muayenede por veya çatlak saptanmamıştır. Yara örtüsü olarak kullanılması durumunda, hastaya sıkıntı vermeden yarayı izleyebilecek şekilde homojen ve transparandır. Filmlerin yüzeyinde ilaç kristallerine rastlanmamıştır (Şekil 5.3)



Şekil 5.3 : İlaçsız ve ilaçlı çok katmanlı LM-pektin hidrojel filmler.

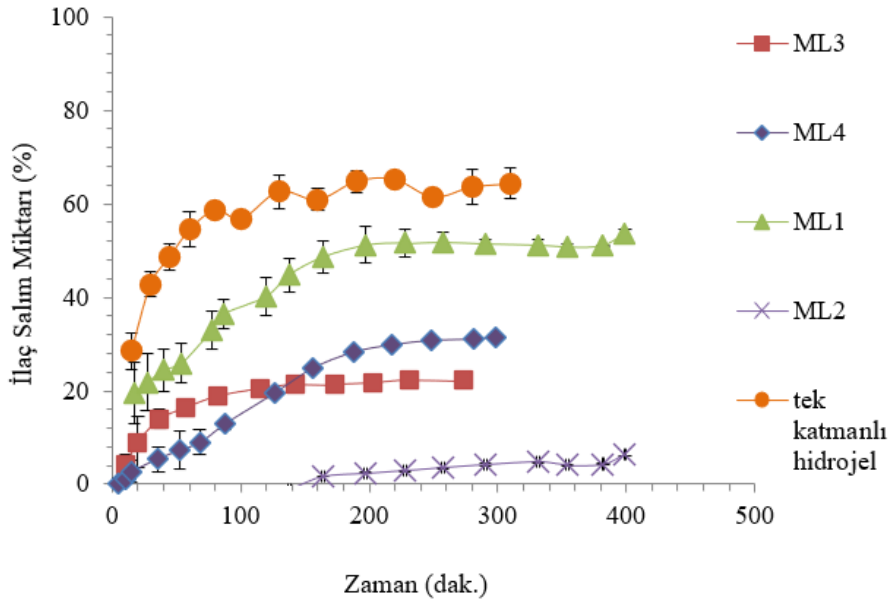
5.3.1 Katman sayısının belirlenmesi

Kontrollü ilaç salımında en etkili mekanizmalardan biri olan membrana difüzyon yöntemi kullanılarak, ilaç yüklü pektin film çekirdek tabaka olarak kullanılmış ve dört farklı formülasyonda iki katmanlı ilaç yüklü hidrojel hazırlanmıştır (Çizelge 5.1). Hazırlanan hidrojellerin ilaç salım profilleri Şekil 5.4'te görölmektedir. Burada film kalınlığı en düşük olan ML1 filmi temel alınmış ve diğer filmlerin kalınlıkları ML1 filminin kalınlığına oranlanarak 'film kalınlığı oranı' hesaplanıp aynı zamanda film kalınlığı artışının ilaç salımına etkisi gözlenmeye çalışılmıştır. Çizelgedaki ilaç yükleme yöntemi olarak ilk yazılan metot iç katman, ikinci yazılan metot ise dış katman için kullanılan metottur. Aynı şekilde CaCl_2 konsantrasyonu sütununda verilen ilk değer iç tabaka, ikinci değer ise dış tabakanın çapraz bağlayıcı konsantrasyonudur.

Çizelge 5.1 : Çok katmanlı hidrojel tasarım parametreleri. İlaç konsantrasyonu 30 mg/g-hidrojeldir.

Kod	İlaç yükleme yöntemi	CaCl₂ kons.(mg/g film)	Film kalınlığı oranı
ML1	Şişme & Absorbsiyon	50 & 50	1,00
ML2	Şişme & Absorbsiyon	50 & 50	1,73
ML3	Şişme & Absorbsiyon	70 & 30	1,19
ML4	Karıştırma & Absorbsiyon	50 & 50	1,29

ML1 ve ML2 filmlerinde her iki tabakanın da çapraz bağlanma oranı ve ilaç yükleme yöntemi sabit tutulmuş, film kalınlıkları farklı olacak şekilde hazırlanmıştır. İçteki tabakaya ilaç molekülleri şişme, dış tabakaya ise absorbsiyon metodu ile yüklenmiştir. Şişme metodunda ilaç molekülleri, çapraz bağlı filmin bünyesinde bulunan solvent nedeniyle daha hızlı şekilde difüze olacaktır. Bu tabakanın etrafı, absorbsiyon metodu ile ilaç yüklenecek pektin film ile kaplanmıştır. ML2 filminde film kalınlığı ML1'e göre 1,73 gf ise 30 mg konsantrasyonuna düşürülmüştür. Bu örnekten ilacın önemli miktarının salınmadığı ve platoya daha çabuk ulaşıldığı belirlenmiştir. Çekirdek bölümdeki ilacın çapraz bağlayıcı engelini aşmakta zorlandığı, sadece düşük çapraz bağlayıcılı dış katmandaki ilacın hızlı bir şekilde salındığı düşünülmektedir. Çift katmanlı film hazırlanırken, 70 mg CaCl₂/g-film konsantrasyonunda çapraz bağlayıcı ile hazırlanmış filmin (çekirdek tabaka) üzerine kaplanan pektin tabakası, çapraz bağlama amacıyla 30 mg CaCl₂ ile karıştırılmaktadır. Bu esnada, CaCl₂ molekülleri birinci tabakaya da difüze olacağından, çekirdek tabakanın çapraz bağlama konsantrasyonunun artırılması beklenmektedir. Şekil 5.4'te de görüldüğü gibi salım profili bu hipotezi destekleyecek şekilde gerçekleşmiştir.



Şekil 5.4 : Çok katmanlı Ca²⁺-pektinat hidrojellerinden ilaç salım profilleri.

Patlama/ani salım gözlenmeyen ML4 filminde ise, numune kalınlığı ML1 filmine göre 1,29 kat artırılıp çapraz bağlama oranı ise ML1 ve ML2 ile aynı tutularak, ilaç filme ilk katmanda karıştırma, ikinci katmanda ise adsorbsiyon metodu ile yüklenmiştir. ML4 filmi patlama salım yapmadan, kontrollü salım profiline en uyan bir salım profili sergilemiştir. Bunun özellikle, membran tabaka olarak kullanılan iç tabakanın karıştırma metodu ile sentezlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Karıştırma metodunda yüklü gruplar Ca²⁺ iyonu ile kapatılmadan önce ilaç molekülleri yüklendiği için zincir-ilaç etkileşiminin daha yüksek oranda gerçekleşeceği, dolayısıyla salım anında da ilaç moleküllerinin bulundukları yerden ayrılarak dışarıya doğru difüze olmalarının biraz vakit aldığı tahmin edilmektedir. Kümülatif salım miktarındaki önemli ölçüdeki azalma, katman kalınlığının artışıyla kaynaklanmıştır.

Tek katmanlı hidrojel ile en ince numune olan ML1 çift katmanlı hidrojeli kıyaslandığında (Şekil 5.4), ML1'in salım hızının daha düşük olduğu, platoya daha geç ulaştığı, ama yaklaşık % 15,0 oranında daha az ilaç saldırdığı belirlenmiştir. Çok katmanlı hidrojellerin çekirdek bölümüne dissolüsyon ortamının daha yavaş penetre olmasından dolayı, ilacın çözülerek salınması da daha yavaş olmaktadır. Ayrıca, ilacın hidrojel matrisden salımı için gerekli olan difüzyon yolunun önüne ikinci bir çapraz bağ engelinin de gelmiş olmasının ve bunun sonucu olarak difüzyon için gerekli olan itici gücün özellikle başlangıçta az olmasının, gecikme salımını pekiştirdiği ve ilaç salım hızını azalttığı sonucuna varılmaktadır.

5.4 Vargılar

Hazırlanan çok katmanlı hidrojellerin kontrollü ilaç salımında, film kalınlığı ve çapraz bağlanma miktarının önemli birer parametre olduğu belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, tedavinin gerekliliği için öngörülecek ilaç salım hızına, katman sayısı ve film kalınlığı ayarlanarak ulaşılabilecektir. Bu özellik pektin hidrojelinin en önemli avantajlarından birisi olarak kabul edilebilir. Tez çalışmasının ilerleyen bölümlerinde teofilin, prokain ve albümin molekülleri ile çalışılacağından, bu moleküllerin salımlarının tek katman ile kontrollü profil vereceği tahmin edilerek, tek katmanlı hidrojel kullanılarak devam edilmesine karar verilmiştir. Ancak kontrollü salım profilinden saparak yüksek oranda patlama salım ile çok hızlı salınan küçük moleküller veya polimer zincirleri ile etkileşime giremeyerek çok hızlı salınan moleküllerin salımlarını kontrol altına almak amacıyla, iç tabakası karıştırma, dış tabakası ise absorpsiyon metodu ile hazırlanan çok katmanlı pektin filmleri önerebiliriz. Çok katmanlı pektin hidrojelin art arda salınması istenenen farklı moleküllerin kullanılma durumunda da iyi sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Farklı cinsteki polimerlerin bir arada sentezlenmesinde kullanılan çok katmanlı hidrojel film, kontrollü ilaç salımı için literatürde ilk defa tek cins polimer için kullanılmıştır. Farklı metotlarla her iki tabakaya da ilaç molekülü yüklenerek salım profilinin yavaşlatılması sağlanmıştır. Çok hızlı kontrolsüz şekilde salınan veya çok düşük salım hızının istendiği durumlarda ya da iki farklı molekülün arka arkaya hasta bölgeye gönderilmesi istenene durumlar için oldukça kullanışlı bir hazırlama metodu olacağı düşünülmektedir.



6. PEKTİN HİDROJELLERDEN KONTROLLÜ SALIM İÇİN OPTİMUM İLAÇ KONSANTRASYONUN MOLEKÜLER DİNAMİK SİMÜLASYONLARIYLA TAHMİN EDİLMESİ

6.1 Giriş

Günümüzde ilaç geliştirme alanındaki değişen paradigmlar ve biyomalzeme bilimindeki gelişmelerin desteğiyle ilaç endüstrisinin odağı, mevcut ilaç molekülleri ile yeni taşıma ve salım sistemleri geliştirmek olmuştur. İlaç moleküllerinin biyoaktivitesini arttırarak hızlı ya da yavaş salımı veya kontrollü salım, hedefli salım gibi metotları geliştirmek günümüz tedavilerinin önemli hedeflerindendir [332 - 334]. Bu nedenle biyopolimerik ilaç salım cihazları, biyoaktif ajanların salımını istenilen bölgeye, istenilen hızda gerçekleştirmek üzere tasarlanmaya çalışılmaktadır.

Hidrojel matrislerde ilaç yapısı ve konsantrasyonuna bağlı olarak, matris ile ilaç arasındaki fizikokimyasal etkileşimler sonucu istenmeyen salım modeli ve/veya polimer dekompozisyonu oluşmaktadır [174, 335]. Pektin hidrojelinin yapısı moleküler boyutta özel tasarım şeklinde gerçekleştirilen yapısal değişikliklerle, hedeflenen ilaç salım uygulamasına göre tasarlanabilmektedir [2].

Hidrojel matriksden aktif bir molekülün salımı, hidrojel homojen bir yapıya sahip olduğu sürece kontrol edilebilir; yapının bozunmaya başlaması ile kontrollü salım biter. Hidrojel matrisinin kompozisyonundan kaynaklanan fiziksel ve yapısal özellikleri [336 - 338], polimerlerin moleküler ağırlığı [339], plastikleştirici ilavesi [340], çapraz bağlayıcıların konsantrasyonu, gözeneklilik gözenek boyutu [341, 342] ve kristallenme derecesi [343] bozunma davranışını belirleyen önemli etkenlerdir. Bunun yanı sıra yüksek sıcaklık [344], pH [345], çözücü, tuz ve enzimler [346, 347] gibi dış faktörler de hidrojin homojen yapısının dekompozisyonuna neden olabilmektedirler. Hidrojin aktif moleküller için bir kontrollü salım platformu olarak kullanıldığı durumlarda, aktif molekül ve hidrojel arasındaki fizikokimyasal etkileşimler de degradasyonu hızlandırabilir ya da yavaşlatabilir [2, 348-350]. Bu nedenle, hidrojel-temelli bir kontrollü ilaç salım sisteminin tasarımında, tüm

komponentlerin optimum konsantrasyonunu belirleyebilmek için bir dizi deney ve ayrıntılı analize gerek duyulmaktadır [2, 351, 352].

Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, çözünen difüzyon hızı ve salımı arasındaki ilişkiyi belirleyerek veya hidrojel ağ yapının gözenek büyüklüğüne odaklanarak, hidrojellerin kontrollü ilaç salım davranışlarını tahmin etmek amacıyla matematiksel modelleme yöntemi bir noktaya kadar kullanılabilir. Bu çalışmalar ile hidrojellerin özellikleri arasında çeşitli empirik formüller geliştirilmiştir; böylece çok küçük veya büyük solutlerin salım profilleri başarılı bir şekilde tahmin edilebilmiştir.

Öte yandan, Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları farklı moleküler yapıdaki hidrojel yapıların tasarımı için çok etkili bir yöntemdir. Tüm atom MD çalışmaları belirli bir pH ve sıcaklık koşulundaki ilaç molekülleri ve polimer zincirleri arasındaki etkileşimleri ortaya çıkartabilir. Bu simülasyonlar moleküllerin konformasyonel değişimlerini, özellikle ilaç moleküllerinin difüzyonel hareketlerini gözlemleyerek makroskopik seviyede hidrojin ilaç salım mekanizması hakkında bilgi vermektedir. Bu bağlamda MD simülasyonları belli koşullar altında uygun ilaç taşıyıcı sistemin seçilmesinde bir ön tarama aracı olarak umut vaatetmektedir. Li ve ark. [353] baicalein ilacının göz bebeğinden emilimini ve biyoyararlılığını arttırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, hazırladıkları baicalein yüklü kitosan kaplı lipid nanopartikülleri MD simülasyonları için modellemişlerdir. Zamana bağlı konformasyonel değişimleri ve enerji farkını dikkate aldıklarında baicalein molekülünün çok zayıf bir membran geçirgenliğine sahip olduğunu, bu nedenle biyoyararlılığının düşük seviyede seyrettiğini belirlemişlerdir. Shariatnia ve ark. ise grafen, N-doped grafen ve P-doped grafen dolgu kitosan polimerik kompozitler kullanarak anti-kanser ifosafamid molekülünün kontrollü salımını MD simülasyonları tekniği ile araştırmışlardır. Çalışmada farklı sıcaklıklarda difüze olan moleküller ve polimer zincirleri arasındaki etkileşim enerjileri, difüzyon katsayıları ve dönme yarıçapı gibi çeşitli dinamik özelliklerin analizi yapılmış ve kontrollü ilaç salım mekanizmasını aydınlatmak amacıyla MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir [354]. Grubumuzda gerçekleştirilen bir çalışmada [173], çapraz bağlı düşük metoksi pektin zincirlerinin, 2-tiobarbitürik asit ve model ilaç teofilin arasındaki moleküler etkileşimlerin gecikmeli degradasyon ve kontrollü ilaç salım profilini yönettiği belirlenmiştir. Grubumuz bünyesinde gerçekleştirilen moleküler baskılama çalışmasında ise, farklı fonksiyonel monomerler ile moleküler dinamik çalışması

yapılarak aday fonksiyonel monomerler belirlenmiş ve farklı çapraz bağlayıcı konsantrasyonlarında moleküler dinamik ve deneysel çalışmalar yapılmıştır [236].

Tez çalışmasının bu bölümünde, pektin hidrojellerin yüklenen ilacı kontrollü salabileceği ve ayrıca zincirlerin degradasyona uğrayıp ilaç salımının kontrollü salım profilinden sapacağı ilaç konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla, bir dizi MD simülasyonu gerçekleştirilmiş; ilaç konsantrasyonunun pektin zincirlerini dekompoze etme mekanizması araştırılmıştır. Bu amaçla 21 adet α -D-galakturonik asit monomerinden oluşan pektin oligomeri, sabit konsantrasyonda çapraz bağlayıcı Ca^{2+} iyonları ve sistematik olarak artan konsantrasyonlarda prokain moleküllerinden oluşan sistemler modellenmiştir. Her sistem için 200 ns uzunluğunda üç adet bağımsız MD simülasyonu yapılmıştır. Konsantrasyon, viskozite ve kimyasal özelliklere bağlı olan hidrojel dayanımı, filmin salım performansı için çok önemlidir. Bu amaçla pektin zincirleri çapraz bağlanmasını en az değiştiren ilaç konsantrasyonunu ön görmek için pektin zincirlerinin dinamiğine ve kovalent olmayan etkileşimlere odaklanılmıştır. Elde edilen sonuçların uygunluğunu incelemek amacıyla, MD çalışmalarına denk düşen konsantrasyonlarda prokain yüklü hidrojel filmler sentezlenmiş ve bir dizi *in vitro* çalışma yapılmıştır. Pektin/prokain sistemini modellemede kullanılan bu metodolojinin, sadece bu çalışmada kullanılan spesifik pektin ve prokain formülasyonları ile kısıtlı kalmayıp, aynı zamanda çeşitli geleneksel veya yeni ilaç taşıyıcı polimer sistemlere de uygulanabilecek şekilde olması, bu çalışmanın en önemli sonuçlarından biridir.

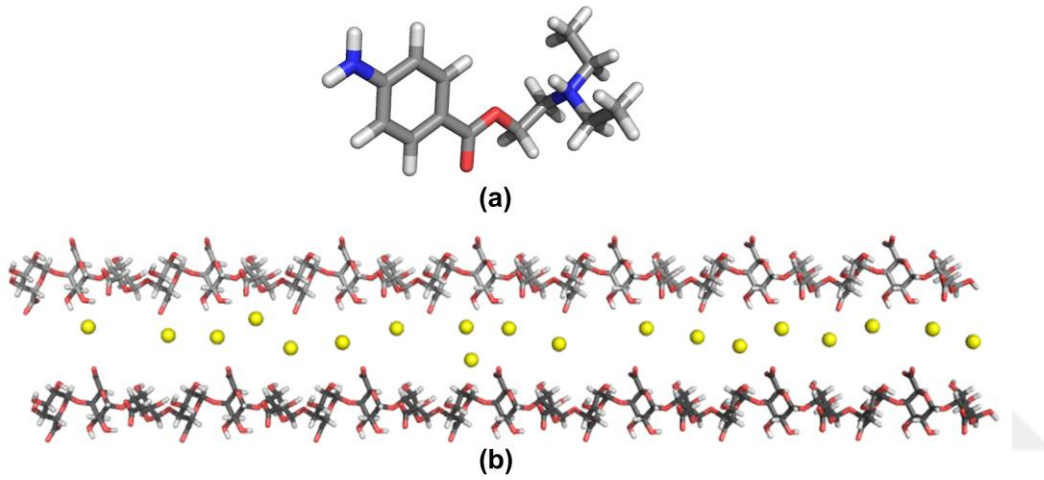
6.2 Gereçler ve Yöntemler

6.2.1 Moleküler dinamik simülasyonları

6.2.1.1 Sistemlerin modellenmesi

İlaç konsantrasyonunun pektin hidrojelinin degradasyon davranışına etkisini incelemek amacıyla model ilaç olarak prokain kullanılmıştır. Prokain ve galakturonik asit (GAL) moleküllerinin 3-boyutlu yapıları Zinc veri bankasından [355] indirilmiştir. Prokain moleküllerinin kısmi yükleri Gaussian 9.0 programında B3LYP 6-31+G** baz seti ile modellenmiş [356], CHARMM-GUI arayüzü ile parametrize edilmiştir [337] (Şekil 6.1a). Deney koşulu olan pH 7,4 ile uyumlu olacak şekilde prokain molekülü protonlanmış, GAL birimleri ise tamamı iyonize ($-\text{COO}^-$) formda

oluşturulmuştur. Başlangıç yapısı olarak pektin zincirinin iskeleti olan herbiri 21 adet GAL rezidüsü (molekül ağırlığı 4074 g/mol) Glycan Reader yardımıyla oligomere çevrilmiştir [266] (Şekil 6.1b). Bu uzunluk Ca^{2+} iyonları ile çapraz bağlanarak dimer oluşturmak için gereken en kısa uzunluk olan 9 monomer uzunluğundan fazladır [321]. Tamamen aynı yapıdaki iki PGAL zinciri, Pymol [357] programı arayüzüyle, deproton haldeki karboksil grupları birbirine bakacak ve aralarında 10 Å olacak şekilde paralel konumda yerleştirilmiştir. Ardından, 20 adet Ca^{2+} iyonu karşılıklı duran $-\text{COO}^-$ grupları arasına zincir arayüzü boyunca yerleştirilmiştir. Bu konfigürasyon bütün hidrojel ağ yapısının küçük bir bölgesini temsil etmektedir.



Şekil 6.1 : Geometrik olarak minimize edilmiş (a) protonlanmış prokain, (b) çapraz bağlı PGAL modeli. Yapılar çubuk formatında ve CPK renklendirmesi ile gösterilmiştir. Ca^{2+} iyonları sarı küreler şeklindedir.

İlaç içermeyen iki zincirli çapraz bağlı PGAL (D-0 olarak adlandırılmıştır) sistemi referans sistem olarak hazırlanmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılacak 6, 30, 60, 90 ve 180 mg.g^{-1} film ilaç konsantrasyonunu temsil eden sırasıyla 1, 5, 10, 15 ve 30 adet ilaç molekülü içeren 5 farklı model oluşturulmuştur (Çizelge 6.1). Her sistem aynı prosedür ile Pymol ve VMD kullanılarak hazırlanmıştır. Pymol arayüzü yardımıyla prokain molekülleri Ca^{2+} iyonları ile çapraz bağlı PGAL zincirlerinden yaklaşık 3 – 15 Å uzaklıkta olacak şekilde rastgele yerleştirilmiştir. Ardından, VMD arayüzü kullanılarak simülasyon kutusuna her bir yönde 20 Å boşluk bırakılarak TIP3P modeli açık su eklenmiştir [359]. Na^+ ve Cl^- iyonları fizyolojik tuz konsantrasyonuna (150 mM NaCl) ulaşacak şekilde rastgele eklenmiş, simülasyon kutusunun toplam yükü nötralize edilmiştir. İyon yerleşim işlemi simülasyonu yanlı bir sonuca doğru saptırmayacak şekilde ayarlanmıştır. Herbir sistem için 200 ns uzunluğunda 3 adet bağımsız simülasyon gerçekleştirilmiştir. Böylece, toplamda 3.6 μs uzunluğunda 18

adet bağımsız MD simülasyonu elde edilmiştir. MD simülasyonlarının analizi üç bağımsız gezege üzerinden yapılmıştır. Simülasyonlar ve deneylerde incelenen sistemlerin isimleri ve detayları Çizelge 6.1’de verilmiştir.

Çizelge 6.1 : Hesaplamalı ve deneysel çalışmalarla incelenen sistemlerin detayları.

İsim	Deneylerde kullanılan prokain konsantrasyonu (mg.g ⁻¹ hidrojel)	Simülasyon kutusundaki ilaç adeti	PGAL zincirleri adeti	Çapraz bağlayıcı Ca ²⁺ adeti	Toplam simülasyon süresi (ns)
D-0	0	0	2	20	200 × 3
D-6	6	1	2	20	200 × 3
D-15 ^a	15	-	-	-	-
D-30	30	5	2	20	200 × 3
D-60	60	10	2	20	200 × 3
D-90	90	15	2	20	200 × 3
D-180	180	30	2	20	200 × 3

^a Bu formülasyon sadece deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

Simülasyon çalışmaları CHARMM all36 kuvvet alanı [271] ve NAMD 2.7 [360] yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Başlangıç geometrisi olarak kullanılacak yapılar minimizasyon için 2000 adet konjuge gradyen adımına tabi tutulmuştur. Bu şekilde başlangıç konfigürasyonunda özellikle açık sulardan kaynaklı sterik çarpışmalar elimine edilerek sistemin enerjisi minimize edilmektedir. NPT (sabit partikül sayısı, sabit basınç, sabit sıcaklık) koşulları altındaki 10 ps uzunluğundaki dengeleme simülasyonunun ardından 200 ns boyunca NVT (sabit partikül sayısı, sabit hacim, sabit sıcaklık) simülasyonları uygulanmıştır [361]. Periyodik sınır şartları uygulanan sistem için sayısal entegrasyon *leap-frog* algoritması ile gerçekleştirilmiştir [362]. Zaman adımı, SHAKE algoritması (Andersen, 1983) [273] yardımıyla 2 fs alınmıştır. Elektrostatik etkileşimler Particle Mesh Ewald metodu ile tanımlanmış [364] ve kesme mesafesi 12 Å olarak alınmıştır. İzotermal ve izobarik sistem için Nosé-Hoover termostat [277], Langevin barostat [278] ve 12 Å dan uzak uzun mesafeli düzenlemeler için L-J [365] kullanılmıştır.

6.2.1.2 Gezinge analizi

Modellerin jelleşme dereceleri, -COO^- grupları ile Ca^{2+} iyonlarının simülasyon boyunca birbirine göre mesafelerini ortaya çıkaran radyal dağılım fonksiyonu ile hesaplanmıştır. Pektin jellerinin yapıları ayrıca dönme yarıçapı (R_g), uçtan uca mesafe (R_n), karekök ortalama kare dalgalanma (RMSF), karekök ortalama kare sapma (RMSD) sonuçlarına odaklanılarak detaylı olarak incelenmiştir. Bu yolla ilaç konsantrasyonu artışı ile hidrojel stabilitesindeki değişim araştırılmıştır.

6.2.1.3 Uçtan uca uzaklık ve dönme yarıçapı

Bir polimerin yapısal rijitliği hakkında bilgi veren uçtan uca mesafe (R_n) ve dönme yarıçapı (R_g) hakkında detaylı bilgi Bölüm 4'te verilmiştir. Polimer zincirinin çözücü içindeki büyüklüğünü belirleyen önemli bir gösterge olan R_n hesaplamaları Denklem 4.2 ile hesaplanmıştır. Bir cismin kendisi ile aynı kütleye sahip sanal halkanın yarıçapını ifade eden R_g değeri ise Denklem 4.3 ile belirlenmiştir.

6.2.1.4 Radyal dağılım fonksiyonu

Bir korelasyon fonksiyonu olan RDF analizi ile çeşitli gruplar arasındaki, hidrojen bağı, katyon-dipol bağı gibi kovalent bağ içermeyen etkileşimlerin yoğunluğu kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Bu şekilde simülasyon boyunca hangi grupların hidrojen bağı, iyon köprüsü, π - π etkileşimleri yaptığı ortaya çıkarılabilir. Bir korelasyon fonksiyonu olan RDF analizi 4. Bölümde detaylı olarak açıklanmıştır. RDF analizi için Denklem (4.1) de verilen formül kullanılmıştır.

6.2.1.5 Karekök ortalama kare sapma ve karekök ortalama kare dalgalanma

Karekök ortalama kare sapma (RMSD; root mean square deviation) makromoleküler yapılarda ve dinamikte sıklıkla kullanılan bir benzerlik ölçümüdür. İki molekül arasındaki veya aynı molekülün farklı zaman adımlarındaki yapısal farkı tarif etmektedir [366]. Molekülün (moleküllerin) yaptığı ötelenme ve dönme hareketleri yapıların belirli bir referans yapıya üst üste çakıştırılmasıyla ortadan kaldırılır. Sadece titreşimsel hareketlere odaklanılır. İstatistik hesaplamalarda çok sık kullanılan karekök ortalama kare sapma metoduyla hesaplanmaktadır (denklem 6.1):

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (r_i^X - r_i^Y)^2} \quad (6.1)$$

Burada N atom sayısı, r_i^x i. atom için hedef yapı ve r_i^y ise referans yapısıdır.

Karekök ortalama kare dalgalanma (RMSF; root mean square fluctuation) hesaplamaları makromoleküllerin yapısındaki hareketliliğin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Bölgesel olarak yapıdaki esneklik, stabilite ve yapıdaki heterojenite bu analiz ile tayin edilebilir [367]. Bir atomun ortalama pozisyonu ile o andaki pozisyonu arasındaki karekök ortalama kare mesafesini ölçmektedir.

$$RMSF_k = \frac{1}{N_s} \sum_{i=1}^{N_s} \|\vec{r}_{ik} - \langle \vec{r}_k \rangle\|^2 \quad (6.2)$$

Burada $\langle r \rangle_k$, k atomunun ortalama pozisyonudur.

6.2.1.6 Karakteristik oran C_n

Polimer zincirini ve yapısının esnekliğini tanımlayan en temel fiziksel özellikler olarak, ortalama kare uçtan uca mesafe $\langle R_n^2 \rangle$, ortalama kare dönme yarıçapı $\langle R_g^2 \rangle$ ve Flory'nin karakteristik oranı olan C_n kullanılmaktadır [368]. Bu konformasyona bağlı fiziksel özellikler topluluğun bütün konformasyonlarının ortalamasını betimlemektedir. Belirli bir çözücü ve teta sıcaklığında polimer zincirinin Gaussian zinciri veya ideal zincir modelindeki gibi davrandığı koşula teta koşulu ismi verilmektedir. Teta sıcaklığında polimer zincirindeki segmentlerin arasındaki itici ve çekici harici hacim kuvvetleri denge halinde bulunduğu için polimer zinciri ideal bir polimer gibi davranır. Teta koşulundaki polimerler topolojik olarak sadece bölgesel etkileşimleri içerdiği, birbirinden uzak segmentlerin etkileşmedikleri kabul edilir [369]. Teta sıcaklığının altında ise polimer zinciri ideal zincirden çok daha kısa hale gelip, belli bir noktada üzerine katlanıp buklüm halinden globül haline geçiş yapar.

Polimer fiziğinin mihenk taşlarından olan Flory'nin (1940) 'random coil' hipotezine göre amorf polimerlerde konformasyon sakini olarak düşünülmektedir [370]. Herbir bağın l uzunluğunda sabit olduğu ve dolayısıyla zinciri oluşturan birimlerin uzunluğunun değişmediği kabul edilir. Modelde monomerlerin arasındaki kovalent bağların serbestçe dönmesine izin verilir. Yeterince uzun, lineer sakini zincirler için ortalama kare uçtan uca mesafe $\langle R_n^2 \rangle$ bağ sayısı n ile lineer olarak değişmektedir. Flory karakteristik oranı ise C_n Denklem 6.3 ile tanımlanmıştır. Burada l^2 ortalama kare bağ uzunluğudur. Bu bölümde sunulan C_n hesaplamalarında da PGAL zincirini üzerindeki sakkarit halkalarının rijit olduğu ve zincir esnekliğinin glikoliz bağlarının değişiminden kaynaklandığı varsayılmıştır [371].

$$C_{\infty} = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{\langle R^2 \rangle}{nl^2} \quad (6.3)$$

6.2.2 Deneysel yöntemler

6.2.2.1 Malzemeler

Düşük metoksi (LM) (%31) amitlenmiş pektin Herbstreith & Fox firmasından (Neuenbürg, Almanya) temin edilmiştir. Gliserol (%99 saflık), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, TRIS (2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol) ve prokain-HCl Sigma-Aldrich (Düsseldorf, Almanya)'dan alınmıştır. Bütün kimyasallar analitik saflıktadır, ayrıca saflaştırma işlemi yapılmamıştır. Deneylerde laboratuvarıda üretilen saflıkta ultra deiyonize su kullanılmıştır.

6.2.2.2 Hidrojel filmlerin hazırlanması

Hidrojel filmler, detayları Bölüm 5'te verildiği gibi %2 (ağ/ağ) LM pektin kullanılarak iyonik jelleşme metoduyla hazırlanmıştır [2, 124]. Filmler, MD simülasyonlarında modellenen yapıları temsil edecek şekilde çapraz bağlayıcı CaCl_2 (70 mg g⁻¹ film) ve 6, 15, 30, 60, 90 ve 180 mg g⁻¹ film konsantrasyonlarındaki model ilaç prokain ile matrise difüzyon mekanizması göz önüne alınarak hazırlanmıştır. Bunun için ilk olarak, pektin çözeltisi ile pH 6,4 ortamında çözölmüş prokain çözeltileri 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde 100 d/d dönme hızında karıştırıldıktan sonra, petri kaplarındaki 10 ml'lik CaCl_2 70 mg.g⁻¹ film çözeltileri üzerine dökülmüş ve kendiliğinden iyonotropik jelleşme ile çapraz bağlanma gerçekleşmiştir. İyonotropik jelleşmeyi gerçekleştiren intermoleküler veya intramoleküler çapraz bağların oluşumu, pektin zincirlerindeki deprotonlanmış karboksil ve hidroksil grupları ile Ca^{2+} arasındaki etkileşim nedeniyle çok hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Karışım, kuru hidrojel film elde etmek için 25 ± 1 °C' de orbital çalkalayıcıda kurutulmuştur.

6.2.2.3 İlaç salım performansı

İlaç yüklü kuru filmler, 7 mm çapında kesilerek tartılıp, 60 ml dinamik yara sıvısı ortalama pH değerini taklit eden TRIS biyolojik tampon çözelti (pH 6,4 TRIS) içeren kapaklı viallere konulmuş ve orbital çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 100 d/d'da karıştırılmıştır. İlaç salım ortamından belli zaman aralığında 800 µl sıvı numune

alınarak UV-vis spektrofotometre yardımıyla, prokain molekülünün karakteristik dalga boyu olan 289,9 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Ölçülen absorbans, daha önceden hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi (Şekil E.3, E.4) yardımıyla, Lambert-Beers kanunu (denklem 5.1) kullanılarak konsantrasyon değerine çevrilip, ilacın yüzde salımı hesaplanmıştır. Bütün deneyler, aynı koşullar altında en az üç defa tekrarlanmıştır.

6.2.2.4 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi, Perkin-Elmer DSC4000 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Numeneler, kapalı Al-pan'lar içinde -75°C ile 300°C aralığında, $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hızında ısıtılmışlardır. Azot gazı 50 mL min^{-1} akış hızında kullanılmıştır.

6.2.2.5 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Kuru hidrojel filmlerin ara kesit morfolojik incelemesi Jeol (JSM-6390) marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Hidrojel parçaları azot gazına 5 dakika batırılmış ve donmuş parçacıklar bir spatül yardımıyla ortadan kırılmıştır. Ardından Quorum marka kaplama cihazıyla platin ile kaplanarak analize hazır hale getirilmiştir.

6.2.2.6 Reolojik analiz

Hidrojellerin reolojik analizi Anton Paar physica MCR 301 reometre kullanılarak ölçülmüştür. Numune sıcaklığı VT2 viskotermi ile kontrol edilmiştir. İlaçsız pektin (D-0) ve 6 farklı konsantrasyonda ilaç içeren pektin hidrojelleri (D-6, D-15, D-30, D-60, D-90 veya D-180) (Çizelge 6.1) hidrojelleri, çapraz bağlandıktan 2 saat sonra ağızları parafilm ile dikkatlice sarılmış ve 1 gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildikten sonra numunelerin viskoelastik davranışları araştırılmıştır. Bu deneyler osilasyon modunda, oda sıcaklığında 25 mm çaplı konik paralel plaka (PP25) geometrisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde GAP 2.9 mm olarak alınmıştır. 10 rad s^{-1} sabit frekansta gerinim taraması yapılarak lineer viskoelastik bölge belirlendikten sonra $10 - 0.1\text{ rad s}^{-1}$ aralığında depolama (G') ve kayıp modülünü (G'') belirlemek amacıyla frekans taraması testi uygulanmıştır. Bütün deneyler, aynı koşullar altında en az üç defa tekrarlanmıştır.

6.2.2.7 Şişme oranı

Hidrojel filmler, şablon kullanılarak 7 mm çapta parçalara kesilmiş, bir gece boyunca, 30° C’de vakum etüvüne konularak nemi giderilmiş, ardından biyolojik ortamı taklit eden pH 6,4 TRIS tampon içinde bekletilerek, sabit ağırlığa ulaşana kadar belli zaman aralığında tartım yapılmıştır. Bütün deneyler, aynı koşullar altında en az üç defa tekrarlanmıştır.

6.2.2.8 Hidrojellerden kalsiyum salımı

Çözeltilerdeki Ca^{2+} konsantrasyonları ICP (İndüksiyonla birleşmiş plazma kütle spektrometrisi) (ICP-OES Optima 2100 DV) ile ölçülmüştür. Belli çapta kesilmiş hidrojel numuneleri, içinde 60 ml pH 6,4 TRIS tampon çözelti bulunan viallere konulmuş ve bir orbital karıştırıcı üzerinde dengeye ulaşana kadar 5 saat boyunca 100 d/d hızında karıştırılmıştır. Bütün deneyler aynı koşullar altında en az üç defa tekrarlanmıştır.

6.3 Sonuçlar ve Tartışma

6.3.1 Moleküler dinamik simülasyonları

İlaçsız PGAL hidrojel ve 5 farklı PGAL-prokain sistemi için, açık su modeli kullanılarak tüm-atom MD simülasyonları uygulanmıştır. Simülasyonların yakınsamaları enerji ve karekök ortalama kare sapmaları (RMSD) profilleri incelenerek kontrol edilmiştir. Her bir sistem için 3 adet bağımsız 200 ns simülasyon yapılmış, ardından analizler için bu veriler birleştirilmiştir. Bu yolla hidrojel ağ yapının stabil olduğu kritik prokain konsantrasyonu tahmin edilmiş ve böylece kontrollü ilaç salım davranışları öngörülmüştür. Hesaplamalı sonuçların doğruluğunu test etmek amacıyla prokain yüklü pektin hidrojeller sentezlenerek klasik protokolle karakterize edilmiş, şişme, ilaç ve iyon salım, en sonunda da reoloji deneyleri yapılmıştır. Elde edilen deneysel veriler simülasyon sonuçları ışığında tartışılmıştır.

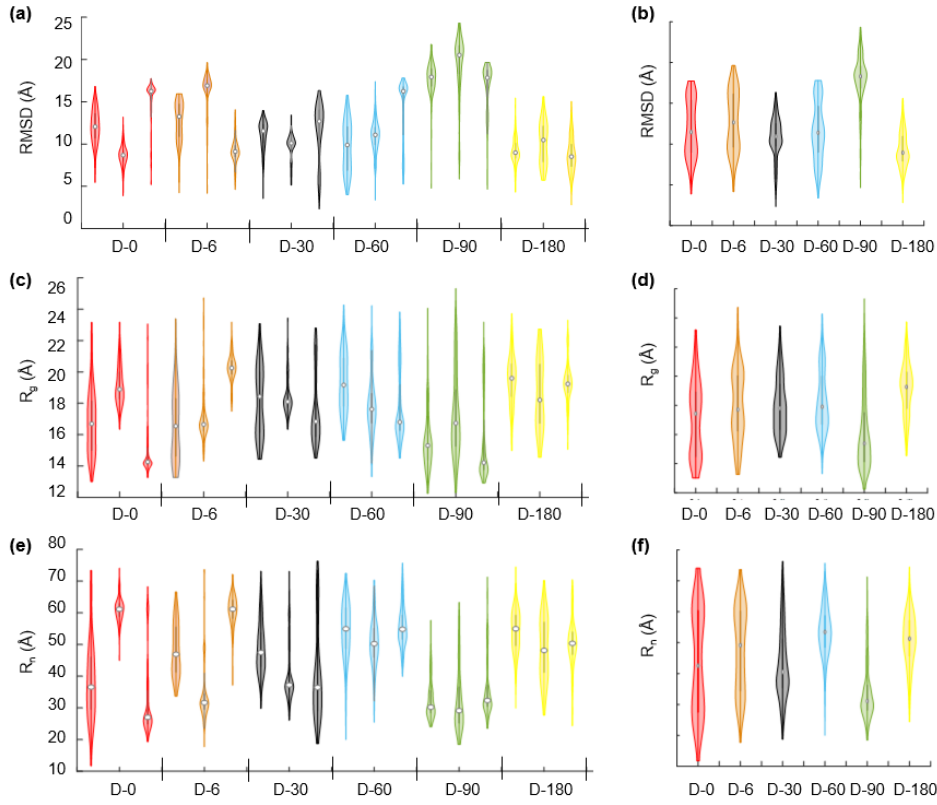
6.3.1.1 PGAL ve prokain sistemlerinin moleküler dinamik simülasyonları

RMSD, çapraz bağlı hidrojellerin $t=0$ ns’deki başlangıç yapılarından yapısal sapmalarını ölçmektedir. Daha küçük yapısal sapma, kompleksin iki halinin (başlangıç ve o andaki) uzaysal olarak benzer olduğunu göstermektedir. Bu bölümde, zincirlerin

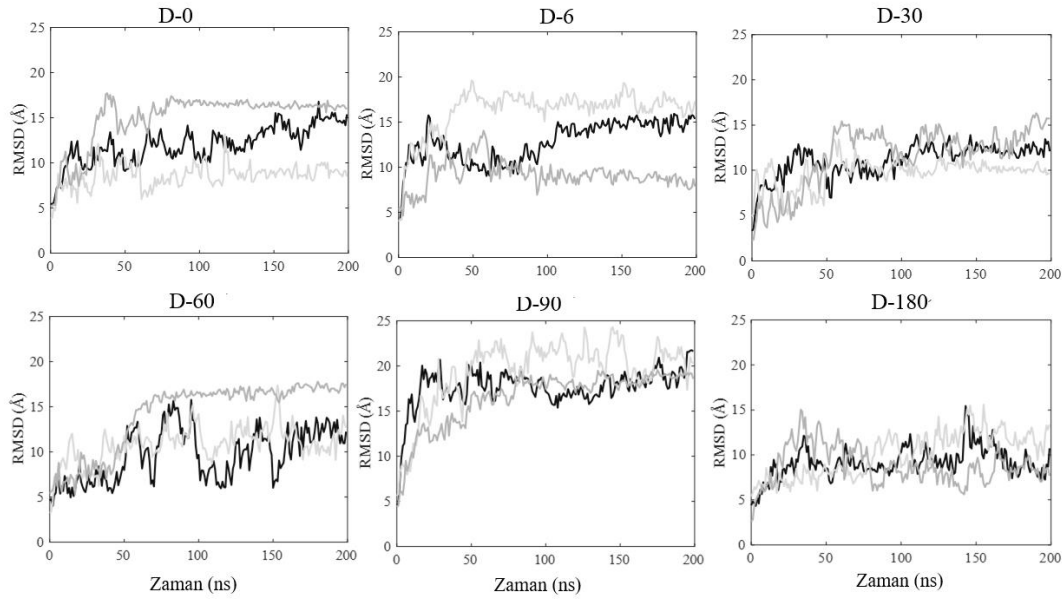
dinamik davranışını daha gerçekçi bir şekilde yansıtacak her sistem için (toplamda 600 ns) üç bağımsız simülasyona dayalı bulgular tartışılmıştır.

Şekil 6.2a'da her bir bağımsız simülasyon, Şekil 6.2b'de ise bağımsız simülasyon verilerinin bir arada olduğu toplam örnekleme için RMSD verilerinin viyolin dağılımı görülmektedir. Bu verilerin zamana bağlı değişimleri ise Şekil 6.3'te verilmiştir. Yüksek RMSD değerlerine sahip formülasyonlarda, simülasyon süresi boyunca zincirler ilk konfigürasyonlarından sapmış, zincir boyunca birkaç monomer çifti çapraz bağlanmasını kaybetmiştir. Kimi zincir çiftleri simülasyon boyunca kaybettikleri bağların bir kısmını yeniden kazanmıştır (Şekil 6.3). D-0 (çapraz bağlı prokainsiz yapı), D-6 ve D-60 formülasyonları zincirleri benzer RMSD dağılımı vermişlerdir (Şekil 6.2b). D-30 ise düşük medyan ve çeyrekler açıklığı (*inter-quartile range*- IQR) değeri ile yapısal deformasyonunun istikrarlı olduğunu göstermektedir (Çizelge 6.2). D-90 sistemindeki çapraz bağlı zincirlerin RMSD dağılımı bütün bağımsız simülasyonlarda önemli oranda değişmekte ve yüksek RMSD değerlerine ulaşmaktadır. En yüksek prokain konsantrasyonuna sahip D-180 formülasyonunun RMSD sonuçları hem bağımsız simülasyonlar için ayrı ayrı hem de toplu olarak incelendiğinde, çapraz bağlı zincirlerin, başlangıç konformasyonlarına göre fazla bir yapısal deformasyona uğramadığı görülmektedir.

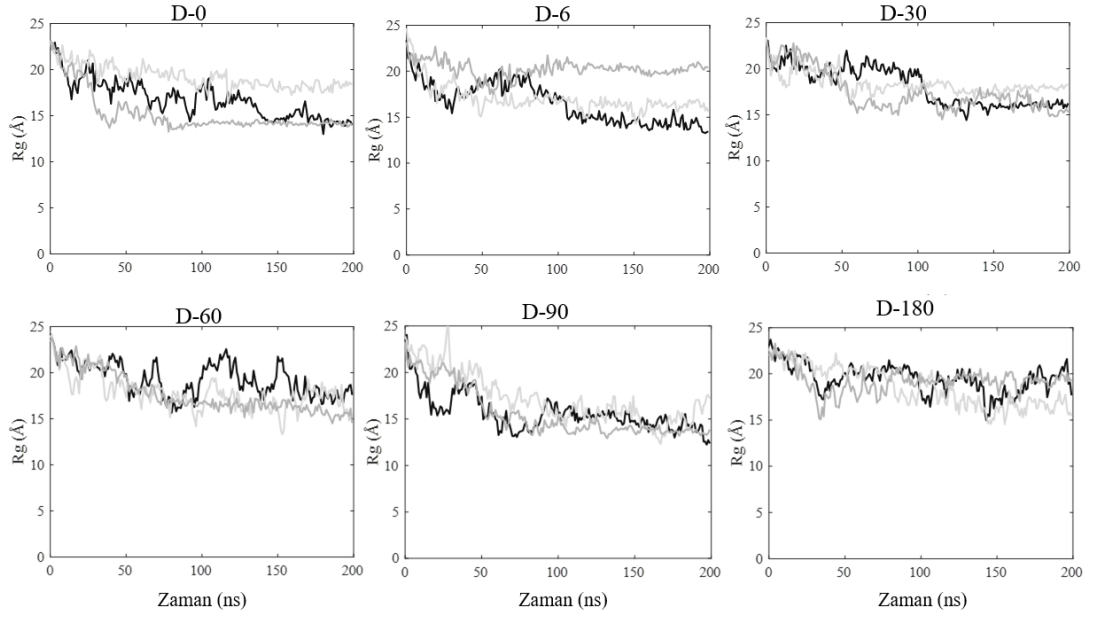
Çapraz bağlı zincirlerin dönme yarıçapı (R_g) hesaplamaları (Şekil 6.2c, 6.2d ve Şekil 6.4) RMSD dağılımları ile uyumlu sonuçlar vermiştir. En kompakt konformasyondaki D-90 zincirleri en düşük R_g değerine sahip zincirlerdir. Prokainsiz PGAL zincirlerinin ortalama R_g değeri 17,4 Å olarak hesaplanmıştır (Çizelge 6.2). Bu değer PGAL jellerinin farklı konsantrasyonlarda Ca^{2+} iyonu varlığında ışık saçılımı deneyleri ile elde edilen ve $R_g \propto M_w^\alpha$ ($\alpha = 0.32$) oranı ile hesaplanan 17,8 Å R_g değeri ile uyumludur [372]. D-90 zincirleri en kompakt, D-180 zincirleri ise en yüksek R_g değeri ile en uzun konformasyonda bulunan yapıdadır.



Şekil 6.2 : Çapraz bağlı PGAL zincirlerinin dinamik özellikleri violin grafikleri (a) RMSD, (c) R_g , (e) R_n her bir bağımsız simülasyon için ayrı ayrı gösterilmiştir. D-0 (kırmızı), D-6 (turuncu), D-30 (siyah), D-60 (mavi), D-90 (yeşil) and D-180 (sarı). 3 bağımsız simülasyon gezintileri birleştirilerek (b) RMSD, (d) R_g ve (f) R_n çizilmiştir.



Şekil 6.3 : Zincirlerin zamana bağlı RMSD değerleri.



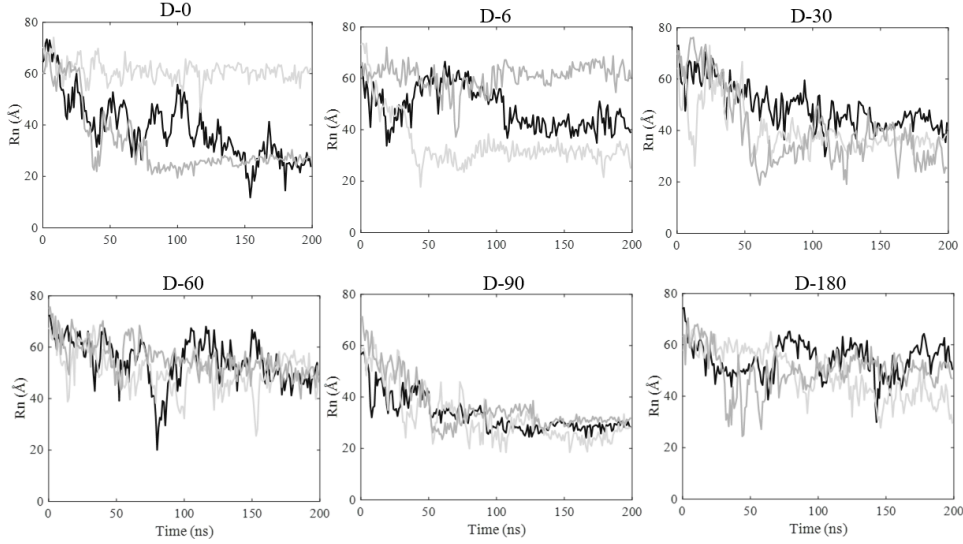
Şekil 6.4 : Zincirlerin zamana bağlı dönme yarıçapı değerleri.

Çizelge 6.2 : Modellenen yapıların medyan ve çeyrekler açıklığı hesaplamaları.

	R_g (Å)		R_n (Å)		RMSD (Å)		RMSF (Å)		$ (d(t)-d(0)) $ (Å)	
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR
D0	17.4	4.4	42.5	32.9	11.5	6.4	4.3	4.1	2.3	3.9
D6	17.7	3.8	49.2	25.8	12.7	6.5	5.1	3.7	2.0	4.7
D30	17.8	3.1	40.5	15.8	10.9	2.7	3.6	3.1	1.5	2.4
D60	17.9	3.3	53.4	10.2	11.4	5.6	4.3	3.5	1.9	3.2
D90	15.4	3.4	31.1	8.1	18.3	2.7	7.8	4.5	5.4	9.8
D180	19.0	2.5	51.3	11.6	8.9	3.0	3.5	2.2	1.4	2.6

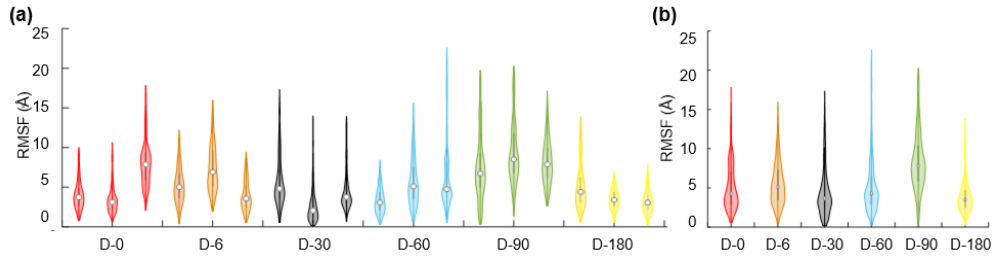
Polimer zincirlerinin dinamiği, çapraz bağlı zincirlerin zamana bağlı uçtan uca mesafe (R_n) profilleri ile de incelenmiştir (Şekil 6.2, 6.5). Bu hesaplamalar çapraz bağlı zincirlerin rijitliği hakkında bilgi vermektedir. Şekil 6.2e ve 6.2f’de zincirlerin sırasıyla bağımsız simülasyonlardaki ayrı ayrı ve bütün simülasyonlar beraber R_n dağılımları verilmektedir. Prokain içermeyen çapraz bağlı zincirlerin R_n değeri 42.5 Å

medyan ile 10-70 Å arasında bir dağılım vermiştir. Bu değer literatürde yayınlanmış olan pH 7 ortamında 30-40 Å arasında R_n dağılımı gösteren düşük metoksi pektin dekamerleri R_n değerleri ile uyumlu bir değerdir [301]. R_n dağılımlarında D-60 ve D-180' in zincirlerinin rijitliğini koruduğu, D-90'ın ise oldukça esnek bir yapı olduğu açık bir şekilde ortaya konulmaktadır.

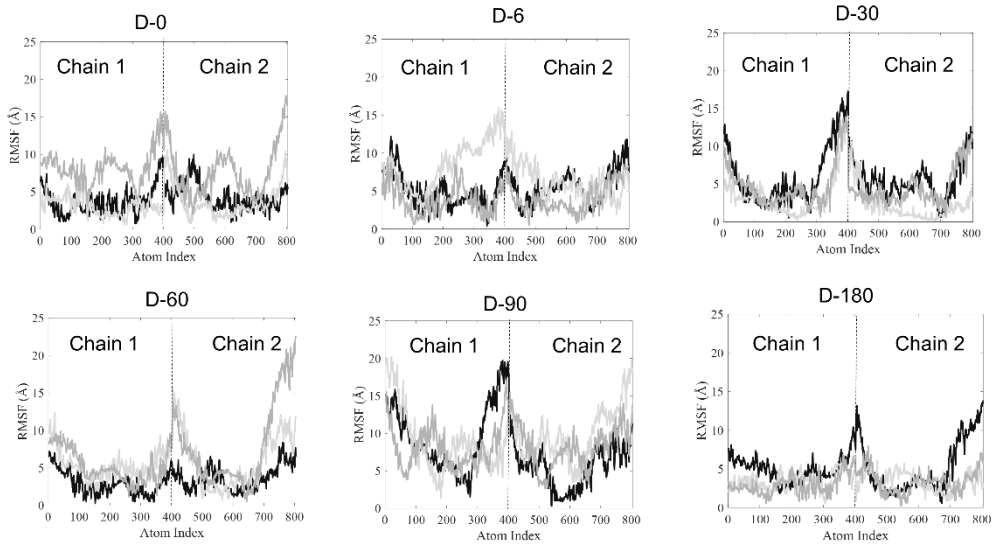


Şekil 6.5 : Zincirlerin zamana bağlı uçtan uca mesafe değerleri.

RMSD, R_g ve R_n analizleri polimer zincirlerinin globular hareketleri ve toplam esneklikleri hakkında bir fikir vermektedir. Atomların hareketliliği hakkında bir yorum yapabilmek için ise RMSF (karekök kare ortalama dalgalanma - *root mean squared fluctuation*) analizi yapılmıştır. RMSF hesaplaması için, konformasyonların başlangıç yapılarının yapısal hizalaması yapılarak zincirlerin katı cisim hareketleri elimine edilmiştir. RMSF değerleri dağılımı Şekil 6.6'da her bir sistem için verilmiş, Şekil 6.7'de ise her bir atom için ayrı ayrı çizilmiştir. D-90 zincirleri, diğer sistemler ile karşılaştırıldığında yüksek bir medyan ve IQR ile geniş bir dalgalanma göstermektedir (Çizelge 6.2). Zincirlerin çözelti içindeki yüksek hareketliliğin sonucu ortaya çıkan bu yüksek RMSF değerleri, zincirlerin daha esnek olduğunu ortaya çıkaran düşük R_n değerleri ile uyumludur. D-180 zincirlerindeki atom hareketliliğinin düşük olması, R_n verilerinden çıkartılan zincirlerin daha rijit bir yapıda olduğu sonucunu desteklemektedir.

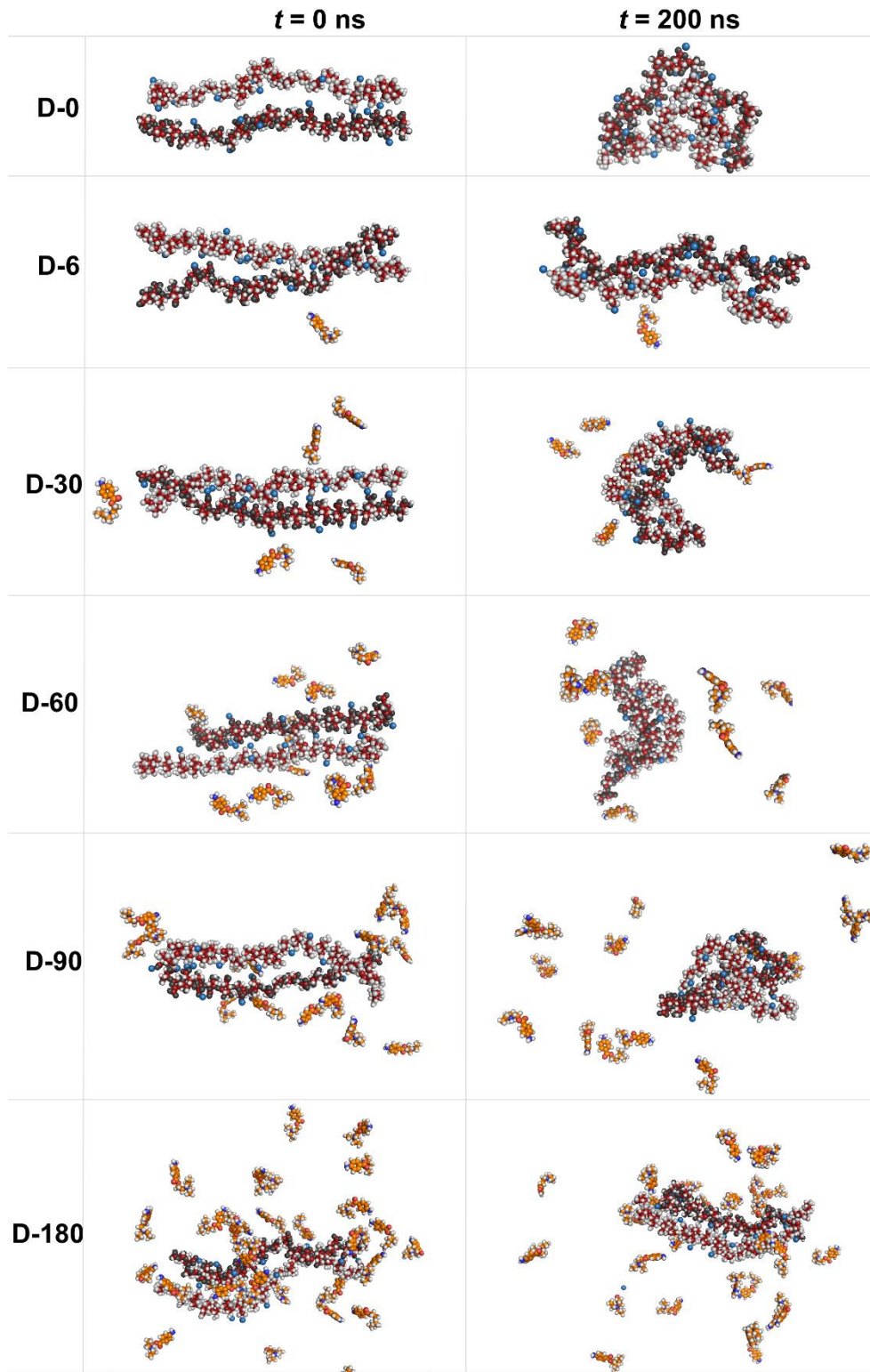


Şekil 6.6 : Zincir atomlarının RMSF viyolin dağılımları (a) her bir bağımsız simülasyon için ayrı ayrı ve (b) 3 bağımsız simülasyon gezintileri birleştirilerek çizdirilmiştir.

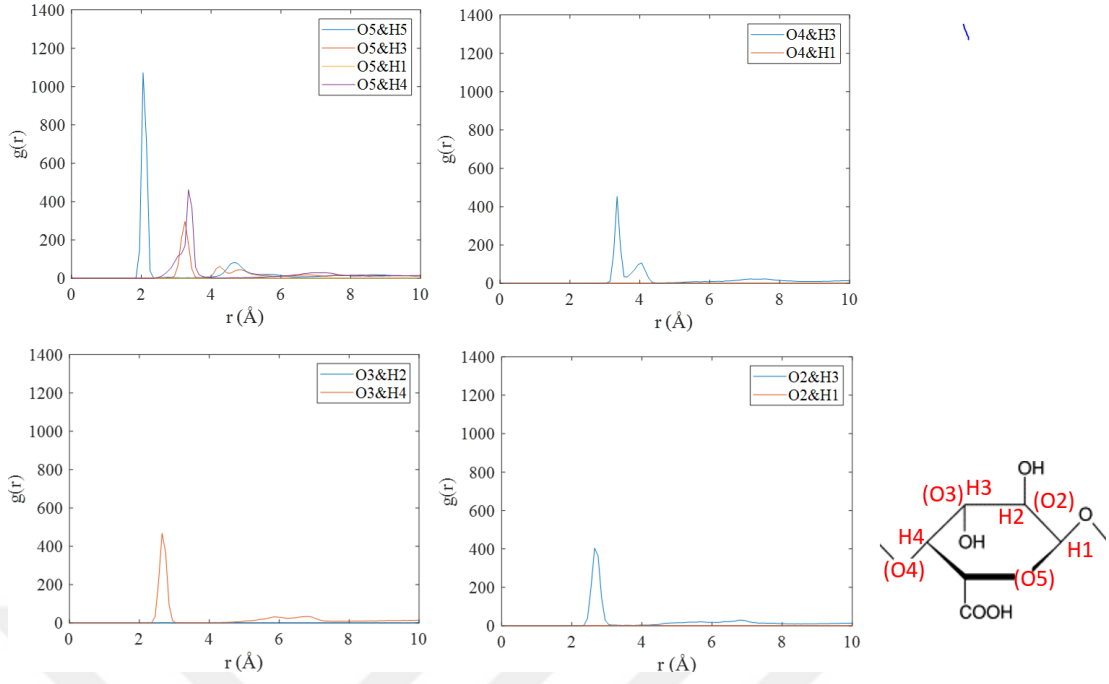


Şekil 6.7 : Zincir atomlarının RMSF değerleri.

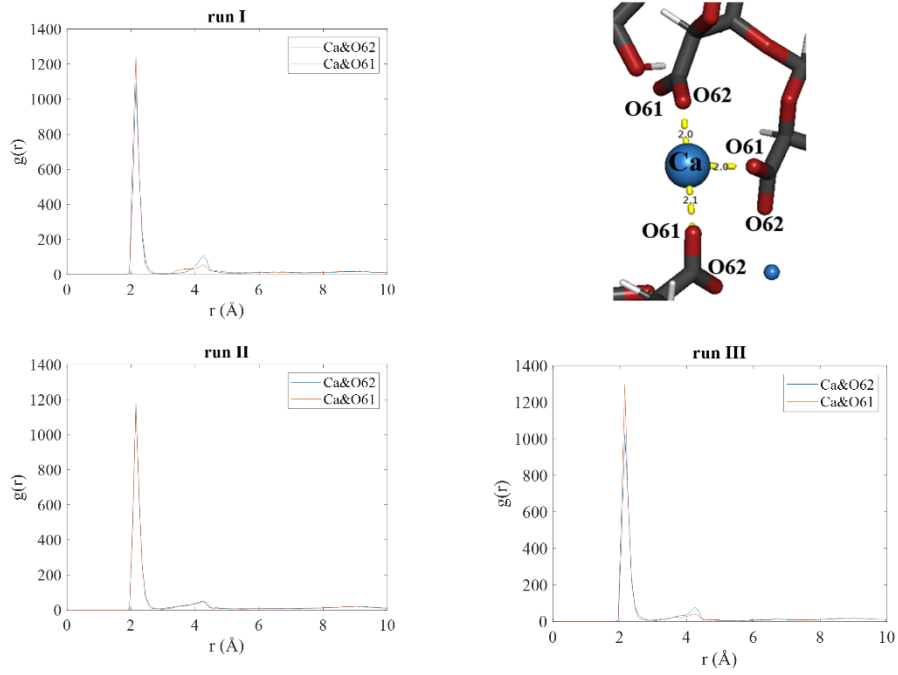
Ardından, komplekslerdeki Ca^{2+} iyonlarının çapraz bağlanma pozisyonları kontrol edilmiştir. Şekil 6.8’de görüldüğü gibi zincirler önemli ölçüde yapısal sapmalara uğradıkları durumda dahi çapraz bağlayıcılar zincirlerin yakınında kalmıştır. İki PGAL zinciri arasındaki zincirler arası moleküler etkileşimlerin kapsamını anlamak amacıyla, radyal dağılım fonksiyonu (RDF) kullanılmıştır. Modellenen yapılarıdaki zincirler arasında az sayıda hidrojen bağı olduğu belirlenmiştir. Şekil 6.9’ da halka oksijenlerinin hidrojen atomları ile yaptığı etkileşimler görülmektedir. Ancak Ca^{2+} iyonlarının GAL birimlerinin karboksilat grupları ile önemli derecede ~ 2.0 Å mesafesinde etkileştiği hesaplanmıştır (Şekil 6.10). GAL halkasındaki hidroksil veya eter oksijenleri Ca^{2+} iyonu ile etkileşime çok az girmektedir. Bu noktada çapraz bağlanmayı $-\text{COO}^- - \text{Ca}^{2+}$ etkileşiminin domine ettiği söylenebilir.



Şekil 6.8 : Modellenen yapıların simülasyon başlangıç ve bitimindeki anlık görüntüleri.



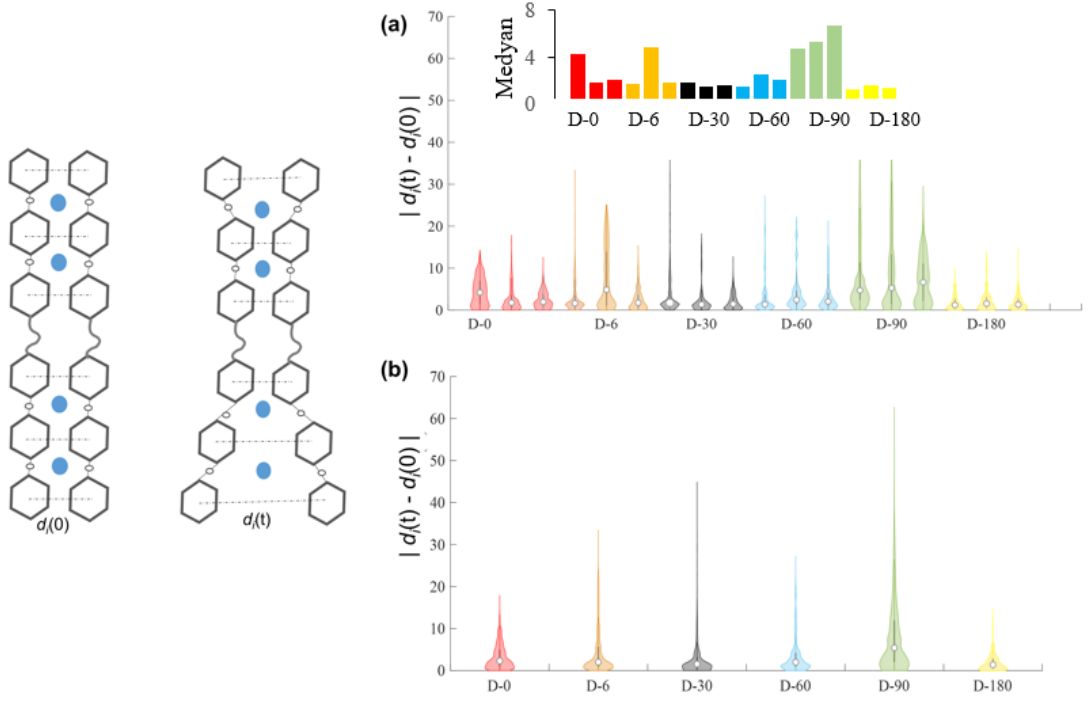
Şekil 6.9 : İlaçsız pektin zincirlerindeki (D-0) Oksijen atomları - halka hidrojenleri etkileşimleri.



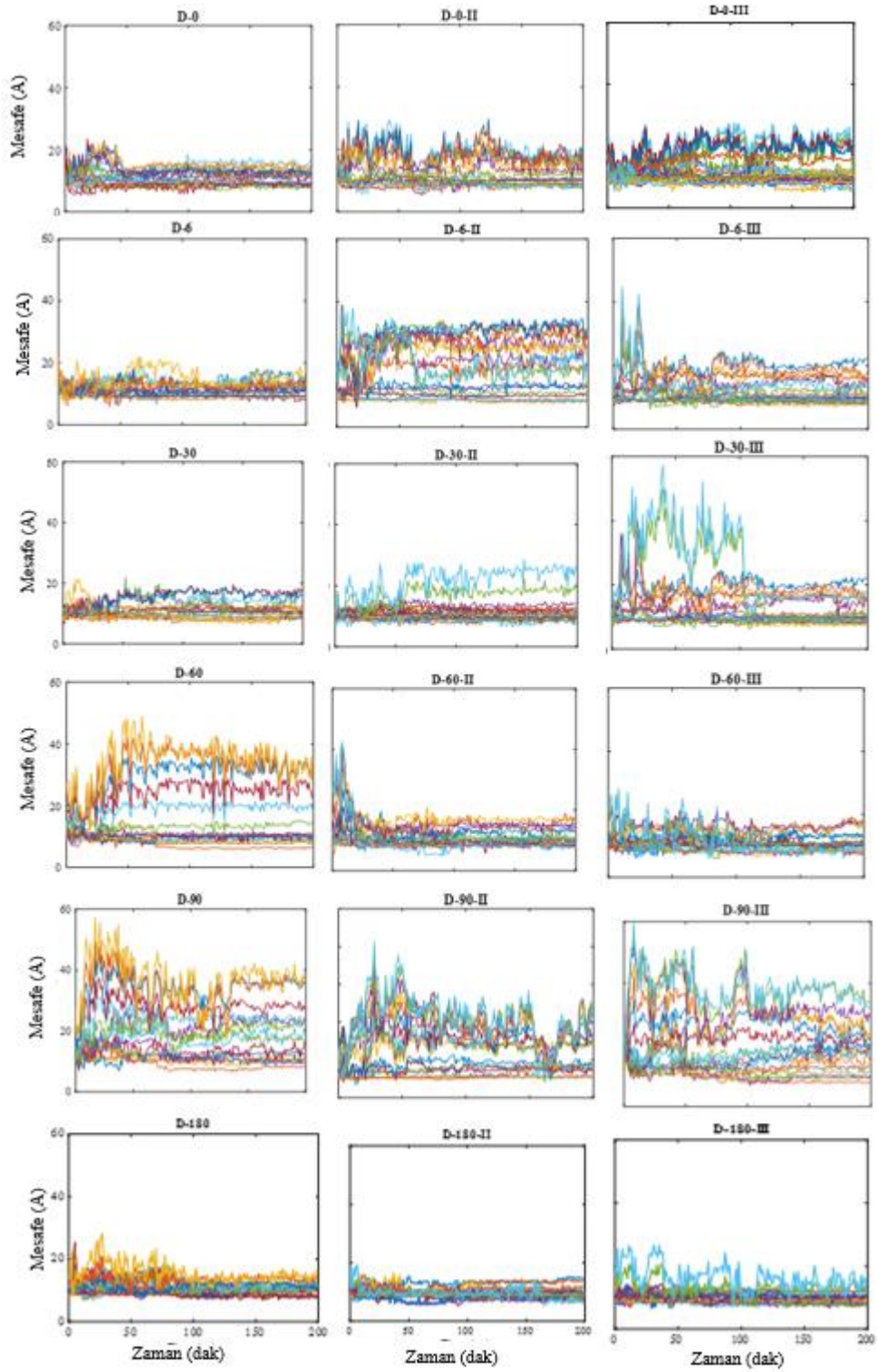
Şekil 6.10 : Ca²⁺ iyonlarının galakturonik asit monomerlerinin karboksilik asit gruplarıyla yaptığı etkileşimler için RDF analizi.

Şekil 6.8 incelendiğinde, zincirler büyük oranda yapısal sapmalara uğradıklarında bile çapraz bağlayıcı Ca^{2+} iyonlarının zincir ara yüzlerinden ayrılmadıkları görülmektedir. Zincirler yapısal deformasyona uğradığında, zincirler arasındaki mesafe de açılacağından bu durum kuvvetli çapraz bağlanmayı zayıflamaya uğratacaktır. Şekil 6.8’de görüldüğü gibi bazı Ca^{2+} iyonları iki PGAL zinciri arasındaki çapraz bağlanmayı korurken, bir çoğunda Ca^{2+} iyonlarının sadece bir tek karboksilat grubu ile etkileşmektedir.

Çapraz bağlanma seviyesi ile ilgili daha detaylı bir analiz yapabilmek amacıyla karşı zincirler arasındaki en yakın iki GAL biriminin kütle merkezleri arasındaki mesafe $d_i(t)$ hesaplanmış ve ilk $t=0$ ns’deki mesafeden sapmaları $\text{abs}(d_i(t) - d_i(0))$ ile hesaplanmıştır (Şekil 6.11 ve 6.12). Burada $d_i(0)$, $t=0$ ns’deki başlangıç mesafesidir. İlaçsız D-0 formülasyonu için mesafe dalgalanmaları iki PGAL zinciri arasındaki çapraz bağlanmadaki durumu ifade etmektedir; bu nedenle bu hesaplamalar ilacın çapraz bağlara olan etkisini ortaya çıkarmaktadır. İlaçsız sisteme (D-0) çok düşük konsantrasyonda prokain ilavesi (D-6) zincirlerin dinamik davranışını değiştirmemiş gibi görünmektedir. Prokain konsantrasyonunu bir miktar daha arttırıldığında ise (D-30), mesafe dalgalanmalarının hem medyan hem de IQR değerleri düşük hesaplanmıştır ((Tablo 6.2 ve Şekil 6.11). Bu formülasyonda GAL çiftleri arasındaki çapraz bağlanmanın önemli oranda korunduğunu görülmüştür. D-60 mesafe dalgalanmalarının D-30’a yakın bir dağılım verip vermediğini ölçmek için Wilcoxon testi (Wilcoxon rank sum) uygulanmıştır. D-30 ile D-60 dağılımlarının farklı dağılıma sahip oldukları $p = 1.6 \times 10^{-73}$ değeri ile ortaya konulmuştur. Çapraz bağlı D-180 zincirleri yüksek oranda prokain varlığında birbirlerinden ayrılmamaktadırlar.



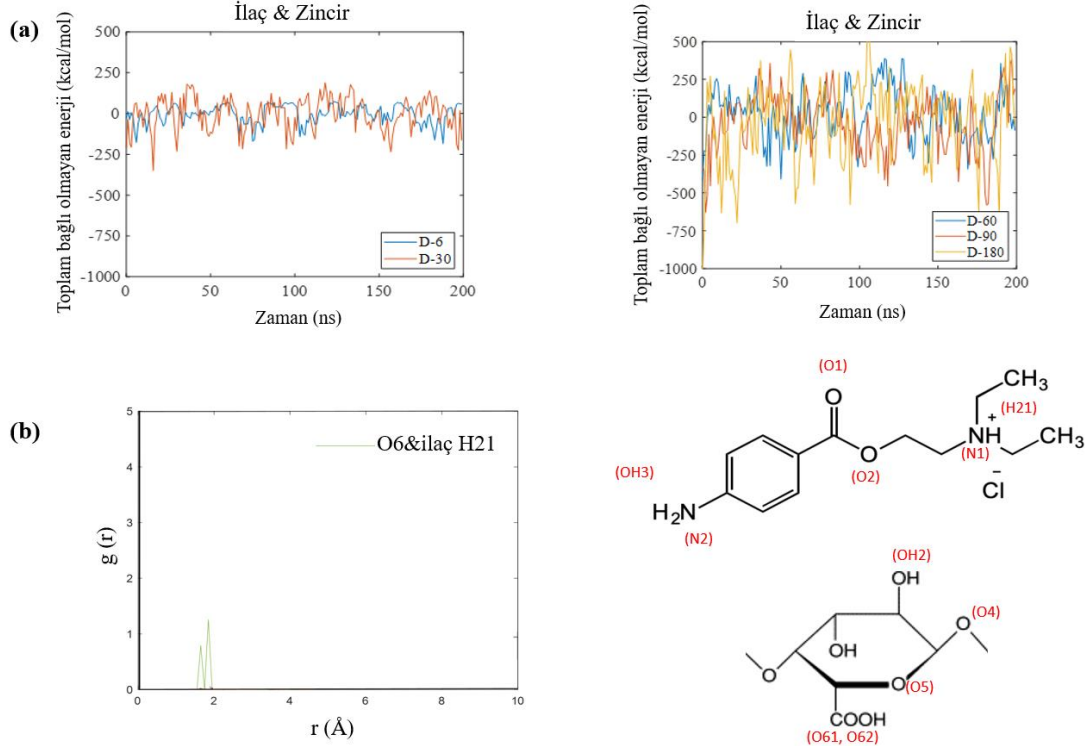
Şekil 6.11 : Farklı zincirlerdeki birbirlerine bakan en yakın GAL monomerleri arasındaki mesafe dalgalanmaları violin grafikleri. Her bir formülasyon için (a) 3 bağımsız simülasyon ayrı ayrı (b) 3 bağımsız simülasyon gezinimleri birleştirilerek çizdirilmiştir.



Şekil 6.12 : Farklı zincirlerdeki birbirlerine bakan en yakın GAL monomerleri arasındaki mesafelerin zamana bağlı değişimi. Her bir simülasyon için ayrı ayrı çizdirilmiştir.

Zincirler arasındaki stabilizasyon veya çapraz bağlanmanın bozulmasının temel nedeni prokain ve PGAL zincirleri arasında sık sık tekrarlanan bağ içermeyen etkileşimlerdir. Artan ilaç konsantrasyonu ile van der Waals ve elektrostatik

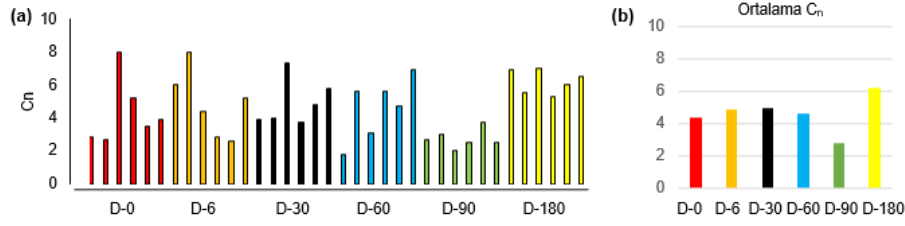
etkileşimlerin şiddeti de artış göstermektedir (Şekil 6.13). Bu etkileşimler aynı zamanda PGAL zincirlerinin $-\text{COO}^-$ grupları ile prokain üzerindeki ester gruplarının arasındaki $-\text{NH}$ ile hidrojen bağlarını da içermektedir (Şekil 6.12).



Şekil 6.13 : Polimer zincirleri ile ilaç molekülleri arasındaki (a) kovalent bağ içermeyen etkileşimler, (b) RDF analizi sonuçları.

6.3.1.2 Karakteristik oran hesaplamaları

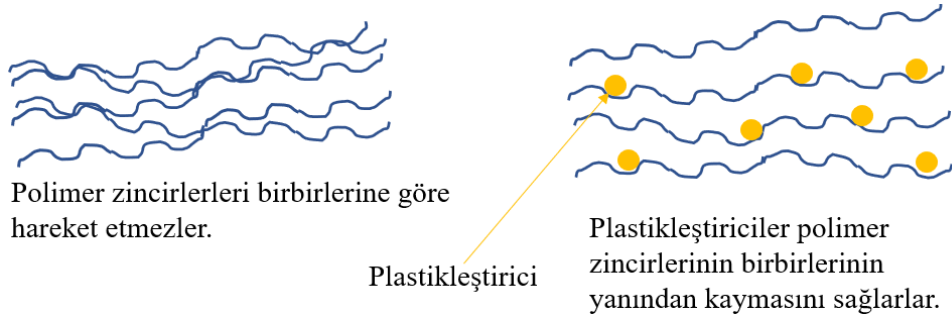
İdeal zincirlerin mekanik özelliklerini tahmin için kullanılan karakteristik oran (C_n) hesaplamaları MD simülasyonu ile elde edilen 3×200 ns boyunca elde edilen konformasyonların ortalama kare uçtan uca mesafeleri üzerinden hesaplanmıştır (Şekil 6.2). Bu hesaplamalarda zincir halkalarının rijit olduğu, zincir esnekliğinin sadece burulma açılarından kaynaklandığı kabul edilmiştir. Zincir uzunluğunun bir parametresi olan karakteristik oran değerleri literatür ile uyumludur [371]. Şekil 6.14'te modellerin karakteristik oran değerlerine göre D-90 formülasyonu en esnek formülasyon olarak hesaplanmıştır. Bu formülasyon mesafe dalgalanmaları (Şekil 6.11, 6.12) hesaplamalarında en fazla dalgalanma gösteren formülasyondur.



Şekil 6.14 : Modellenen yapıların (a) her bir simülasyon ve zincir için ayrı ayrı (b) ortalama karakteristik oran hesaplamaları.

PGAL ve prokain sistemlerinin MD simülasyonları, kritik 30 mg prokain / g-hidrojel prokain konsantrasyonunu göstermektedir; bu konsantrasyonun ötesinde, PGAL zincirleri arasındaki çapraz bağların, D-180 dışında, önemli ölçüde bozulduğu belirlenmiştir. Çapraz bağlanma bozulmasından kaynaklanan esneklik artışı, hidrojeldeki polimer zincirlerinin hareketliliğinin artmasına neden olmaktadır. Bu durumda, Ca^{2+} iyonları tarafından korunan yumurta kutusu yapısının zayıflatarak bozulmasına neden olmaktadır.

Bunun yanı sıra, ilaçlar çapraz bağlı zincirler arasına girip bir plastikleştirici etkisi göstererek polimer zincirlerinin esnekliğinin artmasına neden olabilir [348, 373, 374]. Bu çalışmada da ilaç moleküllerinin plastikleştirici etkisi göstererek zincirleri birbirinden uzaklaştırıp, zincirlerin rijitliğinin azalması ve aynı zamanda esnekliğin arttırmasına, dolayısıyla yapıda bozunmaya yol açmasına neden olduğu düşünülmektedir. İlaç molekülleri polimerik sistemler için plastikleştirici görevi görebilmekte ve polimerlerin termomekanik özelliklerinde önemli değişikliklere neden olabilmektedir [348, 373 - 376]. Plastikleştirici teorisine göre, plastikleştiriciler polimer kütesinin içine difüze olarak zincirler arasında boş alanlar oluşturmakta ve bu şekilde aralarındaki moleküller arası etkileşimi azaltarak, moleküllerin serbest hacim ve hareketliliğini arttırarak moleküler organizasyonu değiştirmektedirler (Şekil 6.15) [374]. Pektin zincirleri arasındaki mesafenin artması Ca^{2+} iyonları ile oluşmuş yumurta kutusu benzeri yapının bozunmasına neden olacaktır. Bu nedenle plastikleştirici malzemeler degradasyon fenomeninin ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedirler. Bununla beraber plastikleştirici konsantrasyonun degradasyon mekanizması üzerine etkisi ve bunun moleküler hareket ve mekanik özellikler üzerine etkisi henüz tam olarak netleştirilememiştir [377].



Şekil 6.15 : Polimer zincirlerinin plastikleştirici etkisi ile birbirleri üzerinden kaymaları.

6.3.2 Deneysel çalışma

Hesaplamalı çalışmalardan elde edilen sonuçları değerlendirmek amacıyla, MD çalışmaları ile benzer oranlarda olacak şekilde hazırlanan farklı konsantrasyonda ilaç içeren 6 farklı pektin hidrojel ile ilaç salım, şişme, iyon salım, taramalı elektron mikroskobu (SEM), diferansiyel tarama kalorimetre (DSC) ve reolojik analiz çalışmaları yapılmıştır.

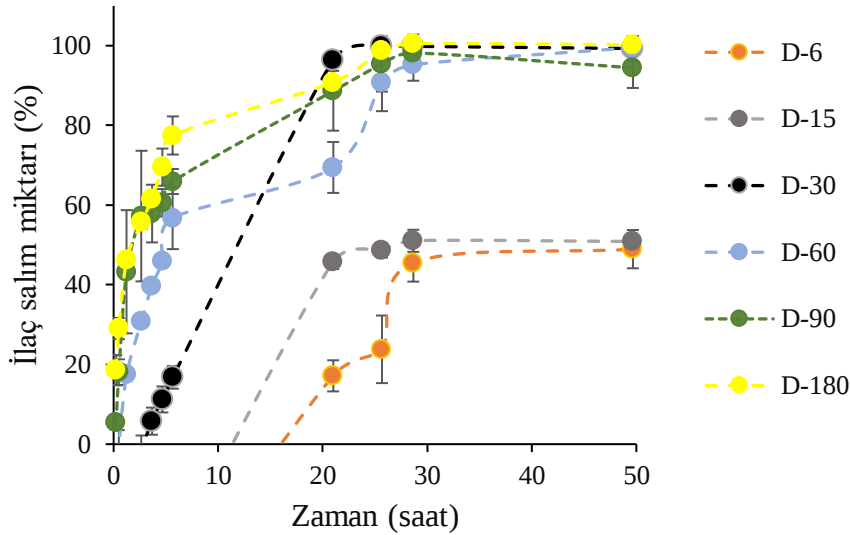
6.3.2.1 Pektin hidrojellerin ilaç salım performansları

İlaç salım kinetiği hidrojel tabakasındaki ilaç konsantrasyonu gradyenine bağlıdır. Bu nedenle, ilaç konsantrasyonu ve hidrojel kalınlığı ilaç akısını domine etmektedir. Çözücü penetrasyonu, zincir dolaşıklığı ve çözelti içindeki toplam kütle (polimer ve ilaç) transportu hidrojel tabakasının kalınlığına etki etmektedir [378].

Farklı prokain konsantrasyonlarındaki hidrojel örneklerinin (Çizelge 6.1) ilaç salım performansları Şekil 6.16'de görülmektedir. Simülasyonlarda düşük miktarda çapraz bağ bozulmasına uğradığı tesbit edilen ve düşük RMSD değerine sahip D-30 örneği, yapısındaki bütün ilacı kontrollü bir şekilde salmıştır. Düşük ilaç konsantrasyonuna sahip D-6 ve D-15 hidrojelleri de ilaç moleküllerini kontrollü bir şekilde salabilmişlerdir. Ancak bu hidrojeller büyük olasılıkla düşük itici güç nedeniyle, başlangıç ilaç miktarının sadece % 40 kadarını salabilmişlerdir. D-6, D-15 ve D-30 hidrojel örneklerinin ilaç salım hızları (dakikada 0.06, 0.08 and 0.09 %), D-60, D-90 ve D-180 örneklerinkinden (dakikada 0.18, 0.19 and 0.23 %) daha düşük olarak hesaplanmıştır.

MD sonuçları ve ilaç salım sonuçları birbiriyle örtüşmektedir. Moleküler seviyede prokain konsantrasyonunun değişimi ile oluşan atomik dalgalanmalar ve zincir esnekliği, makroskobik seviyede sistem davranışlarının değişimini domine etmektedir.

MD simülasyonlarından görüldüğü üzere çapraz bağlı D-90 sisteminde, zincirlerdeki atom hareketliliği yüksektir; bu nedenle zincirler esnektir (düşük C_n değeri) ve bu nedenle patlama salımı yapmıştır. Patlama salım yapan bir diğer hidrojel olan D-180 formülasyonunda ise yüksek prokain konsantrasyonundan dolayı zincirler rijit ve oldukça açık bir konformasyonda kalmıştır. Burada, patlama salım yüksek ilaç konsantrasyonu nedeniyle oluşmuştur. MD çalışmalarındaki sonuçlar göz önüne alındığında ilaç moleküllerinin plastikleştirici etkisi göstererek hidrojel degradasyonunu katalizlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatüre göre, polimere fazla miktarda plastikleştirici eklendiğinde (bu durumda ilaç) kristalinitede artış olmakta ancak aynı zamanda amorf bölgeye şişerek daha yumuşak bir malzeme oluşmaktadır [379].

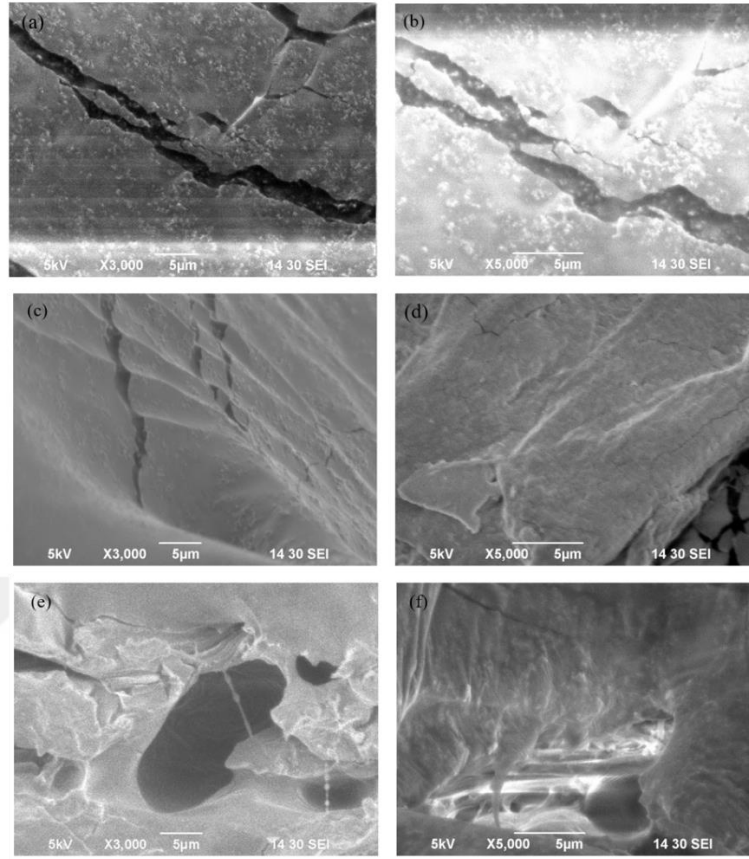


Şekil 6.16 : Hidrojellerden ilaç salım profilleri.

6.3.2.2 SEM ve DSC analizi

D-0, D-30 ve D-180 pektin hidrojellerinin ara kesit SEM görüntüleri Şekil 6.17’de görülmektedir. Burada D-0 ilaçsız referans yapı, D-30 kontrollü salım profiline sahip, D-180 ise patlama salım profiline sahip yapıdır. D-0 örneğinde önemli oranda çatlak ve küçük porlar bulunmaktadır (Şekil 6.17a and 6.17b). Bunun hidrojellerin - MD çalışmasıyla uyumlu olması amacıyla -plastikleştirici kullanılmadan hazırlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Plastikleştirici ile hazırlanmış önceki çalışmalarımızdaki hidrojellerde bu çatlaklar görülmemiştir [2, 172, 173]. SEM görüntüleri incelendiğinde hem D-0, hem de D-30 hidrojellerinin zincir bütünlüklerini korudukları görülmüştür. Hidrojel filme 30 mg/ g-film prokain eklendiğinde, yapı

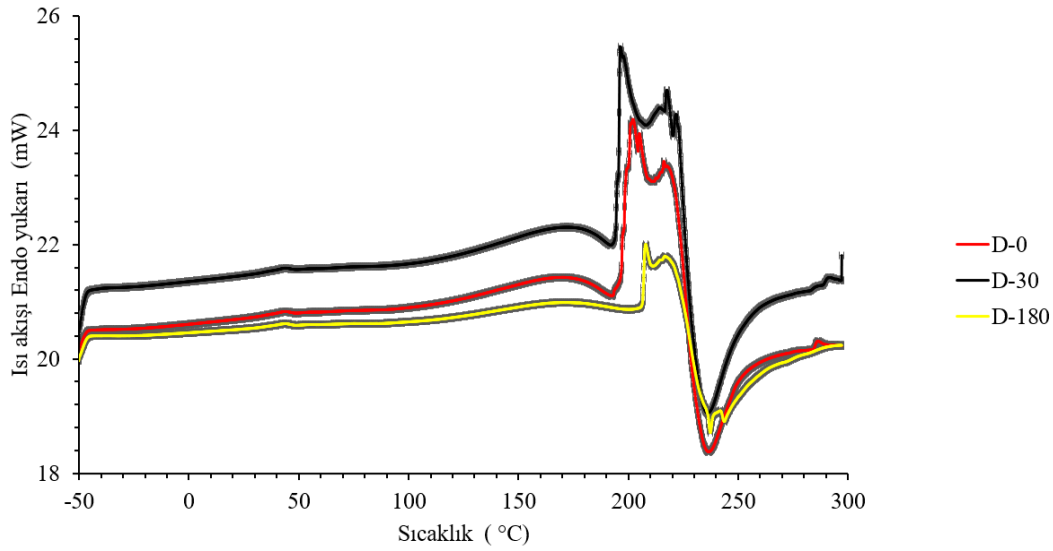
daha homojen ve pürüzsüz bir hale gelmiştir (Şekil 6.17c ve 6.17d). Bu noktada prokain moleküllerinin bir plastikleştirici gibi davrandığı düşünülmektedir [348, 373]. D-180 hidrojelinin SEM görüntüsünde ise porlu ve düzensiz yapı göze çarpmaktadır. 180 mg/g-hidrojel prokain konsantrasyonunda ise hidrojelde aşırı prokain konsantrasyonu nedeniyle düzensiz bir yapı oluşmakta ve geniş çatlaklar oluşmaktadır (Şekil 6.17e and 6.17f).



Şekil 6.17 : Hidrojellerin SEM görüntüleri; a,b: D-0, c,d:D-30, e,f: D-180.

Ardından, kristallenme sıcaklığı ve entalpisini ortaya çıkarmak amacıyla D-0, D-30 ve D-180 hidrojellerine DSC analizi yapılmıştır (Şekil 6.18, Çizelge 6.3.). D-0 örneğinin erime entalpisi (EE) 135.5 ± 3.9 J/g olarak hesaplanmıştır. Hidrojele ilaç moleküllerinin ilave edilmesi, erime sıcaklığında artışa neden olmuştur. Hidrojele az miktarda (D-30: 30 mg ilaç /g hidrojel; EE= 130.3 ± 15.3 J/g) ilaç eklendiğinde EE değeri az miktarda düşüş göstermiştir. Buna karşın yüksek miktarda ilaç sisteme yüklendiğinde (D-180: 180 mg ilaç /g hidrojel; EE= 38.7 ± 14.0 J/g) ise erime entalpisinde önemli oranda düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu durumun yüksek miktarda ilaç molekülünün gösterdiği yüksek orandaki plastikleştirici etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Polimere fazla plastikleştirici malzeme eklendiğinde erime entalpisinin artması beklenmektedir.

Ancak, D-180 örneğinde, amorf bölümler şişerek daha yumuşak bir malzeme olduğu düşünülmektedir. Erime emtalisindeki düşüş, kristallenme oranındaki düşüşten kaynaklanmaktadır [379]. Düşük orandaki kristallenme yüksek konsantrasyondaki prokain moleküllerinin elektrostatik ve hidrojen bağı etkileşimleri ile pektin zincirlerinin düzenini bozarak çapraz bağlanmayı zayıflattığına işaret etmektedir. MD çalışmalarıyla da tutarlı olarak, yüksek miktardaki ilaç moleküllerinin bu plastikleştirici davranışı pektin zincirlerinin moleküller arası etkileşimlerini bozup, filmlerin mekanik özelliklerinde önemli değişikliklere meyilli hale getirmiştir.



Şekil 6.18 : D-0, D-30 ve D-180 hidrojellerinin DSC termogramları.

Çizelge 6.3 : DSC analizi ile hesaplanan erime entalpileri.

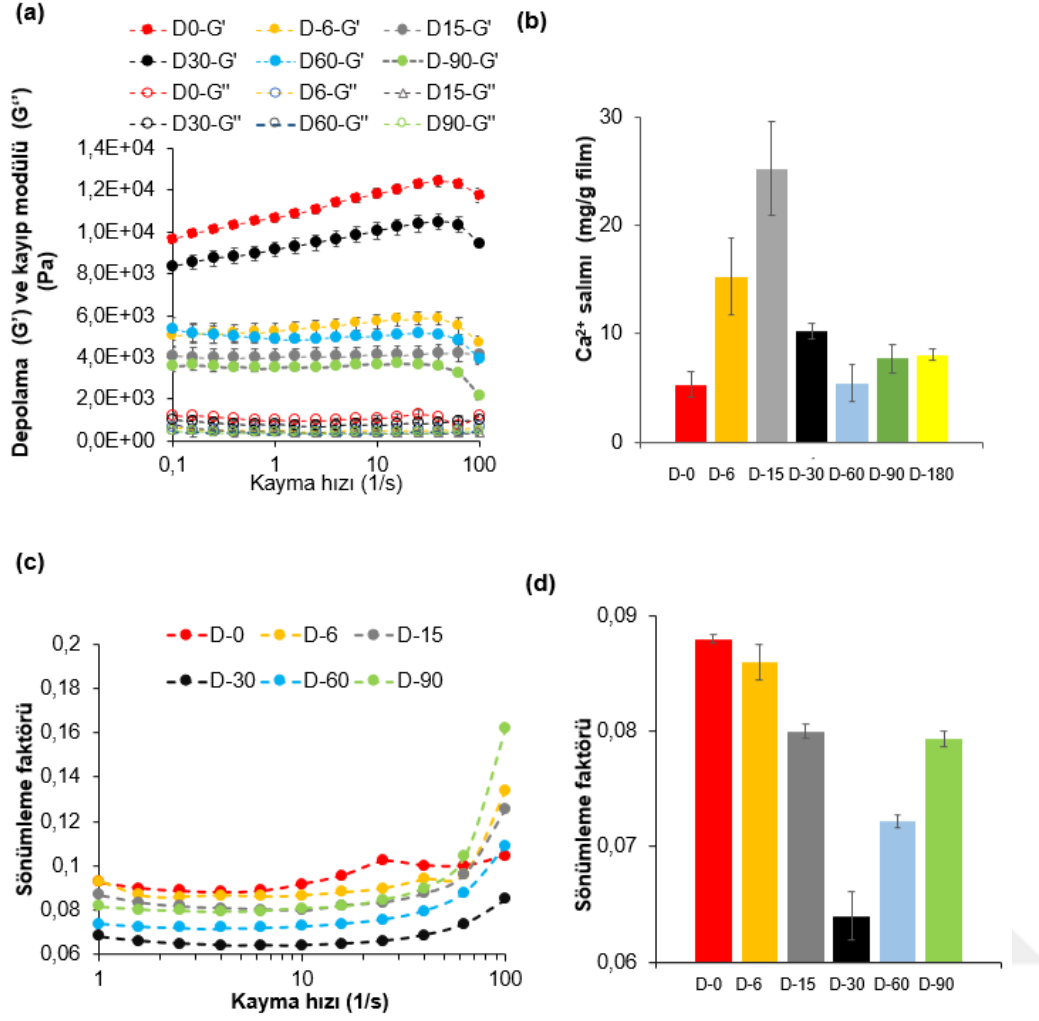
Kod	D-0	D-30	D-180
Erime Entalpisi (J/g)	135.5±4	130±15	38.7±14
Erime Sıcaklığı (°C)	205±2	222±2.2	220±0.6

6.3.2.3 Reolojik analiz

Hidrojellerin yapı-fonksiyon ilişkisi hakkında yorum yapabilmek amacıyla reolojik davranışlar izlenerek kimyasal yapı ile ilişkisi araştırılmıştır. Polisakkaritlerin su molekülleri ile moleküller arası veya molekül içi bağlanması, özellikle polisakkarit zincirinde yüklü fonksiyonel grupların bulunması durumunda, oluşan yapının dinamik özelliklerine etki etmektedir. Konsantrasyon, viskozite, kimyasal özellikler ve matriks bileşenleri ile kontrol edilebilen jel dayanımı, hidrojel filmin performansı için oldukça önemlidir.

Hidrojel mikroyapıları osilasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Şekil 6.19a’ da farklı ilaç konsantrasyonlarında hazırlanmış nemli hidrojellerin osilasyon analizi sonuçları görülmektedir. Pektin, CaCl_2 ve prokain molekülleri arasında kimyasal bir reaksiyon gerçekleşmemesine rağmen formülasyonlarda kullanılan tek parametre olan ilaç konsantrasyonu değişimine bağlı olarak, viskozite ve elastisite değerlerinde değişiklik olduğu belirlenmiştir. Frekans artışı ile kompleks viskozitedeki lineer düşüş, kesme incilmesi yapısına sahip olduklarını göstermektedir [381]. Frekans tarama analizi yapılan bütün formülasyonların depolama modülü (G') kayıp modülüne (G'') göre daha yüksektir; tipik jel benzeri davranış göstermişlerdir. Literatürde de belirtildiği gibi [382] ilaç miktarının artışı ile G' değerinin düştüğü belirlenmiştir (Şekil 6.19). Hidrojellerde ilaç miktarının artışı ile G' ’nin düşmesi, fazla ilacın plastikleştirici etki göstererek zincirler arası etkileşimi zayıflatıp jel dayanımını düşürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna örnek olarak ilaç konsantrasyonunun 30 mg g^{-1} film’den 60 mg g^{-1} ’a artması ile pektin hidrojelinin rijitliğinde önemli orandaki düşüş gösterilebilir.

D-0 ve D-30 örneklerinin diğer yapılara göre çok daha yüksek bir depolama modülüne sahip olması bu yapıların yüksek oranda birbiri ile benzer bir jel yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Çok düşük konsantrasyonlarda ilaç ilavesi (D-6 ve D-15) bu eğilime uymamıştır. Düşük ilaç konsantrasyonlu filmlerde yapısal bir zayıflık belirlenmiştir. ICP analizi sonuçlarına göre bu formülasyonlardan yüksek oranda Ca^{2+} salımı gerçekleşmektedir. Bu nedenle bu yüksek Ca^{2+} salımı hidrojel ağ yapının homojenliğini bozmuş olabilir (Şekil 6.19b).



Şekil 6.19 : Hidrojellerin (a) Frekans tarama analizleri, (b) Ca^{2+} salımı (c) farklı kayma hızlarındaki sönümleme faktör (d) 10 /s kayma hızındaki sönümleme faktörü analizi grafikleri.

Frekans tarama testi yapılabilen hidrojellerden en düşük depolama modülüne sahip örnek D-90 olarak belirlenmiştir. MD simülasyonlarında da çapraz bağlı hidrojeller içinde D-90 sisteminin diğer sistemlerden daha farklı bir dinamik davranış sergilediği not edilmiştir. Bu sistemdeki zincirler yüksek esneklik ve yüksek RMSF değerlerine sahiptir; bu hareketliliğin neticesinde de çapraz bağlanma bozulmaktadır. D-180 filmi gerinim tarama testinde viskoelastik bölge veremediği için, bu formülasyona frekans tarama analizi yapılamamıştır. Bu durum büyük olasılıkla 180 mg/g-film konsantrasyonu ile aşırı miktardaki ilacın literatürde belirtildiği gibi hidrojelin degradasyonunu arttırmasından kaynaklanmaktadır [380]. Bu verilerden pektin hidrojel matrikse yüklenen ilaç konsantrasyonun artışıyla hidrojelin mekanik özelliklerini düştüğü yani degradasyon olduğu söylenebilir.

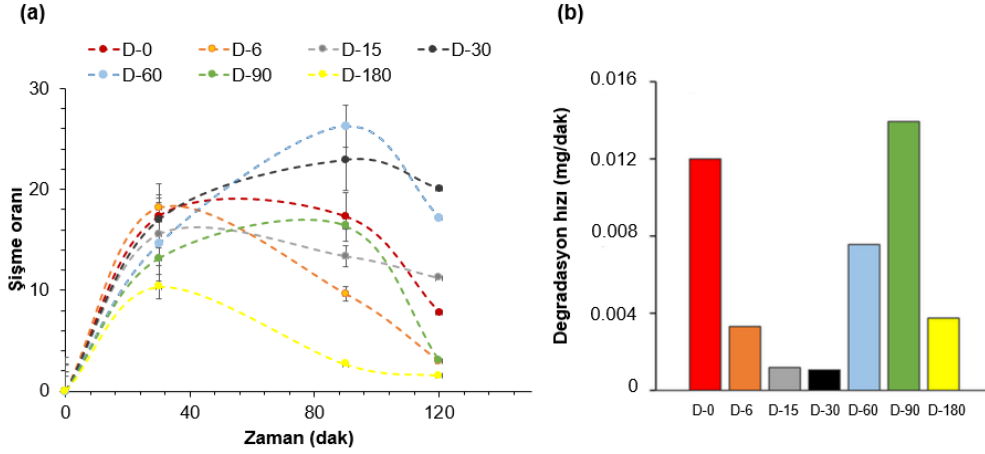
Hidrojellerin mekanik dayanımları ile ilgili daha hassas bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün örnekleri viskoelastisitetlerine göre sınıflandırmak için kullanılan sönümleme faktörü ($\tan \delta = G'' / G'$) değerleri 1-100 1/s kesme hızı aralığında hesaplanmıştır (Şekil 6.19c, 6.19d). Daha düşük $\tan \delta$ değerine sahip hidrojin mekanik dayanımı daha yüksek olacaktır. Çünkü kayıp modülün elastik modüle oranı olan $\tan \delta$ değerinin azalması, elastik modülün artışı ya da kayıp modülün azalması anlamına gelmektedir. Prokain içermeyen filmin (D-0) sönümleme faktör değeri bütün formülasyonlar içinde en yüksek olarak hesaplanmıştır. D-6 ve D-15 filmlerinin yapısal zayıflığının yüksek miktardaki Ca^{2+} salımından dolayı olduğu düşünülmektedir (Şekil 6.19b). Sönümleme faktörü $\tan \delta$ D-30 formülasyonu için en düşük değeri vermiştir. Hidrojele daha fazla prokain molekülü eklendiğinde bu değer tekrar artışa geçmektedir. Bu örneklerde, Ca^{2+} iyonu salımı düşük olmasına rağmen, MD simülasyonlarında da görüldüğü gibi filmlerdeki prokain konsantrasyonu yüksekliği nedeniyle çapraz bağlanma bozulmaya uğramıştır. Düşük çapraz bağlayıcı salımı büyük olasılıkla prokain moleküllerinin sterik olarak Ca^{2+} iyonunun çözeltiye salımını engellemesinden kaynaklanıyor olabilir. Elde edilen bu sonuçlara göre D-30 hidrojeni en düşük $\tan \delta$ değeri ile en dayanıklı, dolayısıyla en az degradasyona uğrayan hidrojeldir. Reolojik analiz sonuçları ilaç salım sonuçlarını desteklemektedir. İlaç salım deneylerine göre de D-30 örneği bünyesinde yüklü olan bütün prokaini kontrollü bir şekilde salabilmiştir (Şekil 6.16).

6.3.2.4 Şişme davranışı

Hidrojel filmlerde ilaç salımı temelde su, polimer ve ilaç arasındaki etkileşim ile kontrol edilmektedir. Şişme profilini polimer zincirlerinin gevşemesi, dış ortam iyonik konsantrasyonu ve ozmotik basınç etkilemektedir [378]. İlaç salımı sırasında, su molekülleri ile temas ederek şişen ve su penetrasyonu ile ilaç difüzyonunu kontrol eden bir hidrofilik bariyer olan pektin jel tabakası şişme, ilaç molekülleri ve iyon hareketliliği nedeniyle sürekli olarak yapısal bir değişikliğe uğramaktadır [381]. Öte yandan, ilaç salım kinetiği hidrojel tabakasındaki ilaç konsantrasyon gradyanına bağlıdır. Bu nedenle, ilaç konsantrasyonu ve hidrojel film kalınlığı, ilaç akısını domine etmektedir. Hidrojel tabakası kalınlığına ise solvent penetrasyonu, zincir dolaşıklığı ve solventteki toplam kütle (polimer ve ilaç) aktarımı etki etmektedir [381]. Hidrojellerin şişme analizi sonuçları Şekil 6.20a'da görülmektedir. Şişme oranı zamanla artarak bir pik değerine ulaştıktan sonra düşüşe geçmektedir. Filmler, ağ

yapılarındaki su, iyon ve ilaç taşınımının moleküler seviyedeki etkileşimlerine bağlı olarak, pik değerine farklı sürelerde ulaşmıştır. 120. dakika itibarıyla en yüksek şişme oranına sahip D-30 formülasyonunun en az degradasyona uğrayan hidrojel olduğu anlaşılmaktadır. Aynı dakikada, çapraz bağlanmanın bozunması nedeniyle en düşük depolama modülüne sahip D-6 ve D-15 hidrojellerinin (Şekil 6.19a) şişme oranlarının da düşük olduğu hesaplanmıştır. D-90 ve D-180 filmlerinin ilaç miktarları diğer formülasyonlara göre oldukça fazla olmasına rağmen en az şişen örnekler olmuştur. Bunun hem ilacın filmin yüzeyini bir bariyer gibi kaplaması hem de fazla ilaç miktarının polimer zincirlerini yüksek oranda degrade etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Degradasyon ile aynı zamanda solvent difüzyon yolları da kesintiye uğratabilir. En yüksek şişme oranı D-90 formülasyonunda hesaplanmıştır. D-60 formülasyonunun yüksek degradasyon hızına sahip olduğu hesaplanmıştır. Bununla uyumlu olarak, D-60 örneğinin depolama modüllerinin özellikle D-0 ve D-30 örneklerine göre önemli oranda düşüktür. Şişme oranındaki bu yüksekliğin ağ yapısındaki yüksek ilaç konsantrasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Degradasyon hızı düşük olan D-180 formülasyonu ise oldukça düşük bir oranda şişmiştir. Hidrojellerin şişme ve degradasyon davranışları zincirlerin dinamiği ile kontrol edilmektedir. Bu değişiklikler, MD simülasyonları ile belirlendiği gibi sistemin bileşenlerinin arasındaki moleküller arası etkileşimlerin bir uzantısı olarak ortaya çıkmaktadır. Yüksek miktarda ilaç molekülü içeren çapraz bağlı D-180 sistemindeki yüksek R_n ve R_g değerleri, bu sistemdeki zincirlerin rijit bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Zincirlerin rijitliği ve düşük hareketliliği düşük oranda şişmesine neden olmuş olabilir. Buna ilave olarak, GAL çiftleri arasındaki mesafe sapmaları ve dalgalanmaları (Şekil 6.11, 6.12) numunelerin degradasyon hızları ile kuvvetli bir derecede uyumludur.



Şekil 6.20 : Hidrojellerin (a) şişme profili (b) degradasyon hızı hesaplamaları.

6.4 Vargular

Tez çalışmasının bu bölümünde, MD simülasyonları yöntemi ile esnek yapılardan kontrollü salım yapılabilecek ilaç konsantrasyonları tahmin edilmiştir. Yapılan tahminlerin doğruluğunu test etmek amacıyla ilaç yüklü pektin hidrojellere *in vitro* standart karakterizasyon protokolleri uygulanmıştır. Bu doğrultuda, farklı konsantrasyonlarda ilaç içeren 6 farklı sistem incelenmiştir.

Farklı ilaç konsantrasyonlardaki sistemlerde, özellikle çapraz bağlı GAL çiftlerine odaklanılmış, zincirlerin global ve lokal dinamik davranışları incelenmiştir. PGAL zincirlerinin genel dinamiği ve yapı esnekliği RMSD, R_g ve R_n hesaplamaları ile açıklanmıştır. Atomların RMSF değerleri ve çapraz bağlı birimlerin başlangıç noktasına göre mesafelerinin değişimleri, bütün hidrojel ağ yapının degradasyon davranışını açıklamaktadır. Bu şekilde moleküler düzeyde değişen prokain konsantrasyonuna duyarlı atomik dalgalanmalar ve zincir esneklikleri, makroskopik düzeyde sistem davranışına etki ettiği ortaya çıkarılmıştır.

MD simülasyonları ve ilaç salım profilleri büyük oranda birbirleri ile uyumlu sonuç vermiştir. Simülasyon verilerine göre 30 mg/g prokain yüklemenin çapraz bağlamayı bozmayacağı, bu nedenle bu formülasyonun düşük seviyede degradasyona uğrayarak kontrollü salım yapabileceği ön görülmüştür. Buna karşın, 90 mg/ g ilaç yüklemine çapraz bağlanmayı yüksek seviyede bozacağı ve patlama prokain salımına neden olacağı tahmin edilmiştir. Çapraz bağlanmanın kaybedilmesinden kaynaklanan esneklik kazanımı, hidrojeldeki polimer zincirlerinin hareketliliğinin artmasına yol açabilir. Bu durum, Ca^{2+} iyonları ile oluşturulan yumurta kutusu yapısını zayıflatarak

bozulmasına neden olacaktır. Bunun yanı sıra ilaç molekülleri çapraz bağlı zincirlerin arasına penetre olarak bir plastikleştirici gibi davranıp zincirlerin hareketliliğini daha da arttırabilir. MD simülasyonları aynı zamanda 180 mg / g-film'lik en yüksek prokain konsantrasyonunda PGAL zincirlerinin rijitliğindeki artışı da tahmin etmiştir. Bu artış ise düşük şişmeye, ancak düşük degradasyona ve hızlı ilaç salıma neden olmaktadır.

Tez çalışmasının bu bölümünde uygulanan hesaplamalı yaklaşım benzer esnek sistemlere de uygulanabilir. Buna göre, kontrollü salımı koruyan ilaç konsantrasyonu aralığı veya patlama salımına yol açan kritik konsantrasyon tahmin edilerek, kontrollü verime sahip sistemlerin tasarımında kullanılabilir.



7. KONTROLLÜ İLAÇ SALIMI YAPAN ZEOLİT KATKILI PEKTİN HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

7.1 Giriş

Düşük metoksili (LM)-pektin, yapısındaki karboksi metil ester grupları sayesinde kuvvetli antienflamatuar [199], karboksilik asit grupları yardımıyla antimikrobiyal [193], sülfatlı grupları sayesinde ise antitrombojenik [383] özellikler göstermektedir. Buna rağmen, düşük mekanik özellikler gösterdiği için başka polimer veya inorganik malzemelerle karıştırılması gerekmektedir [30]. Kompozit hidrojeller daha düşük mekanik özellikler gösteren hidrojellerin bu özelliklerini geliştirmek için tasarlanmış yeni sayılabilecek biyomalzemelerdendir.

Laboratuvarlarımızda yapılan bir çalışmada [173], LM-pektin hidrojele 2-tiobarbitürik asit eklenerek pektin hidrojelinin yapısal dayanıklılığının artırıldığı belirlenmiştir. Polimerik sistemlere inorganik malzemelerin eklenmesi, organik malzemelerin eklenmesiyle elde edilecek malzemelere göre daha iyi termal ve mekanik özellik kazandırmaktadır [384, 385]. Bu bağlamda organik/inorganik dolgu malzemeleri (silika, kil, kalsiyum fosfat, metal nanopartiküller, kitin kristalleri, selüloz nanokristalleri, grafen, grafen oksit, grafit oksit, karbon nanotüp, nanodiamond, hidroksiapatit veya zeolitler) hidrojel ağ yapısına kovalent veya fiziksel etkileşim ile eklenmektedir [1, 384 - 386].

Kompozit hidrojeller hem hidrojellerin hem de bu dolgu malzemelerin üstün avantajlarına sahip olmaktadır. Kompozit hidrojellerin özelliklerinin gelişmesi, hidrojel ağyapısı ile dolgu malzemesi arasındaki ara yüz etkileşimleri vasıtasıyla gerçekleşmektedir [387 - 392].

Bu tez kapsamında pektin polimerine, yara tedavisi bakımından da üstün özellikleri olan zeolit partikülleri eklenerek elde edilen hidrojellerin mekanik özellikleri ve ilaç salım performansı incelenmiştir.

Zeolitler kafes şeklindeki yapıları, köşe paylaşımli oksijen atomları ile birbirine bağlanmış tetrehedral AlO_4 ve SiO_4 birimlerinden oluşmaktadır. Zeolit iskeletindeki

her bir AlO_4 birimi net bir negatif yük taşımakta ve bu yük iskelet dışında bulunan katyonlarla dengelenmektedir. Çeşitli büyüklükte (mikro ve mezoporlu) olabilen porları katyonlar ve hidrofiliklikleri nedeniyle su molekülleri ile doludur. Yüksek kristaliniteleri, düşük yoğunlukları, uniform yapıları ve çeşitli inorganik ve organik yapıları seçici adsorblayabilme özelliği [393] vasıtasıyla biyosensörler için enzimlerin immobilizasyonu [394], ilaç salımı [2, 395], yara tedavisi [2, 396 - 398], ve teşhisten tedaviye (teranostik) [399] çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda [400, 401] kullanılmaktadırlar. Biyoaktivite ve biyouyumluluk gösterdikleri bilinmektedir [2]. Bu aktif biyomalzemeler aynı zamanda düşük maliyetlidir ve kolay elde edilebilirler [402].

Biyopolimerik filmlerle karıştırılarak kullanıldığında yanık yaralarının tedavisini hızlandırmaktadır [403]. Zeolit partiküllerinin in vitro yara iyileşmesi ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ninan ve ark. yaptıkları in vitro ve in vivo bir çalışmada, jelatin/ hyalüronik asit/zeolit karışımının yara iyileşmesi için iyi bir aday olduğu belirlenmiştir [404]. Bu çalışmada aynı zamanda zeolit partiküllerinin, numunelerin porluluk oranını önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Por miktarındaki bu artış dermal fibroblastların büyümesi ve hücresel yapışma için çok önemli bir özelliktir. Zeolitlerin yapılarındaki silanol grupları dolayısıyla da hücre yapışması ve büyümesi için uygun yapılar oldukları düşünülmektedir [405]. Bu nedenle doku iskelesi olarak da umut vadettikleri söylenebilir.

Si/Al oranı zeolitlerin özelliklerini belirleyen önemli bir parametredir. Bu oran genellikle 1-5 arasında değişmektedir. Düşük Si/Al oranlı zeolitlerin yüksek katyon değişim yeteneği bulunmaktadır ve çoğunlukla antibakteriyel terapi için kullanılmaktadırlar. Genellikle Ag, Cu, Zn gibi antibakteriyel metaller zeolitlerin porlarına inkorpore edilmektedir. Bu zeolitler bir ortama inkübe edildiklerinde, katyon değişimi ile bu antibakteriyel iyonlar ortama difüze olarak bakterilerin negatif yüklü hücre zarı ile etkileşmekte ve bakteri içine nüfuz ederek zarar vermektedirler [1, 406].

İyon veya moleküllerin, porlu yapılarının içine ve dışına doğru kolaylıkla hareket etmesine izin verirler. Nitrik oksit, metalik katyonlar ve antibakteriyel ajanlar gibi çeşitli moleküllerle birleştirilerek yara iyileşmesini hızlandırmaktadırlar.

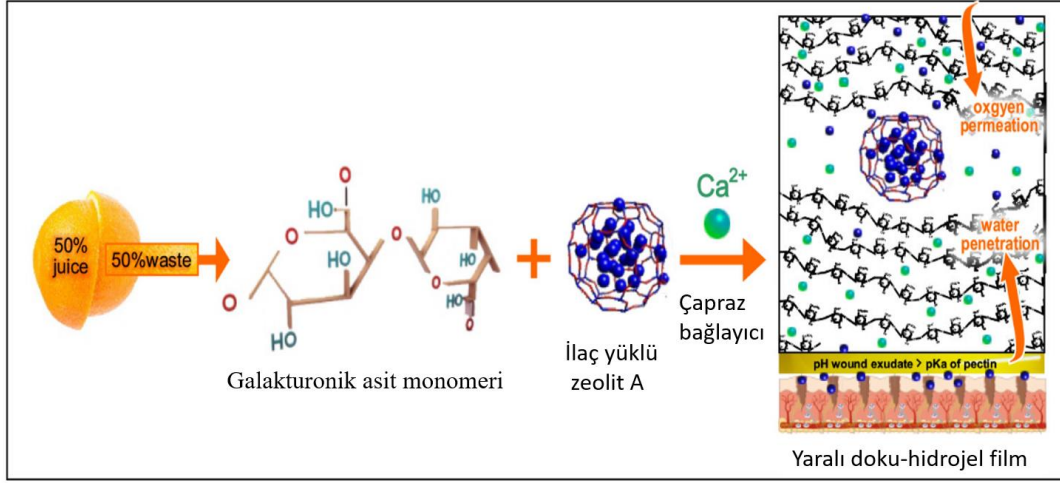
Adsorpsiyon kapasiteleri nedeniyle, zeolitler güçlü bir hemostatik ajandırlar [407]. Büyük oranda su adsorblayarak pıhtılaşma faktörlerini ve trombositleri daha konsantre

hale getirirler [408, 409]. Trombositleri aktive ederek kanamayı durdurmaya yardımcı olurlar [1]. Kandan su absorblayarak hücrel ve büyük protein bileşenlerin konsantrasyonunu arttırıp yara iyileşmesini hızlandırırlar [3]. Aynı zamanda kan akışına karşı fiziksel bir bariyer oluşturarak da kan durdurmaya yardımcı olurlar [405, 408, 410]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda zeolit temelli ticari kan durdurucu ZSM-5 ve LTA zeolit temelli QuickClot® ürününün kan pıhtılaşmasını hızlandırdığı ve pıhtı oluşum süresini azalttığı belirlenmiştir [411]. Bu ticari ürün uzun yıllar Irak ve Afganistan'da Amerikan ordusu tarafından kullanılmıştır. Yunlong Li ve ark. [412] tavşanlar üzerinde yaptıkları *in vivo* çalışmada doğal zeolitlerin de ölüm oranını düşürerek yara iyileşmesini hızlandırdıklarını belirlemişlerdir. Bir başka zeolit ticari kan pıhtılaştırıcı ise gazlı bezin içine daha geniş tanecikli zeolit partiküllerinin içine konulmasıyla hazırlanan ACS markasıdır [408]. Alam ve ark. yarayı %1 zeolit katkılı örtülerle kapladıklarında kanamanın 3 dakika içinde durduğunu ve kan kaybında önemli oranda azalma olduğunu belirlemişlerdir [413]. Zeolit uygulanmış yaralarda inflamasyon ve proliferasyon fazları daha verimli işleyerek uygun yara kapanması sağlanmaktadır [414].

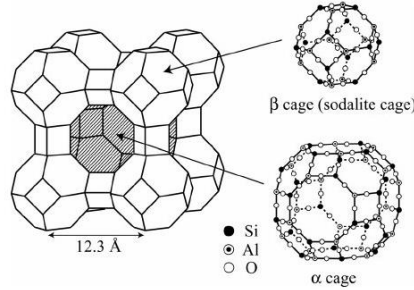
Doku rejenerasyonunda oksijen temini en önemli parametredir. Yaralı dokulara yeterli oksijen sağlanması, dermal doku mühendisliğinde büyük bir zorluktur. Zeolitlerin polimerik iskelet yapılarına eklendiğinde, hücrelere oksijen salımını arttırdığı gösterilmiştir [2, 405] ki bu özellik yara örtülerinin en önemli gereksinimlerinden birisidir. Yine başka bir çalışmada, zeolit partikülleri yara örtüsünde kullanıldıklarında hem oksijen geçirgenliği hem de su buharı geçirgenliği değerlerini arttırdığı rapor edilmiştir [2, 405]. Seifu ve ark. florlu zeolit yüklü poliüretan polimerlerin etkili oksijen geçirgenliğine sahip olduklarını belirlemişlerdir [416]. Aynı çalışmada zeolit eklenmemiş poliüretan film ile karşılaştırıldığında, poliüretan-zeolit filmlerin insan koroner arter düz kas hücrelerinin proliferasyon aktivitesi ve doku iskelesine penetrasyon derinliğinin arttığını belirlemişlerdir. Bu durumun zeolit partiküllerinin bir oksijen rezervuarı gibi davranıp, hücrelere oksijen taşınımını arttırmasından kaynaklandığı yorumunda bulunmuşlardır.

Tezin bu bölümde, LM-pektin ve zeolitün üstün özelliklerini biraraya getirilerek kontrollü ilaç salımı yapabilen, modern yara örtüsü için gerekli özellikleri taşıyan uygun maliyetli özgün bir yara örtüsü tasarlanmıştır (Şekil 7.1). Deneylerde Zeolit A (Linde tip A-LTA) yapısı kullanılmıştır. Zeolit-A Si/Al oranı 1 olan en basit sentetik

zeolitlerdendir (Şekil 7.2). Zeolit partiküllerinin LM-pektin maktrijs ile inkorporasyonu sonucu oluşan hidrojel filmin yara iyileşmesi özellikleri ile beraber mekanik ve ilaç salım özelliklerini de arttırması hedeflenmiştir.



Şekil 7.1 : Tez çalışmasında tasarlanan yara örtüsünün şematik gösterimi.



Şekil 7.2 : Alüminosilikat zeolit A ağ yapısının şematik gösterimi. Ağ yapı LTA-tip yapıya sahiptir. Boyalı daire Si, içi boş daire O ve içinde nokta bulunan daire Al atomunu temsil etmektedir. Alkali katyonlar gösterilmemiştir [417].

Çalışmada model ilaç olarak teofilin kullanılmıştır. Kullanılan hazırlama prosedürleri ve malzemelerin konsantrasyonları üretilen hidrojellerin ilaç salım performanslarına etki etmektedir. Bu doğrultuda, hem membrana difüzyon hem de matrikse difüzyon olmak üzere iki farklı hidrojel hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca, farklı çapraz bağlayıcı, zeolit ve ilaç konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Pektin-zeolit etkileşimlerini arttırmak amacıyla iki farklı iyonik formatta (Na^+ ve Zn^{2+}) zeolit-A kullanılmıştır. Bunun yanısıra, zeolit partiküllerinin oksijen geçirgenliğine katkısı incelenmiştir. Zeolit-A ve pektin hidrojelinin yüksek oranda hidrofilik yapıları göz önüne alınarak,

katyon dinamiğinin ilaç salım profili üzerine etkisi araştırılmıştır. Seçilen hidrojelere *in vitro* hücre canlılığı testi, yara iyileşmesi testi ve antibakteriyel test uygulanmıştır.

7.2 Malzeme ve Yöntemler

7.2.1 Malzemeler

Düşük metoksi (LM) (%31) amitlenmiş pektin Herbstreith & Fox firmasından (Neuenbürg, Almanya) temin edilmiştir. Gliserin (%99 saflık), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, TRIS (2-amino-2-(hidroksimetil) propan-1,3-diol) ve teofilin Sigma-Aldrich (Düsseldorf, Almanya)'dan alınmıştır. Na- ve Zn-zeolit-A İTÜ Kimya Mühendisliği laboratuvarlarında Prof. Dr. Melkon Tatlıer tarafından sentezlenmiştir. Bütün kimyasallar analitik saflıktadır ve ek saflaştırma yapılmamıştır. Deneylerde ultra deiyonize su kullanılmıştır.

7.2.2 Zeolit partiküllerine ilaç yüklenmesi

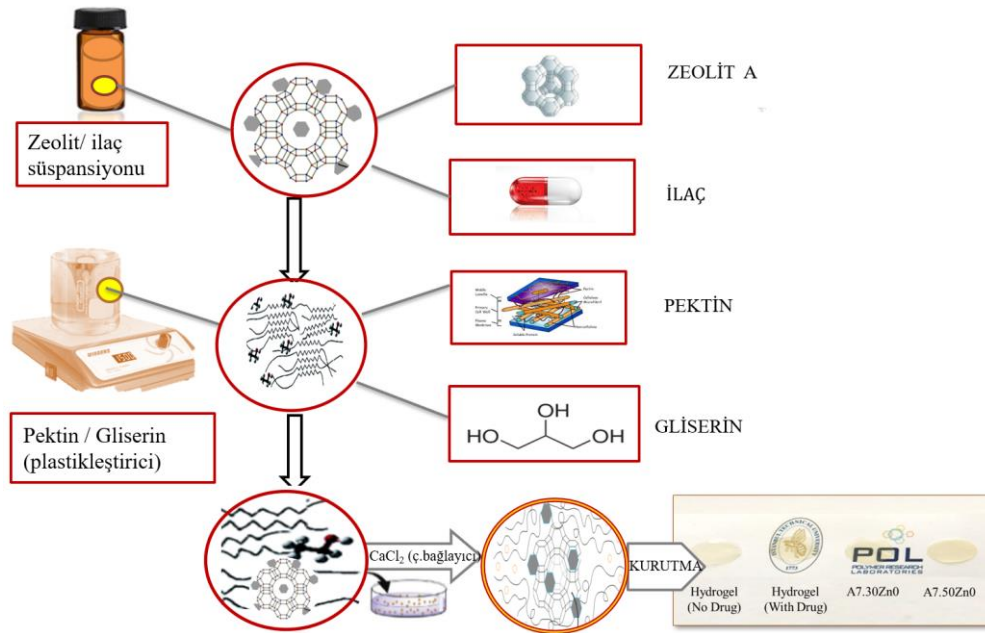
Deneylerde 10, 30 veya 50 mg g-film⁻¹ Zn- veya Na- zeolit A kullanılmıştır (Çizelge 7.1). Deneylere başlamadan önce zeolit partikülleri bir gece boyunca 120 °C'de vakum etüvünde tutularak dehidrate edilmiştir. Zeolit ve ilaç süspansiyonu bir vial içinde, orbital karıştırıcı üstünde, 100 d/d, 10 ± 2 °C koşullarında 24 saat boyunca karıştırılmış, ardından 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulmuştur. İlaç konsantrasyonu, LAMBDA 1050 UV/Vis Spektrofotometre ile belli zaman aralıklarında zeolit-ilac süspansiyonundan alınan numunelerden Lambert-Beers kanununa göre (denklem 5.1) önceden hazırlanmış kalibrasyon eğrisi yardımıyla (E1, E2) hesaplanmıştır.

Çizelge 7.1 : Deneylerde kullanılan Zeolit-A partikülleri özellikleri.

Si/Al oranı	1
Gözenek açıklığı (NaA)	4.1 Å
Yüzey alanı	400-500 m ² /g

7.2.3 İlaç yüklü LM-pektin-zeolit hidrojenlerin hazırlanması

ZnA veya NaA zeolit partikülleri katkılı LM-pektin hidrojenler, çapraz bağlayıcı olarak CaCl_2 , plastikleştirici olarak ise gliserin kullanılarak iyonotropik jelleşme metodu ile hazırlanmıştır. Sulu LM-pektin ($\% 2 \text{ ağırlık}$), gliserin ($\%5 \text{ ağırlık}$) ve zeolit partikülleri süspansiyonu, bir petri kabındaki 10 ml CaCl_2 ($0,7 \text{ ağırlık}$) çözeltisi üzerine dökülerek kendiliğinden jelleştirilmiştir. LM-pektin çözeltisi hazırlamak için, kuru toz LM-pektin tartılarak üzerine belli miktarda ultra deionize su eklenmiştir. Bu çözelti bir gün dinlendirildikten sonra kullanılmıştır. Gliserin çözeltisi LM-pektin çözeltisi üzerine eklenmiş ve elde edilen çözelti 2 saat boyunca 150 d/d'da bir manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. İlaç yüklü zeolit partikülleri süspansiyon halinde bu karışıma eklenerek 24 saat boyunca karanlık ortamda karıştırılmıştır. Ardından bu karışım, bir petri kabındaki 10 ml CaCl_2 çözeltisi üzerine dökülerek çapraz bağlanmış ve 100 d/d dönme hızı ve $27 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki bir orbital karıştırıcıya kurutularak hidrojen filmler elde edilmiştir. Bahsedilen bu yöntem Şekil 7.3'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 7.3 : Zeolit A katkılı LM-pektin hidrojenlerini hazırlama şeması.

Hidrojen filmler iki farklı kontrollü salım sistemine göre hazırlanmıştır: membrana difüzyon ve matrikse difüzyon sistemleri. Hidrojenler kompozisyonlarına göre $M\alpha\beta\gamma$ şeklinde kodlanmışlardır. Burada M hazırlama metodu (A, B veya C), α mg g-film⁻¹ biriminde $\text{CaCl}_2 \times 10$, β mg g-film⁻¹ biriminde zeolit konsantrasyonunu, Z zeolite bağlı katyonu (Zn veya Na) ve γ ise mg g-film⁻¹ biriminde ilaç

konsantrasyonunu simgelemektedir. Farklı konsantrasyonlardaki CaCl_2 (50, 70, 90 veya 100 mg g-film⁻¹), zeolit (Zn- veya Na-zeolit, 10, 30 veya 50 mg g-film⁻¹) ve ilaç teofilin (30 veya 60 mg g-film⁻¹) ile çalışılmıştır. Membrana difüzyon kontrollü sisteminde (A ve C kodlu hidrojel), çekirdek kısım olarak kullanılan ilaç yüklü zeolit partikülleri, hem suya hem de ilaca karşı geçirgen olan ve membran kısım olarak davranan LM-pektin zincirleri içine gömülmüştür. Burada zeolit partikülleri ilaç molekülleri ile doymuş bir rezarvuar bölümdür. A kodlu membran hidrojel hazırlanırken, ilaç-zeolit süspansiyonu LM-pektin-gliserin çözeltisi içine eklenirken, C kodlu hidrojellerde, ilaç yüklü zeolit süspansiyonu süzülerek kalıntı kurutulmuş ve kuru zeolit partikülleri LM-pektin-gliserin çözeltisi ile karıştırılmıştır. B-kodlu örnekler matrikse difüzyon kontrollü salım sistemi ile hazırlanmışlardır. Burada ilaç uniform bir şekilde polimerik matriks içinde disperse edilmiştir.

Çizelge 7.2 : Farklı yöntemlerle hazırlanan hidrojel formülasyonları ve ilaç salımları.

Grup	Kod	CaCl_2 (mg)	Zeolit (mg)	İlaç (mg)	Maksimum salım (%)
1	A9.10Zn30	90	10	30	71.6
	A7.30Zn30	70	30	30	80.7 ^a (69.8 ^b)
	A5.50Zn30	50	50	30	58.2
2	A10.10Zn30	100	10	30	13.2
	A10.30Zn30	100	30	30	5.1
	A10.50Zn30	100	50	30	5.9
3	B10.10Zn30	100	10	30	59.5
	B10.30Zn30	100	30	30	66.7
	B10.50Zn30	100	50	30	55.6
4	C10.30Zn30	100	30	30	0.004
	C10.50Zn30	100	50	30	0.002
	C10.50Na30	100	50	30	7.35
5	Zn-Z	-	30	30	0.25
	Na-Z	-	30	30	0.05

^a A730Zn30.2 için karıştırma hızı 200 d/d,

^b A730Zn30 için karıştırma hızı 100 d/d'dir.

7.2.4 Hidrojellerin yapısal, ısı ve reolojik karakterizasyonu

7.2.4.1 Fourier transform infrared spektroskopi analizi (FTIR)

Fourier Transform İnfrared (FTIR) spektra analizi, 4000–600 cm⁻¹ aralığında KBr pellet veya total yansıtma (ATR) tekniği kullanılarak Perkin-Elmer Spectrum One FTIR Spektrometre ile oda sıcaklığında yapılmıştır.

7.2.4.2 Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

Diferansiyel tarama kalorimetre (DSC) analizi, Perkin-Elmer DSC4000 cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Numeneler, kapalı Al-pan' lar içinde –75°C ile 300 °C aralığında, 10 °C dak⁻¹ hızında ısıtılmışlardır. Azot gazı 50 mL dak⁻¹ akış hızında beslenmiştir.

7.2.4.3 XRD analizi

Hidrojel ve zeolit partiküllerinin XRD analizleri, CuK α radyasyonu kullanılarak Pananalytical X Pert Pro difraktometre ile gerçekleştirilmiştir. Difraktometre X'Pert Highscore Plus yazılımı ile kontrol edilmiştir. X-ray kırılım desenleri 0,0568 derece.s⁻¹ tarama hızı ile toplanmıştır.

7.2.4.4 Çözeltilerin zeta potansiyel analizi

LM-pektin (% 2), LM-pektin-gliserin ve LM-pektin-gliserin-zeolit solüsyonları TRIS pH 6,4 çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bütün çözeltiler, hidrojel film hazırlanırken kullanılan koşullar altında hazırlanmıştır. Zeta potansiyel ölçümleri Zeta-sizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) ile kapiler hücrelerde gerçekleştirilmiştir. Ortalama elektroforetik hareketlilik Smoluchowski eşitliği (denklem 7.1) (Sze, Erickson, Ren, & Li, 2003) ile hesaplanarak zeta potansiyel değerleri hesaplanmıştır.

$$u = \frac{\varepsilon \zeta}{\eta} \quad (7.1)$$

Burada, u ve η sırasıyla parçacık mobilitesi ve ortamın viskozitesi, ε suyun dielektrik sabiti, ζ ise parçacıkların zeta potansiyelidir.

7.2.4.5 Morfolojik analiz

Kuru hidrojel filmlerin ara kesit morfolojik incelemesi Jeol (JSM-6390) marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Hidrojel parçaları azot gazına 5 dakika batırılmış ve donmuş parçacıklar bir spatül yardımıyla ortadan kırılmıştır.

Hidrojellerin yüzey pürüzlülüğü Nanosurf atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile 50 x 50 mm² yüzey alanlı '*tapping mod*' ile araştırılmıştır. Ölçümler hava ortamında kuru hidrojel numunelerine yapılmıştır. Yüzey pürüzlülüğü 12,5 mm × 12,5 mm alanı üzerinden hesaplanmıştır.

7.2.4.6 Reolojik analiz

Hidrojellerin reolojik analizi Anton Paar physica MCR 301 cihazı ile CP25 ve PP25 ölçüm plakaları kullanılarak yapılmıştır. Numune sıcaklığı VT2 viskoterminde kontrol edilmiştir. CP25 ölçüm plakası kullanılarak hidrojel sentezinde kullanılan konsantrasyonlarda LM-pektin, LM-pektin-30 mg Na-zeolitA ve LM-pektin-50 mg Na-zeolitA çözeltilerinin akış özellikleri belirlenmiştir. Akış ve viskozite eğrileri deneysel verilere dayanarak çizilmiştir. Bunun yanı sıra, LM-pektin (A7-30_0), LM-pektin-30 mg Na-zeolitA (A7-30Na0) ve LM-pektin-50 mg Na-zeolitA (A7-50Na0) hidrojelleri çapraz bağlandıktan 6 saat sonra, henüz kurumamış numunelerin viskoelastik davranışları araştırılmıştır. Bu deneyler osilasyon modunda, oda sıcaklığında PP25 ölçüm plakası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde GAP $2,7 \pm 0,1$ mm olarak alınmıştır. Bu amaçla 10 rad.s⁻¹ sabit frekansta gerinim taraması yapılarak lineer viskoelastik bölge belirlendikten sonra 10 – 0,1 rad s⁻¹ aralığında depolama (G') ve kayıp modülünü (G'') belirlemek amacıyla frekans taraması testi uygulanmıştır.

7.2.4.7 Temas açısı

Filmlerin yüzeyindeki su temas açısı oda sıcaklığında KSV CAM200 marka temas açısı cihazı ile ölçülmüştür.

7.2.4.8 Oksijen geçirgenliği tayini

Oksijen geçirgenlik hızı (OTR) American Society for Testing and Materials (ASTM) 1434-82 standard metoduna göre Brugger GDP-C München cihazı kullanılarak 23 °C ve % 0 bağıl nem koşullarında yapılmıştır.

7.2.5 Şişme derecesi

Şişme derecesini belirlemek için, hidrojeller 5 cm × 5 cm boyutunda, birbirine denk ağırlıklarda kesilmiş ve 27 °C vakum etüvünde bütün gece dehidrasyon amacıyla bekletilmiştir. Numuneler, içinde 25 ml pH 6,4 TRIS tampon çözeltisi bulunan oda sıcaklığındaki bir petri kabına daldırılmış ve belli zaman aralığında alınarak tartıldıktan sonra tampon çözeltisi içine geri konulmuştur. Her bir tartımdan önce numune yüzeylerindeki fazla nem, iki filtre kağıdı arasına konularak dikkatlice alınmıştır. Hidrojellerin şişme oranı aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır;

$$\text{Şişme oranı} = (W_s - W_d)/W_d \quad (7.2)$$

Burada W_s ve W_d sırasıyla, ıslak ve kuru hidrojellerin ağırlığıdır.

7.2.6 Hidrojellerin iyon salımı

Çözeltilerdeki Zn^{2+} ve Ca^{2+} konsantrasyonları ICP (ICP-OES Optima 2100 DV) ile ölçülmüştür. Hidrojeller, içinde 40 ml pH 6,4 TRIS tampon çözelti bulunan viallere konulmuş ve bir orbital karıştırıcı üzerinde dengeye ulaşana kadar 24 saat boyunca 100 d/d hızında karıştırılmıştır. Bütün ölçümler üç defa tekrarlanmıştır.

7.2.7 Hidrojellerin *in vitro* ilaç salımı

Hidrojellerin *in vitro* ilaç salım deneyleri pH 6,4 TRIS tampon çözelti içinde yapılmıştır. İlaç yüklü kuru hidrojel diskleri içinde tampon çözelti bulunan viallere konulmuş ve vialler bir orbital karıştırıcı üzerinde 25 ± 1 °C’de karıştırılmıştır. Çözeltideki teofilin konsantrasyonu 271 nm’de LAMBDA 1050 UV spektrofotometre ile izlenmiştir. Çözelti örnekleri belli zaman aralığında 700 µL’lik bir mikropipet ile çekilmiş ve absorbans ölçüldükten sonra hızlıca vial geri konulmuştur. İlaç konsantrasyonu, Lambert–Beers kanununa (denklem 5.1) göre, önceden çıkarılmış olan kalibrasyon eğrisi (Şekil E.1, E.2) kullanılarak hesaplanmıştır. Deneyler aynı koşullarda üçer defa tekrarlanmıştır.

7.2.8 Su buharı geçirgenliği hızı

Su buharı geçirgenlik hızı (WVTR) ASTM E96-02 standartlarına göre [30] 25 °C’de ölçülmüştür. Hidrojel filmler dairesel boyunları olan küçük ($A = 2,0 \pm 0,5$ cm²) cam şişelerin ağzına sabitlenmiştir. Cam şişeler, şişenin ağzının 0,5 cm aşağısına kadar

silika parçacıkları ile doldurulmuştur. Her bir şişenin ağırlığı deney başlangıcında (W_1) kayıt edilmiştir. Ardından şişeler, doymuş NaCl ile 25 °C’de %75 relatif nem koşulları sağlanmış bir desikatör içine konulmuştur. Şişeler $t=1$ günün sonunda tekrar tartılmıştır (W_2). WVTR aşağıdaki denklem ile hesaplanmıştır;

$$WVTR = (W_2 - W_1) / (A \times t) \quad (7.3)$$

7.2.9 Hidrojellerin *in vitro* yara örtüsü karakterizasyonu

Hidrojellerin *in vitro* yara örtüsü karakterizasyonu 30 mg Na-zeolit (A7.30Na0) ve 50 mg Na-zeolit (A7.50Na0) ilaçsız hidrojel filmleri için yapılmıştır. Bu yara örtülerinin esneklik, su tutma kapasitesi, dehidrasyon hızı, dispersiyon özelliği ve pH değiştirme kapasitesi incelenmiştir [419, 420]. Hidrojel filmlerin bu özellikleri ticari Kaltostat® (aljinat kalsiyum sodyum) yara örtüsü ile kıyaslanmıştır [421]. Kaltostat®, kimyasal yapısı bakımından LM-pektin hidrojellere olan benzerliğinden dolayı seçilmiştir.

7.2.9.1 Esneklik

Hidrojellerin Shore A sertliği bir durometre ile ASTM D2240 standartlarına göre belirlenmiştir [422]. Hidrojel filmin esnekliği, organik kaplamalar için uygulanan D522-93a standartlarına göre [423] 2 ile 32 mm arasında 14 farklı paslanmaz çelik mili bulunan Erichsen Model 266S model silindirik mil bükme testi ile ölçülmüştür. Hidrojel filmler ince bir tabakaya sabitlenmiş ve aşağı yukarı bükülerek, bir kırılma olup olmadığı izlenmiştir. Filmde kırık oluşturmayan en yüksek çaplı silindir kayıt edilmiştir.

7.2.9.2 Su tutma kapasitesi

Yara örtülerinin su tutma kapasiteleri BS EN 137261:200235 test metoduna göre [424] belirlenmiştir. Teste başlamadan önce A7.30Na0 ve A7.50Na0 filmleri 5 cm × 5 cm boyutunda kesilip tartılmıştır. Test çözeltisi olarak, 2.298 g NaCl ve 0.368 g CaCl₂.H₂O tuzları 1 lt deiyonize su içinde çözülmüştür. Bu çözeltiden hidrojel filmlerin kendi ağırlıklarının 40 kat fazlası test çözeltisi alınarak 37 ± 1 °C’ye ısıtılmıştır. Ardından, test çözeltisi filmlerin üzerine disperse edilmiş ve 37 ± 1 °C’de bir inkübatör içine konulmuştur. 30 dakika sonra, hidrojel filmler inkübatörden alınmış ve tartılmıştır. Her bir tartımdan önce numune yüzeylerindeki fazla sıvı, iki filtre kağıdı arasına konularak dikkatlice alınmıştır. Kütle kaybı,

$$Kuruma\ sonucu\ ağırlık\ kaybı\ \left(\frac{g}{g}\right) = \left(\frac{w_1 - w_2}{w_1}\right) \quad (7.4)$$

denklemleri ile hesaplanmıştır. Burada w_1 ve w_2 , sırasıyla hidrojel filmlerin testten önceki ve sonraki kütleleridir.

7.2.9.3 Dehidrasyon hızı

Testten önce 5 cm × 5 cm boyutunda hidrojel filmler bir inkübatör içinde 37 ± 1 °C’de kurutulmuştur. *In vitro* dehidrasyon hızı ölçümü için, filmler 30 dakika boyunca 37 ± 1 °C’deki deiyonize su içine daldırılmış ve ardından dışarı çıkarılarak ilk tartım (w_1) alınmıştır (Parsons & Bowler, 2005). Bu ilk tartımın ardından örnekler 24 saat boyunca 37 ± 1 °C’de tekrar kurutulup, tartılmıştır (w_2). Her bir ölçümden önce numunelerin üstündeki fazla nem, iki filtre kağıdı arasında dikkatlice alınmıştır. Dehidrasyon hızı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır;

$$Dehidrasyon\ hızı\ \left(\frac{g}{min}\right) = \left(\frac{w_1 - w_2}{T}\right) \quad (7.5)$$

7.2.9.4 Dispersiyon özelliği

Yara örtülerinin dispersiyon özelliği standart BS EN 13726-2:2001 test metoduna göre [37] belirlenmiştir. 5 cm × 5 cm boyutunda hidrojel filmler içinde 50 ml su tutma kapasitesini belirlemek için hazırlanan test çözeltisi bulunan 250 ml’lik bir erlen içine konulmuştur. Erlen 60 s boyunca hızlıca döndürülmüştür. Sonuçlar, test yöntemine göre ‘dispersiyon var’ ya da ‘yok’ şeklinde ifade edilmiştir (Şekil 7.18).

7.2.9.5 pH değeri

Hidrojel filmler 1:100 ($w\ v^{-1}$) oranında deiyonize su içine konulmuş ve oda sıcaklığında 24 saat boyunca bekletilmiştir [426]. Çözelti pH değeri WTW marka taşınabilir pH metre ile ölçülmüştür. 3. ve 24. saatlerde belirlenmiştir.

7.2.9.6 Birim alan başına ortalama kütle ve kalınlık

Hidrojellerin birim alandaki kütle ($g\cdot m^{-2}$) ve kalınlıkları (mm) [401] standartlarına göre belirlenmiştir. Kuru hidrojel filmler 5 cm × 5 cm boyutunda kesilmiş, tartılmış ve ağırlıkları alanlarına bölünerek ortalama kütleleri hesaplanmıştır. Kalınlık elektronik bir kalınlık ölçer ile ölçülmüştür.

7.2.10 *In vitro* hücre canlılığı

Numunelerin hücre canlılığı üzerine etkisi WST-1 hücre yayılım analizi (Roche, Mannheim, Almanya) ile Doç. Dr. Saime Batırel (Marmara Üniversitesi) tarafından tayin edilmiştir. PCS-201-012 insan dermal fibroblast hücreleri (ATCC), 96 kuyucuklu petri kaplarına 5×10^3 hücre / kuyucuk yoğunluğunda ekilip, 37 °C’de % 5 CO₂ ile nemlendirilmiş bir ortamda 24 saat boyunca tutulmuştur. Ardından ortam uzaklaştırılıp, 350 µL taze ortam ile doldurulmuştur. 2 ± 0.02 mg ağırlığında kesilmiş hidrojel numuneleri kuyucukların içine konulmuştur. 24 saatlik inkübasyon sonucu ortam ve numuneler alınmış ve 100 µL taze kültür ortamı ve 10 µL WST-1 ajan ile değiştirilmiştir. Formazan kristallerinin absorbansı 400 nm’de bir mikropilaka okuyucu (Molecular Devices, CA, US”111A) ile ölçülmüştür. Uygulama gruplarının absorbans değerleri kontrol grubuna karşı absorbans yüzdesi olarak bulunmaktadır. Her bir deneyde üçlü deney seti kullanılmış ve üç bağımsız deney uygulanmıştır. Sonuç ANOVA programı SPSS versiyon 13.0 (SPSS, Chicago, IL) kullanılarak analiz edilmiştir.

7.2.11 Hidrojel filmler için *in vitro* yara iyileşmesi çalışmaları

Hazırlanan hidrojel filmlerin, fibroblast hücreleri üzerindeki yara tedavisi potansiyellerini gözlemlemek için yara iyileşme analizi Doç. Dr. Saime Batırel (Marmara Üniversitesi) tarafından yapılmıştır. PCS-201-012 insan dermal fibroblast (American Tissue Culture Collection, VA, ABD) hücreleri, kolajen kaplı 24 kuyucuklu deri kültür petri kaplarına ekilmiş ve 37 °C ve 5% CO₂ ortamında tutulmuştur. Hücre bağlanmasının ardından bir pipet ucu ile hücrelere çizik atılmıştır. Hücreler, 48 saat boyunca farklı tipte hidrojellere ve sadece kültür ortamına uygulanmıştır. Çizik alanının fotomikrografikleri, bir mikroskop tarafından (Carl Zeiss, Jena, Almanya) hücre kültür ortamını değiştirmeden 0., 24. ve 48. inkübasyon periyodlarında alınmıştır. Deneyler en az iki defa tekrarlanmıştır.

7.2.12 Antibakteriyel analiz

Antibakteriyel etkinlik çalışması Marmara Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı laboratuvarlarında Dr. Burak Aksu tarafından gram negatif bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ve gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 test

organizmalarına karşı yapılmıştır. Merkezde kontrol amaçlı STX diski (Trimethoprim-sulfamethoxazole, 25µg) kullanılmıştır.

7.3 Sonuçlar ve Tartışma

LM-pektin-zeolit hidrojeller iyonotropik jelleşme metoduyla hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak CaCl_2 , plastikleştirici olarak gliserin kullanılmıştır. ZnA ve NaA zeolit (Zn^{2+} ve Na^+ yüklü zeolit A) partikülleri membran çekirdek (ilaç yükleme) birimi olarak kullanılmakta ve aynı zamanda polimer zincirleri ile kısa mesafeli etkileşimler yaparak filmlerin stabilitesini arttırmaktadır [1].

Optimum ilaç salım performansı verebilecek LM-pektin/zeolit/ilaç hidrojel filmleri geliştirilmek amacıyla çeşitli formülasyonlar denenmiştir (Çizelge 7.1). Kontrollü salım yapabilen yara örtüsü formundaki bu hidrojel filmlerin (i) hazırlama metodu, (ii) çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, (iii) zeolit konsantrasyonu ve (iv) zeolite bağlı katyon cinsi olmak üzere dört farklı tasarım parametresi üzerinde çalışılmış ve her bir parametrenin malzemenin performansına etkisi ayrı ayrı incelenmiştir.

Hazırlanan hidrojel filmlerin yüzeylerinde por veya çatlak bulunmamaktadır; hastaya sıkıntı vermeden yarayı izleyebilecek şekilde homojen ve transparandır. Zeolit partikülü içermeyen LM-pektin filmler, zeolitli filmlere göre daha transparandır (Şekil 7.4). Filmlerin yüzeyinde ilaç kristallerine rastlanmamıştır.

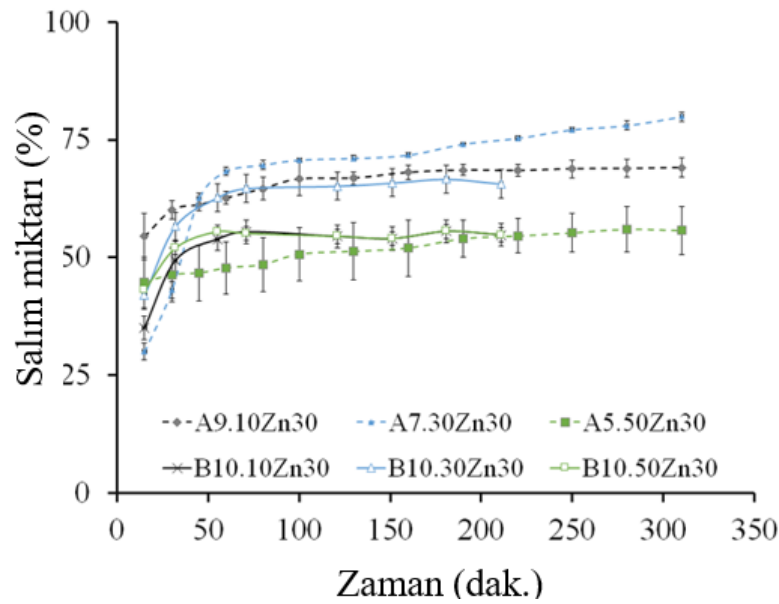


Şekil 7.4 : Kuru hidrojel filmler [2].

7.3.1 İlaç yüklü pektin-zeolit hidrojel hazırlama metodu tayini

Yöntem bölümünde açıklandığı gibi, ilaç yüklü pektin-Na-zeolit hidrojel filmler A (membran), B (matriks) ve C (membran) olmak üzere üç farklı hazırlama metodu ile hazırlanmıştır. A ve C kodlu hidrojellerde ilaç, membran çekirdek bölümü olarak kullanılan zeolit partiküllerine yüklenmiştir. A kodlu hazırlama metodunda, ilaç yüklü zeolit süspansiyonun tamamı pektin-gliserin çözeltisine karıştırılırken, C kodlu hazırlama metodunda ise, ilaç yüklü zeolit süspansiyonu süzülerek kurutulmuş,

ardından pektin-gliserin karışımına yüklenmiştir. Her bir prosedür için çapraz bağlayıcı, ilaç ve zeolit konsantrasyonun ilaç salım profiline etkisi incelenmiştir. Şekil 7.5 ve Çizelge 7.2’de görüldüğü gibi membran sistemle hazırlanan A-kodlu hidrojeller yaklaşık %70 kümülatif ilaç salımı ile diğerlerine göre daha kontrollü bir salım profili sergileyerek en yüksek ilaç salım miktarına ulaşmıştır. C kodlu membran filmler ise çok az miktarda ilaç salabilmiştir. Bu aradaki salım farkının, filmin hazırlanması sırasında kullanılan su miktarı farkından kaynaklandığı düşünülmektedir. C kodlu filmler, A kodlu filmlere göre çok daha az miktarda su ile hazırlanmışlardır.



Şekil 7.5 : Farklı metotlarla hazırlanan hidrojellerin ilaç salım profilleri [2].

B-kodlu filmlerde ise, kümülatif ilaç salım miktarı yüksek olmasına rağmen patlama (*burst*) salım gözlenmiştir. Porlu yapıdaki hidrojellerde görülebilen patlama salım, matriks sistemlerin en büyük handikaplarından biridir [350, 427]. Mikropartiküller içindeki porlar, salım ortamı sıvısı (*örn.* tampon çözelti) filmin içine daha hızlı penetrasyonunu sağlamakta ve böylece ilaç, film yüzeyine daha hızlı difüze olmaktadır [427]. Patlama salımı, molekül büyüklüğü ve ozmotik basınç nedeniyle, özellikle düşük molekül ağırlıklı ilaçlarda daha çok gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, özellikle yara tedavisinin başlarında kontrollü salım öncesi patlama salım, hızlı tedavi için istenen bir özellik olabilir [350]. Ancak patlama salımın kontrol edilmesi zordur. Elde edilen sonuçlara göre bu çalışmada, patlama salım miktarı daha az olup, daha kontrollü ve fazla miktarda kümülatif ilaç salımı yapabilen A

metodu hidrojel hazırlama metodu olarak seçilmiştir. Karakterizasyon, ilaç yükleme ve salım mekanizmaları bu metotla hazırlanan hidrojeller için tartışılacaktır.

Salım ortamı karıştırma hızını belirlemek amacıyla, A7.30Zn30 hidrojelinin ilaç salım çalışmaları 100 ve 200 d/d karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. İlacın çözünmesinin ardından salım ancak uygun salım çözeltisi miktarı ve karıştırma hızı ile sağlanabilmektedir. Çalkalayıcılar ilacın durgun tabakadan difüze olmasına yardımcı olmaktadır. Salım hızı genellikle kullanılan karıştırıcının cinsi, sistemdeki akışın cinsi (laminar veya türbülanslı) ve hidrojin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Elde edilen sonuçlara göre (Çizelge 7.2) A7.30Zn30 hidrojelinin ilaç salımı, karıştırma hızı 200 d/d'den 100 d/d değerine düşürüldüğünde sırasıyla % 80.7' den % 69.3'e düşmüştür. Salım ortamının karıştırma hızı arttıkça, jel tabakasının bütünlüğü azalmakta ve böylece ilaç salımı artmaktadır [429]. Bu nedenle deneylere 100 d/d karıştırma hızı ile devam edilmesine karar verilmiştir.

7.3.2 Yapısal, ısı ve reolojik karakterizasyon

7.3.2.1 FT-IR ve DSC analizleri

Şekil 6.6'da görülen Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektrumu analizi yardımıyla hidrojel filmlerde pektin, plastikleştirici malzeme, çapraz bağlayıcı CaCl_2 ve ilaç teofilin arasındaki fizikokimyasal etkileşimler incelenmiştir. Saf LM-pektin spektrumunda 3395 cm^{-1} civarındaki geniş bant, polisakkarit zincirlerindeki hidrojen bağları, O-H ve N-H gerinim bantlarından kaynaklanmaktadır. $2920\text{--}2880 \text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki pik, C-H alifatik gerinim bandını temsil etmektedir. Spektroda görülen 1677 cm^{-1} (karboksilat iyonları asimetric titreşim), 1615 cm^{-1} (COO^- grupları) ve 1410 cm^{-1} (karboksilat grupları C-OH gerinim bandı) saf LM-pektinin diğer karakteristik bantlarıdır [430]. Gliserin içeren LM pektin hidrojelinin spektrası detaylı incelendiğinde, saf pektin spektrasındaki 1615 cm^{-1} pikinin, LM-pektin hidrojel spektrasında daha düşük dalga boyuna kaydığını ve aynı zamanda daha belirgin hale geldiğini görülmektedir. Bu durum hidrojel oluşumu ile hidrojen bağlarının arttığının bir göstergesidir. Saf LM-pektin spektrasındaki 1677 cm^{-1} pikinin, LM-pektin hidrojeli spektrasında 1670 cm^{-1}

hidrojelleri için bu değişiklik gözlenmemiştir. Bu spektral kaymanın sonuçları şişme ve ilaç salımında kendini göstermiştir (detaylar **Bölüm 7.3.5'te** tartışılacaktır). İlaç yüklü hidrojellerde, karboksilat iyonlarının titreşim pikini temsil eden (1675 ve 1563 cm^{-1}) pikleri, NaA zeolit hidrojel filmlerinde başlangıç ilaç konsantasyonunun artışıyla kaymıştır. Bu kayma, Na^+ ve Ca^{2+} iyonları arasında bir iyon değişimi olabileceğini göstermektedir [431]. Özellikle, A7.30Na30 ve A7.30Na60 hidrojellerinin spektrumunda gözlenen 1563 and 1566 cm^{-1} bantlarının, Ca^{2+} ile teofilin molekülünün imidazol halkasındaki N7 atomu arasındaki etkileşimden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgular, NaA zeolit filmlerinden Ca^{2+} salımında önemli rol oynayan metal-teofilin kompleksinin oluştuğunu göstermektedir.

FT-IR spektrumundan ilaç salım mekanizmasında önemli rol oynayan iyon değiştirme mekanizmalarını ve hidrojellerin iyonik mukavemetindeki değişiklikleri de gösteren veriler elde edilmiştir (detaylar 7.3.5 bölümünde tartışılacaktır). Bu verilerden, sentezlenen hidrojellerde yeni yapıların oluşmadığını, moleküler bütünlüğün bozulmadan ve ilaç moleküllerinin hidrojellere başarılı bir şekilde dağıtıldığı anlaşılmaktadır.

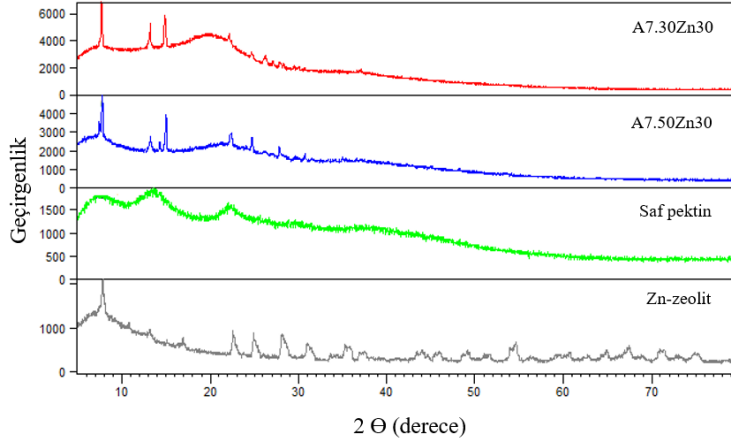
DSC analizi verilerine göre (Çizelge 7.3), bütün hidrojeller yaklaşık 48 ve $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ civarında iki farklı T_g noktası göstermiştir. A7.30Zn30 filminin en düşük kristalizasyon sıcaklığı ve entalpisine sahip olması, bu hidrojin diğer hidrojellerden farklı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu filmin farklılığı ilerideki bölümlerde detaylı olarak tartışılacaktır.

Çizelge 7.3 : Zeolit ve ilaç miktarı ile katyon cinsinin film yapısına ve ilaç salımına etkisi.

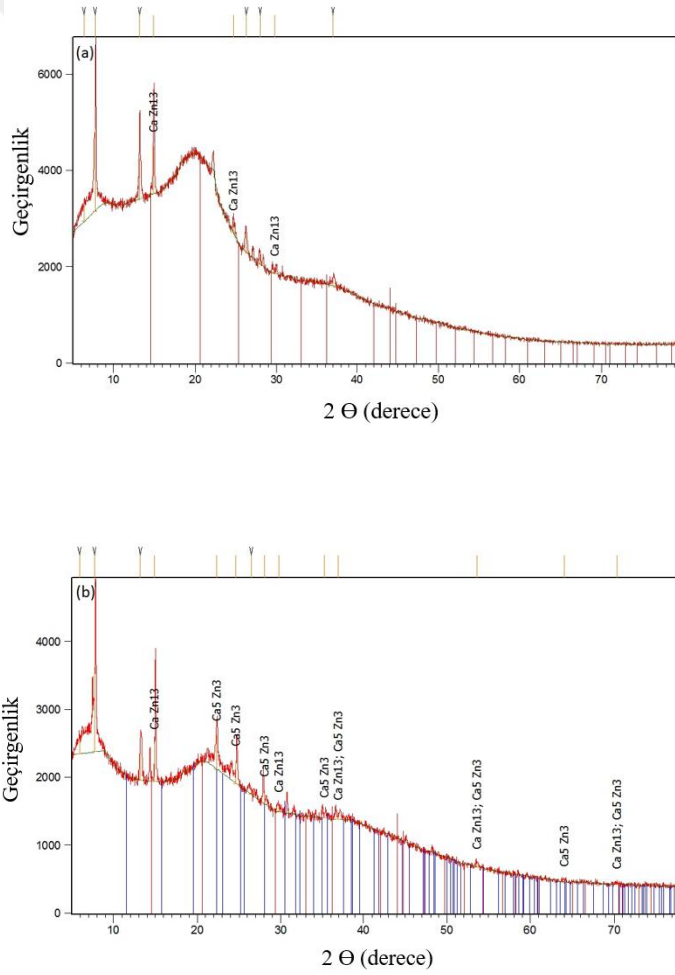
Kod	Na-zeolit (mg)	Zn-zeolit (mg)	İlaç (mg)	Kristallenme Sıcaklığı (°C)	Kristallenme Entalpisi (J/g)	Şişme Oranı	Maksimum salım miktarı (%)
A7.30Na30	30	-	30	195	-11	9.1±1.4	34.9±2.5
A7.50Na30	50	-	30	195	-9.7	8.9±1.2	49.7±2.6
A7.30Zn30	-	30	30	191	-2.8	14.4±0.8	69.8±2.4
A7.50Zn30	-	50	30	194	6.1	7.7± 0.3	43.6±1.3
A7.30Na60	30	-	60	-	-	12.7±0.5	76.9±1.2
A7.50Na60	50	-	60	-	-	18.2±0.0	85.9±0.9
A7.30Zn60	-	30	60	-	-	5.9±0.7	68.3±1.5
A7.50Zn60	-	50	60	-	-	10.2±1.7	76.7±1.1

7.3.2.2 XRD spektrofotometre sonuçları

Şekil 7.7' ve 7.8'de zeolit partikülleri, saf LM-pektin polimeri ile A7.30Zn30 ve A7.50Zn30 hidrojel filmlerinin X-ışını desenleri görülmektedir. Saf LM-pektinin verdiği geniş pik, polimerin amorf yapısını temsil etmektedir. Zeolit partikülleri X-ışını deseni ise zeolitin kristalin doğasını açıkça göstermektedir. Zeolit partikülleri $2\Theta = 6^\circ$ da yüksek oranda kristalin yapı göstermektedir. Diğer ayırt edici pikler $2\Theta = 23, 26, 29$ ve 31 pikleridir. 30Zn30 ve 50 Zn30 hidrojel filmlerin XRD desenleri, zeolit partiküllerinin polimer içine dağıtıldığı durumda da kristalinitesini koruduğu gözlenmiştir. Filmlerde çeşitli Ca_xZn_y kompleksleri (A7.30Zn30 filminde $CaZn_{13}$; A7.50Zn30 filminde ise $CaZn_{13}$ ve Ca_5Zn_3) olduğu belirlenmiştir (Şekil 7.7 ve 7.8). Oluşan bu farkın Zn^{2+} 'nın başlangıç konsantrasyonu farkından kaynaklandığı düşünülmektedir [432]. Daha yüksek miktardaki Zn^{2+} , A7.30Zn30 filmi içinde iyonik formda kalabilmiş ve bu durumda daha fazla çapraz bağlayıcı davranışı göstermiştir.



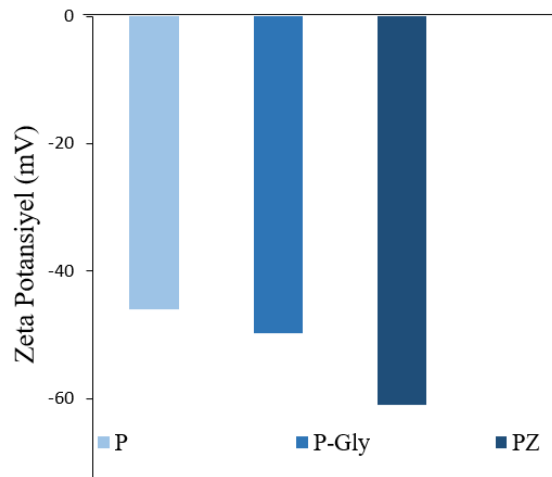
Şekil 7.7 : Saf pektin, saf Zn-zeolit, A7.30Zn30 ve A7.50Zn30 hidrojellerinin XRD desenleri.



Şekil 7.8 : XRD spektra ile belirlenen Ca_xZn_y kompleksleri (a) A7.30Zn30, (b) A7.50Zn30.

7. 3.2.3 Zeta potansiyel ölçümü

Zeta potansiyel (ζ) bir partikülün bulunduğu çevredeki elektrokimyasal yüzey özelliğini tanımlamaktadır [433]. pH 6,4 ortamında ölçümü yapılan bütün çözeltilerin zeta potansiyelleri negatif olarak ölçülmüştür (Şekil 7.9). Çok düşük ζ değerine sahip dispersiyonlar, partiküller arası van der Waals çekme kuvvetlerinden dolayı agregasyona uğrayabilirler. LM-pektin, LM-pektin – gliserin ve LM-pektin – gliserin –Na zeolit çözeltilerinin ζ değerleri sırasıyla -46.0 ± 0.3 , -49.8 ± 0.7 ve -61.0 ± 0.2 mV olarak ölçülmüştür. $\zeta +25$ mV'den büyük veya -25 mV'den küçük ise çözelti stabil bir çözeltidir. Bu değerler, hazırlanan tüm sentez çözeltilerinin stabil bölgede olduğunu göstermektedir. LM-pektin çözeltisine gliserin çözeltisi eklendiğinde zeta potansiyel değerinde çok az bir değişiklik olmakta; buna karşın zeolit ilavesi bu değeri önemli derecede değiştirmektedir. Bu durum zeolit partiküllerinin ilavesiyle matrise eklenen yük yoğunluğunu göstermektedir.

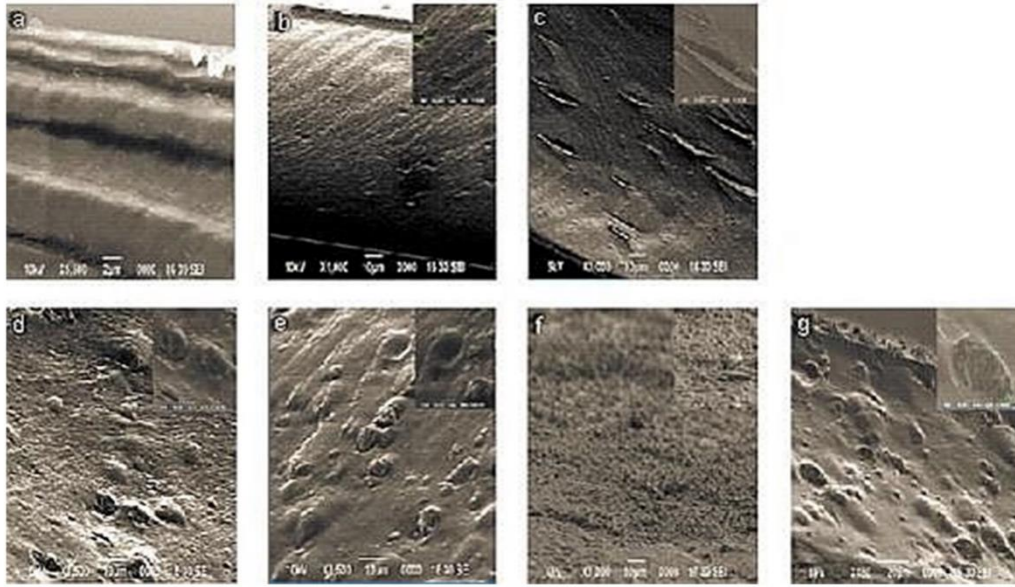


Şekil 7.9 : LM-pektin (P), LM-pektin-gliserin (P-Gly) ve LM-pektin-gliserin-NaA zeolit (PZ) çözeltilerinin zeta potansiyel değerleri.

7.3.2.4 Taramalı elektron mikroskopu analizi

Kuru filmlerin ara kesitlerinin taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri Şekil 7.10'da gösterilmiştir. Şekil 7.10a'da %2'lik saf LM-pektin çözeltisinin kurutulmasıyla hazırlanan örneğin SEM görüntüsünde yol yol, pürüzsüz ve gözeneksiz bir morfoloji görülmektedir. Şekil 7.10.b'deki pektin hidrojel filmlerin de nisbeten pürüzsüz olduğu, buna karşın yapıda ~ 4 μm çapında küresel gözenekler olduğu not edilmiştir. Pektin filmlere teofilin yüklendiğinde ise film pürüzsüzlüğünü korumuş ancak küresel gözenekler dar yarıklara dönüşmüştür (Şekil 7.10c). İlaç yüklü pektin

filmin daha büyük ve dairesel çukurları olan SEM görüntüsü, ilacın pektin kanallarına doğru difüze olduğunu ve bu yolla hidrojele yüklendiğini göstermektedir.



Şekil 7.10 : Hidrojellerin SEM görüntüleri; (a) saf pektin, (b) pektin hidrojel, (c) ilaç yüklü pektin hidrojel, (d) A7.30ZnO, (e) A7.50ZnO, (f) A7.30Zn30, (g) A7.50Zn30 [2].

Pektin filme zeolit partiküllerinin eklenmesiyle (A7.30Zn0 ve A7.50Zn0) daha düzensiz ve büyük gözenekler oluşmuş ve gözeneklerin dağılımı, zeolit içermeyen pektin hidrojele göre daha düzensiz bir morfoloji sergilemiştir (Şekil 7.10 d-e). Yapı birbiri üstüne geçen tabakalardan oluşmuş daha pürüzlü bir hale dönüşmüş ve farklı fazların oluşmasıyla yapısal bir düzensizlik belirmiştir. Beklendiği gibi daha porlu bir yapı oluşmuş, porlarda küçük küçük partiküller bulunduğu görülmüştür. Bu sayede de solventin hidrojele difüzyonu artacaktır. Bu yapısal değişim ile hidrojin oksijen geçirgenliği, şişme oranı ve kümülatif ilaç salım miktarının artacağı düşünülmektedir. Hidrojellere eklenen zeolit parçacıklarının miktarının artırılması, filmlerin morfolojisinde kayda değer bir değişikliğe yol açmamıştır.

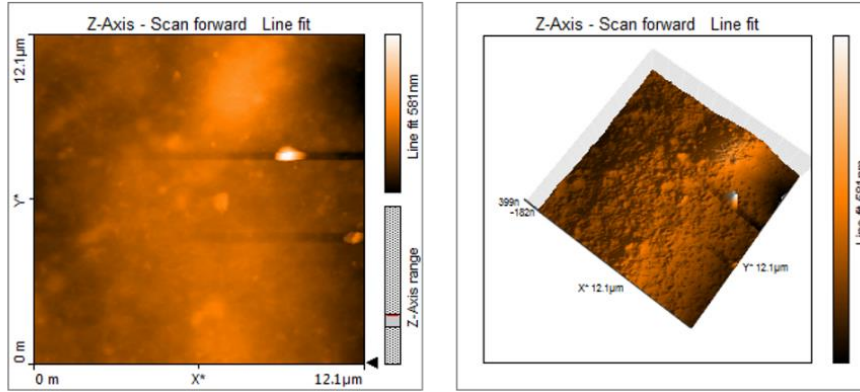
A7.30Zn30 hidrojel filminin topografik yüzeyi çok kalabalık bir görüntü vermiştir (Şekil 7.10.f). Bu numune kübik zeolit-A morfolojisine benzeyen çok sayıda keskin kenarlı kristallerin varlığıyla, diğer formülasyonlardan oldukça farklı bir yapı sergilemiştir. İlacın hidrojele yüklenmesiyle, zeolit partiküllerinin LM-pektin içindeki sıkı yapısının değişikliğe uğradığı ve partiküllerin daha geniş bir alana yayıldığı düşünülmektedir. Bu durum, ileride detaylı olarak anlatılacağı gibi, zeolite bağlı Zn^{2+} 'nın pektin zincirlerinin galakturonik asit rezidüsünün COO^- ve OH^- grupları ile

etkileşerek, ek çapraz bağ görevi yapması sonucu gerçekleşmiş olabilir. A7.30Zn30 hidrojel filminin diğer filmlerden farklı yapısı FT-IR, kristalizasyon entalpisi, iyon salımı, şişme oranı ve ilaç salım performanslarında da kendini göstermiştir. Buna karşın daha fazla miktarda zeolit partilükü içeren A7.50Zn30 (Şekil 7.10.g) filminin morfolojik yapısı ilaçsız film ile benzerdir. Genel olarak, numunelerin gözenek yapılarındaki farklılıklar, pektin matriksin kanallarına ilaç difüzyonunun bir göstergesi olabilir. Pektin filme zeolit ilavesi, çözücü tutulumu ve ilaç salımını artıran daha gözenekli bir yapı ortaya koymuştur. Elde edilen SEM görüntüleri, pektinin ilaç salımı için çok uygun olan porlu bir matriks oluşturduğunu göstermektedir.

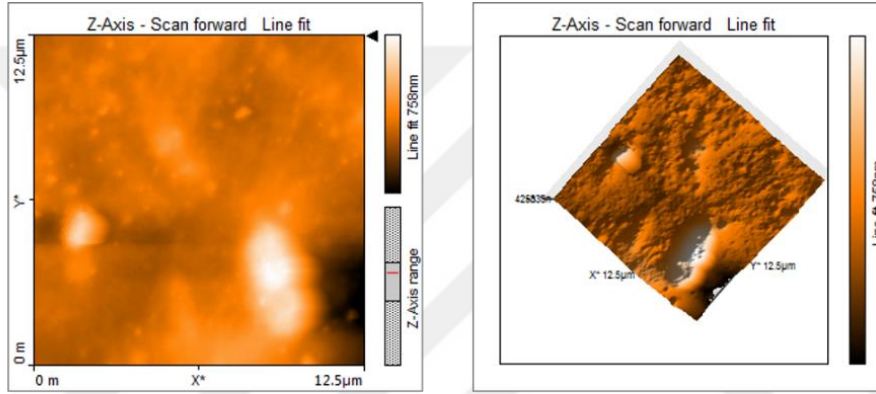
7.3.2.5 AFM analizi

Laboratuvarımızda yapılan önceki çalışmalarda [124, 173], bu çalışmadaki formülasyon kullanılarak hazırlanan pektin hidrojelinin ortalama yüzey pürüzlülüğü (Sa) değeri 20,4 nm, 2-tiobarbitürik asit eklenmiş pektin hidrojelinin Sa değeri ise 21,8 nm olarak ölçülmüştür. A7.30Zn0 ve A7.50Zn0 hidrojellerinin yüzey topolojisi ve Sa değerleri Şekil 7.11’de görülmektedir. 30 mg zeolit içeren hidrojel (A7.30Zn0) Sa değeri 49,6 nm iken, bu değer 50 mg zeolitli hidrojelde (A7.50Zn0) 60,2 nm’ye çıkmıştır. Pektin-zeolit hidrojel içindeki zeolit miktarı arttıkça Sa artmıştır. Bu sonuçlar, zeolit ilavesiyle porların genişlediğini gösteren SEM verileriyle (Şekil 7.10) ile uyumludur. Zeolit ilavesi pektin hidrojellerinin kristalinitesini arttırıp, difüzyon yolu üstünde bir engel olarak davranmaktadır. Zeolit partikülleri hidrojel matriks içinde esas işlevi olan ilaç taşıyıcı bir malzeme olarak görev yapmasının yanı sıra, pektin hidrojellerin hem kristalinitesini arttırarak hem de büyük olasılıkla difüzyon yolunda bir engel oluşmasına neden olarak ilaç salımını daha kontrollü hale getirmiştir.

30NaO Sa=49.618



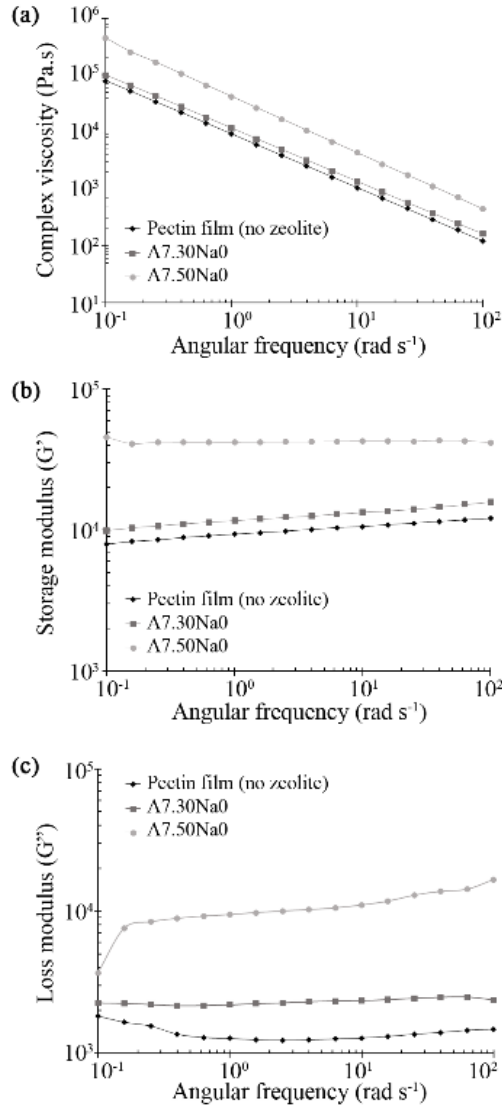
50NaO Sa=60.21



Şekil 7.11 : 30NaO ve 50NaO hidrojel filmlerin AFM görüntüleri.

7.3.2.6 Reolojik analiz

Hidrojellerin yapı-fonksiyon ilişkisi hakkında yorum yapabilmek amacıyla, reolojik davranışlar izlenerek kimyasal yapı ile ilişkilendirilmiştir. Polisakkaritlerin su molekülleri ile moleküller arası veya molekül içi bağlanması, özellikle polisakkarit zincirinde yüklü fonksiyonel grupların bulunması durumunda oluşan yapının dinamik özelliklerine etki etmektedir [435]. Konsantrasyon, viskozite ve kimyasal özellikler ile kontrol edilebilen jel dayanımı, hidrojel filmin performansı için çok önemlidir [436]. Şekil 7.12’de LM-pektin ve LM-pektin-zeolit hidrojellerinin henüz tam kurumadan gerçekleştirilen osilasyon analizi sonuçları görülmektedir. LM-pektin, gliserin, zeolit ve CaCl_2 arasında kimyasal bir reaksiyon gerçekleşmemesine rağmen, bileşenlerdeki konsantrasyon değişimine bağlı olarak, viskozite ve elastisite değerlerinde değişiklik olmuştur.



Şekil 7.12 : Zeolitsiz, 30 ve 50 mg zeolitli pektin filmlerin frekansa bağlı (a) depolama modülü, (b) kayıp modülü ve (c) kompleks viskozite grafikleri [2].

Analizi yapılan bütün filmler tipik jel benzeri davranış göstermişlerdir. Şekil 7.12’de LM-pektin hidrojel, 30 mg zeolitli (A7.30Na0) ve 50 mg zeolitli (A7.50Na0) çözeltilerin frekansa bağlı olarak kompleks viskozitelerindeki değişim görülmektedir. Frekans artışı ile kompleks viskozitedeki lineer düşüş, kesme incelmesi yapısına sahip olduklarını göstermektedir [381]. LM-pektin ve LM-pektin-zeolit hidrojellerinin elastik yapısının büyük oranda LM-pektin, CaCl₂ ve zeolit partikülleri arasındaki elektrostatik etkileşimden etkilendiği belirtilmiştir [437].

Reolojik analiz verileriyle hidrojel mikroyapıları da irdelenmiştir. Bütün çapraz bağlı hidrojellerin depolama modüllerinin (G'), kayıp modüllerine (G'') göre önemli ölçüde yüksek olduğu hesaplanmıştır (Şekil 7.12 b,c). Elde edilen sonuçlara göre, pektin ve pektin-zeolit hidrojellerin G' ve G'' değerlerinin frekansa bağlı olarak önemli bir

değişiklik göstermediği ve birbirine yüksek oranda bağlı jel benzeri yapı oluşturduğunu göstermektedir [381]. Kompleks viskozite grafiğinde de görüldüğü gibi LM-pektin filme zeolit ilavesiyle G' değeri önemli ölçüde artış göstermiştir. Daha yüksek G' değeri, büyük olasılıkla LM-pektin zincirleri ve zeolit partikülleri arasındaki etkileşimden dolayı, daha kuvvetli bir yapıyı ve bunun sonucu olarak jel rijitliğinin artışı göstermektedir. Şekil 7.12.b'de görüldüğü gibi, LM-pektin hidrojelinin G' değeri, zeolit katkılı hidrojelden çok düşüktür. Bu verilerden de, LM-pektin hidrojel matrikse zeolit partikülleri ilavesinin, hidrojin mekanik özelliklerini arttırdığı söylenebilir. Bu artışın aynı zamanda LM-pektin ile zeolit partikülleri arasındaki ikincil bağlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

7.3.2.7 Temas açısı analizi

Pektin-zeolit hidrojel filmlerinin yüzeylerinin suya olan ilgisi temas açısı ölçümü ile belirlenmiş [438] ve bu özelliğe zeolit konsantrasyonu, katyon tipi ve ilaç varlığının etkisi incelenmiştir. Pektin-gliserin çözeltisine zeolit eklenmesiyle zeta potansiyel değerinde önemli miktarda değişiklik olmuştur (Şekil 7.8). Pektin hidrojel filmin temas açısı değeri 55° [124] iken, bu değer zeolit ilavesiyle pektin-zeolit hidrojeline Na-zeolit A katkılı hidrojel için 65° , Zn-zeolit A hidrojel için ise 59° olarak ölçülmüştür. Hidrojel üzerindeki yüksek yük miktarı, su molekülleri ile etkileşime girerek hidrojen bağları oluşturmakta ve böylece yüzey nemliliği artarak temas açısı değerini düşürmektedir. Buna karşın temas açısı ölçümlerinden görüldüğü gibi, elektronegativitedeki azalma daha hidrofobik bir yapı oluşturmaktadır. Pektin zincirleri üstündeki COO^- grupları ile Ca^{2+} iyonları arasındaki etkileşim sonrası, çapraz bağlı hidrojellerin zeta potansiyel değerlerinin daha düşük elektronegatif değer vermesi beklenmektedir. Daha yüksek negatif zeta potansiyel değerine sahip pektin-zeolit çözeltisi için daha yüksek temas açısı değeri ölçülmüştür [439].

Hidrofobik yüzeyler, yüzey pürüzlülüğünün arttığı durumlarda hidrofilik bölümlerden oluşmaktadır. SEM görüntülerinde (Şekil 7.10) açık bir şekilde görüldüğü gibi A7.30Zn30 hidrojeli en pürüzlü ara kesite sahiptir. Bunun, aşırı derecedeki çapraz bağlanmanın, ilaç salımına da etki edecek şekilde düzensiz 3-boyutlu bir yapı oluşturmaktan [440] kaynaklandığı düşünülmektedir. Detaylar, Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonu salım bölümünde tartışılacaktır.

7.3.2.8 Oksijen geçirgenliği

A7.30Zn30 ve pektin hidrojelin oksijen iletim hızı (OTR) sırasıyla 33 ve 0.15 barrer olarak ölçölmüştür. A7.30Zn30, zeolitin düzenli gözenekli yapısı nedeniyle pektin filminden çok daha yüksek OTR sergilemiştir. Yüksek oksijen geçirgenlik hızı yara tedavisinde önemli bir parametredir. Yeterli oksijenin yara onarma prosesinde ek enerji kaynağı olarak görev yaptığı bilinmektedir. Oksijen, bakterileri oksidatif öldürmesi, epitelizasyon, damarlanma ve kolajen sentezi gibi yara tedavisinin farklı adımlarında kullanılmaktadır [441]. Hidrojel filmlere zeolit partiköllerinin eklenmesiyle, zeolit-LM pektin ara yüzeyindeki boşluklar ağ yapı kanallarını oluşturmakta ve böylece gaz geçirgenliği artmaktadır. Buna karşın, zeolitten zengin bölgelerdeki serbest hacimdeki artış, diğer bölgelerdeki sıkışmayı arttıracak ve gaz difüzyonunu kısıtlayacaktır. A7.30Zn30 filmi, kritik bir noktanın üstündeki çapraz bağ miktarına sahip olduğundan (detaylar ilerideki bölümlerde verilmiştir) heterojen 3-boyutlu bir yapıya sahip olmuş ve bu nedenle oksijen geçirgenliği de çok artmıştır.

7.3.3 Şişme davranışı

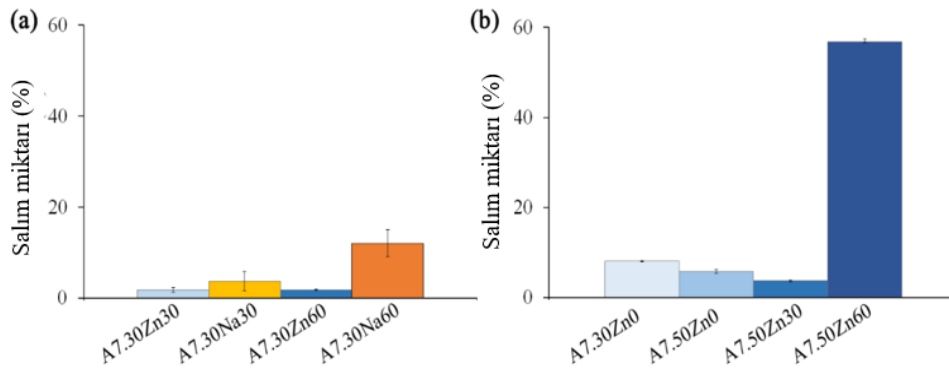
Daha önce Bölüm 6’da tartışıldığı üzere, ilaç salım kinetiği hidrojel tabakasındaki ilaç konsantrasyon gradyenine bağlıdır. İlaç salımı sırasında, pektin jel tabakası şişme nedeniyle hareketlenen zincirlerin etkisiyle sürekli olarak yapısal bir değişikliğe uğramaktadır [54]. Burada, hidrojel tabakasının kalınlığı solventin penetrasyonu, zincirlerin dolaşıklığı ve solventteki toplam kütle (polimer ve ilaç) aktarımından etkilenir [436]. Sonuç olarak, ilaç konsantrasyonu ve hidrojel film kalınlığı, ilaç akısını/salımını domine etmektedir.

A7.30Zn30 ve A7.50Na30 dışındaki bütün hidrojel filmlerin şişme oranı ve ilaç salım performansları arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (Çizelge 7.2). Aynı kompozisyondaki filmler karşılaştırıldığında, Zn-zeolit filmlerin şişme oranlarının Na-zeolit filmlere göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durum, Zn^{2+} ’nın valans elektron sayısından kaynaklanmaktadır (aşağıdaki bölümde detaylı olarak anlatılacaktır). SEM analizinde (Şekil 7.10) göröldüğu gibi morfolojik yapısı da diğer hidrojellerden farklı olan A7.30Zn30 beklendiğinden daha yüksek bir şişme oranı vermiştir.

7.3.4 Ca²⁺ ve Zn²⁺ iyon salımı

İlaç moleküllerinin yanısıra çapraz bağlama katyonu Ca²⁺ ve zeolit partiküllerine bağlı katyon Zn²⁺ da şişme esnasında hidrojelden salınmaktadır. Şekil 7.13'te verilen ICP sonuçlarına göre, Na-zeolit hidrojellerinde başlangıç ilaç konsantrasyonu artışıyla, Ca²⁺ salımı da artmıştır. A7.30Na60 hidrojelinden Ca²⁺ iyonu salımı, A7.30Na30 hidrojeline göre daha fazla gerçekleşmiştir. Teofilin molekülünün Ca²⁺, Zn²⁺ gibi iki valanslı katyonlarla, Na⁺ gibi tek valanslı katyonlara göre daha kuvvetli etkileşime girdiği bilinmektedir [431]. Bölüm 7.3.2.1'de FT-IR spektra üzerinden tartışıldığı gibi, Na-zeolit hidrojelinde ilaç miktarının artışı ile teofilin- Ca²⁺ absorpsiyon bandını temsil eden 1675 cm⁻¹ piki 1670 cm⁻¹'e kaymıştır. Bu kayma Ca²⁺ ile teofilin arasında bir etkileşim gerçekleştiğini göstermektedir [442]. Elde edilen sonuçlar, ilaç moleküllerinin ortamdaki katyonlarla, özellikle Ca²⁺ ve Zn²⁺ ile etkileşime girerek tampon çözelti ortamına taşıdığı ve bu ortamın iyon konsantrasyonunu değiştirerek yumurta kutusu yapısını bozduğunu göstermektedir. Zn-zeolit hidrojellerinde ise Ca²⁺ iyonu salımı ilaç miktarına bağlı olarak bir değişiklik göstermemiştir.

Kullanılan Zn-zeolit miktarı 30 mg g-film⁻¹'den (A7.30Zn60 filmi) 50 mg g-film⁻¹'e arttırıldığında (A7.50Zn60 filmi), teofilin yanısıra başlangıç Zn²⁺'nın % 60'ı salınmaktadır (Şekil 7.13.b). Bu durum, A7.50Zn60 hidrojelinin galakturonik asit zincirlerinin COO⁻ grupları çapraz bağlayıcı ile doyduktan sonra, açıkta kalan fazla Zn²⁺ iyonları ve teofilin moleküllerinin etkileşmesi ile açıklanabilir. Bu sonuçlar, şişme ve ilaç salım sonuçlarını da desteklemektedir (Çizelge 7.3). Öte yandan, Zn²⁺ iyonu, kolajen sentezi ile hücre canlılığını desteklemesi ve serbest radikal aktivitesini düşürüp bakteri büyümesini azalttığı için yara tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 7.13 : Hidrojellerden (a) Ca²⁺ iyonu (b) Zn²⁺ iyonu salımı [2].

7.3.5 İlaç yükleme ve salımı

7.3.5.1 Zeolit partiküllerine ilaç yükleme ve salımı

Farklı ilaç (30 ve 60 mg) ve zeolit (10, 30 ve 50 mg) konsantrasyonlarında bir dizi deney yapılmıştır. İlaç moleküllerinin yaklaşık % 99'u 2 saat içinde zeolit partiküllerine yüklenmesine rağmen, Zn-zeolit ve Na-zeolit partiküllerinden sırasıyla, ilacın % 0,25 ve % 0,05'i pH 6,4 TRIS tampon çözeltisine salınabilmiştir (Çizelge 7.2). Bu durumun teofilin molekülü ile zeolit kafes yapısı arasındaki kuvvetli moleküler etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İlaç moleküllerinin zeolit üstüne tutunduğu ve aralarındaki kuvvetli etkileşimden dolayı salınamadığı düşünülmektedir. Grubumuzda gerçekleştirilen Na-zeolitA-teofilin MD simülasyonu bulguları da bu verileri desteklemektedir. Buna karşın, ilaç yüklü zeolit partikülleri LM-pektin zincirleri içine gömüldüğünde, teofilin moleküllerini oldukça uzun süre boyunca salabilmiştir (Şekil 7.14). Bu farklılığın teofilin molekülünün LM-pektin zincirinin fonksiyonel grupları ile etkileşme afinitesinden ve/veya hidrojel matriksteki su miktarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

LM-pektin-zeolit hidrojel yapısı ve ilaç salımı arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla, (i) çapraz bağlayıcı, (ii) ilaç konsantrasyonu, (iii) zeolit konsantrasyonu ve (iv) zeolit partiküllerinin iyonik formu olmak üzere dört farklı tasarım parametresi incelenmiştir.

7.3.5.2 LM-pektin-zeolit hidrojellerinin ilaç salım profili

Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu etkisi: İlaç salımının en önemli tasarım parametrelerinden biri olan çapraz bağlayıcı konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla Çizelge 7.2 ve Çizelge 7.3'te verilen hidrojel formülasyonlarıyla bir dizi deney yapılmıştır. Çapraz bağlayıcı miktarı, özellikle pektin zincirlerinin iyonize olup, iyon-iyon itmesi sonucu zincirler arası mesafenin arttığı yüksek pH değerlerinde daha çok etkili olmaktadır. Bu amaçla (30 mg g-film⁻¹) konsantrasyonunda ilaç yüklü, (10, 30 veya 50 mg g-film⁻¹ Na-zeolit veya Zn-zeolit) konsantrasyonlarında zeolit ve (50, 70, 90 veya 100 mg g-film⁻¹) konsantrasyonlarında CaCl₂ içeren filmlerin ilaç salım profilleri karşılaştırılmıştır.

Zn-zeolit katkılı filmlerde, zeolit ve ilaç konsantrasyonu sabit tutulurken, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu arttırıldıkça ilaç salım miktarında önemli bir düşüş gözlenmiştir (Çizelge 7.3). Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 90 mg g-film⁻¹

değerinden 100 mg g-film⁻¹'a arttırıldığında, ilaç salımında % 60'a varan bir düşüş gözlenmiştir (A9.10Zn30 ve A10.10Zn30 hidrojel­leri; Çizelge7. 3). A7.30Zn30 ve A10.30Zn30 hidrojel­leri için de benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Bu hidrojel­lerde de çapraz bağlayıcı konsantrasyonu 70 mg g-film⁻¹'den 100 mg g-film⁻¹ e yükseltince ilaç salımında önemli ölçüde düşüş görülmüştür (Çizelge 7.4). Bu durum, hidrojel yapısında gömülü bulunan zeolit yüzeyinin yakınındaki Zn²⁺ iyonun bağlı bulunduğu yerden ayrılıp, pektin zincirlerindeki –COO⁻ ve -OH⁻ yakınlarına doğru giderek, Ca²⁺'nın yanısıra bu iyonun (Zn²⁺) da ek çapraz bağlayıcı olarak davranmasıyla açıklanabilir [171, 285]. Buna ilave olarak Zn²⁺ katyonunun Na⁺ katyonuna göre, galakturonik asit rezidüsünün -COO⁻ grupları ile daha kuvvetli etkileştiği de bilinmektedir [58].

Çizelge 7.4 : Kümülatif ilaç salım miktarına çapraz bağlayıcı miktarının etkisi.

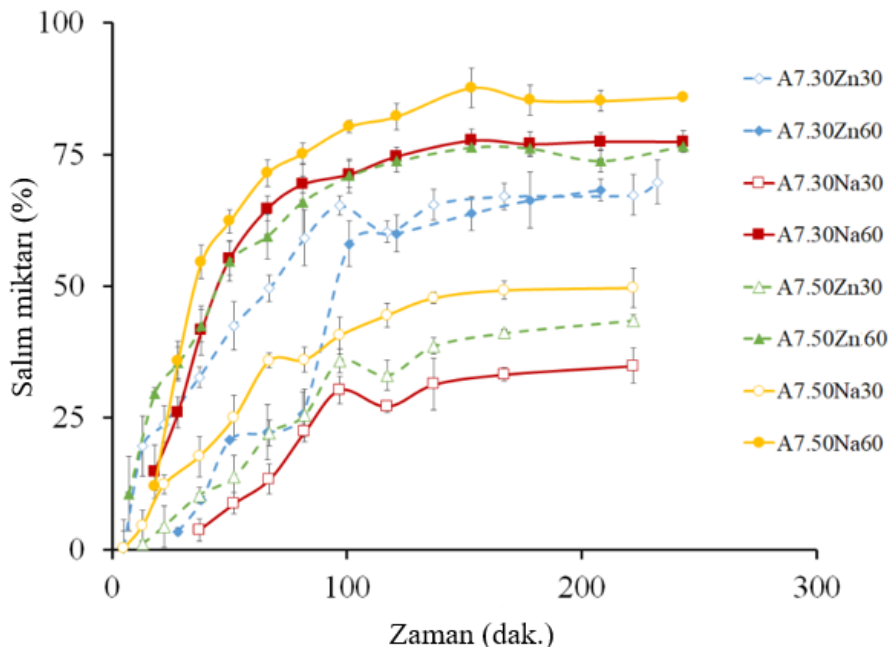
	Kod	Zeolit (mg)	İlaç (mg)	CaCl ₂ (mg)	Salım Yüzdesi
Zn-Zeolit	A9.10Zn30	10	30	90	71.6
	A10.10Zn30	10	30	100	13.2
	A7.30Zn30	30	30	70	69.8
	A10.30Zn30	30	30	100	5.1
	A50.50Zn30	50	30	50	50.2
	A10.50Zn30	50	30	100	5.9
Na-Zeolit	A7.30Na30	10	30	70	34.9
	A10.30Na30	10	30	100	84.0
	A7.50Na30	30	30	70	49.7
	A10.50Na30	30	30	100	81.0

Buna karşın, Na-zeolit hidrojel­lerinde Na-zeolit, şişme ve ilaç salım davranışlarına pozitif yönde etki etmektedir (Çizelge 7.2 ve Çizelge 7.4). Bu durumda da zeolit­ten ayrılan Na⁺ iyonlarının hidrojel yapısındaki Ca²⁺ ile yer değiştirmesi durumunda -COO⁻ grupları ile koordinasyonunda valans elektron sayısının (+1) yetersizliği nedeniyle yumurta kutusu modeli kısmen de olsa bozulacak ve gerçek çapraz bağlanma oranı düşecektir. Böylece, pektin hidrojel matrisi içindeki çözünür bölgeler artacak ve geçirgenliği daha yüksek bir hidrojel yapısı oluşarak [443] hidrojel­in şişme oranı ve kümülatif ilaç salım miktarı artacaktır.

Sonuç olarak, laboratuvarımızda pektin hidrojel ile yapılan bir çalışma [303] ve ön deneylerden (Bölüm 7.3.1) elde edilen veriler dikkate alınarak, hem Na-zeolitli hem de Zn-zeolitli hidrojel film sentezinde çapraz bağlayıcı konsantrasyonu için 70 mg g-film⁻¹ optimum değer olarak kabul edilmiştir.

İlaç ve zeolit konsantrasyonu ve zeolite bağlı katyonun cinsinin etkisi: Genel eğilim olarak, A7.30Zn30 ve A7.30Zn60 örnekleri hariç, ilaç miktarı 30 mg'dan 60 mg'a arttıkça, tampon çözelti ile hidrojel film arasındaki itici güç artışından dolayı, hem Na-zeolitli hem de Zn-zeolitli filmlerde ilaç salım miktarı yaklaşık iki kat artmıştır (Şekil 7.14). Benzer şekilde, zeolit miktarının artışıyla da, A7-30Zn30 hariç, tüm hidrojellerin hem şişme hem de ilaç salım miktarlarında artış gözlenmiştir (Çizelge 7.4, Şekil 7.13, Şekil 7.14). Şekil 7.14'teki sonuçlara göre, bütün hidrojeller yaklaşık 250. dakikada platoya ulaşarak kontrollü salım profili göstermişlerdir. A7.30Zn30 hidrojelinin davranışının genel eğilimlere uymadığı gözlenmiştir.

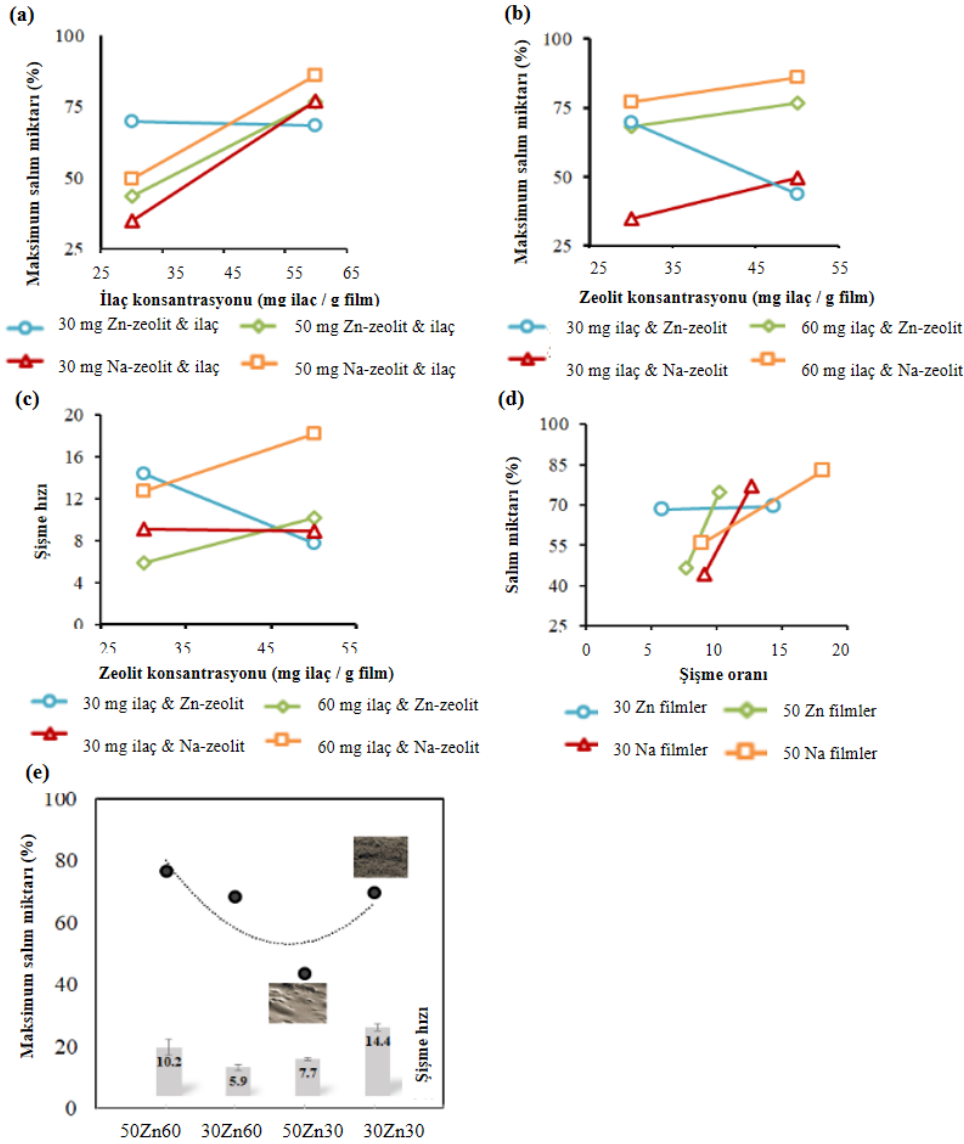
Genel olarak, Na-zeolit katkılı filmler, Zn-zeolit katkılı filmlere göre daha fazla ilaç salmışlardır. Çapraz bağlayıcı etkisi ve FT-IR spektrumunun analizindeki eğilimlere benzer olarak, Na-zeolit ile hazırlanan filmler (A7.30Na30 hariç), Na⁺ iyonlarının Ca²⁺ iyonları ile yer değiştirmesi sonucu oluşan daha geçirgen hidrojel yapısından dolayı Zn-zeolit ile hazırlanan filmler ile kıyaslandığında daha yüksek şişme oranı ve kümülatif ilaç salım miktarı göstermişlerdir (Çizelge 7. 4, Şekil 7.14).



Şekil 7.14 : Hidrojellerin ilaç salım profilleri [2].

A7.30Zn30 hidrojelinin davranışı, genel eğilimlere uymamaktadır (Çizelge 7.4, Şekil 7.14). A7.30Zn30 hidrojelinin hem şişme hem de ilaç salım miktarı A7.50Zn30 hidrojelinden daha az olması ve aynı zamanda ilaç konsantrasyonu daha yüksek ($60 \text{ mg g-film}^{-1}$) olan A7.30Zn60 filminin de $30 \text{ mg g-film}^{-1}$ ilaçlı filme (A7.30Zn30) göre daha fazla miktarda ilaç salımı yapması beklenmektedir. Fakat bu iki filmin (A7.30Zn30 ve A7.30Zn60) ilaç salım sonuçları birbirine çok yakın çıkmıştır (Çizelge 7.4, Şekil 7.14). Na-zeolit ile hazırlanan hidrojellerde (Na^+ iyonunun valans elektron sayısından dolayı) Ca^{2+} iyonu ile Na^+ iyonunun yer değiştirmesi sonucu (Na^+ sadece bir adet COO^- ile etkileşime geçebileceğinden) çapraz bağlama oranında düşüş olacaktır. Bu düşüş dolayısıyla şişme oranı ve ilaç salım miktarlarının aynı formülasyondaki Zn-zeolitli hidrojellere göre daha fazla olması beklenmektedir. Fakat, A7.30Zn30 formülasyonunda ilaç salımı %70 olarak gerçekleştiği halde, A7.50Zn30 formülasyonu için bu değer, %44 ve A7.30Na30 formülasyonu için %35 olarak belirlenmiştir. Beklentinin tersine, A7.30Zn30 formülasyonundan daha yüksek ilaç salım değerine ulaşmıştır (Çizelge 7.2, Şekil 7.13, Şekil 7.14). Bu hidrojelden iyon salımı (Şekil 7.13), nisbeten zayıf ilaç-kasyon etkileşimi dolayısıyla oluşan kuvvetli çapraz bağlanma nedeniyle daha düşük olmuştur. Bölüm 7.3.2.1’de detaylı olarak anlatıldığı ve FT-IR spektrumundan da görüldüğü gibi A7.30Zn30 filminde teofilin molekülünün ortamdaki katyonlara (Ca^{2+} ve Zn^{2+}) bağlanmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, ilaç yardımıyla dış salım çözeltisine kasyon difüzyonu az olmuştur (Şekil 7.13). Sonuç olarak, bu hidrojelın şişmesi esnasında dış ortamdaki iyon konsantrasyonu artmamıştır. A7.30Zn30 hidrojelinde Ca^{2+} iyonları LM-pektin zincirlerini çapraz bağlamak amacıyla kendi pozisyonunu korumuş ve Zn^{2+} iyonları da ayrıca ek bir çapraz bağlayıcı olarak görev yapmıştır. Bu şekilde çapraz bağlama seviyesi kritik bir noktanın üstüne çıktığı ve düzensiz yapıda 3-boyutlu homojen olmayan bir matriks oluştuğu düşünülmektedir [323, 440, 444]. Bu farklılıkları açıklığa kavuşturmak amacıyla A7.30Zn30 filminin SEM görüntüleri (Şekil 7.10) incelenmiştir. Bölüm 7.3.2.4’te tartışıldığı gibi, Na- ve Zn- içeren diğer numunelerde hidrojelın ara kesit morfolojileri büyük oranda homojen ve pürüzsüz bir yapıda olmalarına karşın, A7.30Zn30 filmi, yüzeyinde küçük keskin partiküllerin olduğu kalabalık bir görüntü vermiştir. Bunun hidrojeldeki aşırı çapraz bağlanma sonucu oluşan düzensiz yapıdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Kasyon konsantrasyonun film içinde belli bir kritik noktanın üstünde bulunması da, filmin homojen olmayan 3-boyutlu bir yapı oluşturmaya neden olmuştur [445]. Böylece kritik noktanın üstünde

aşırı çapraz bağlanma sonucu 3-boyutlu düzensiz bir yapı oluşturan A7.30Zn30 hidrojelini daha fazla şişmiş ve bunun sonucu olarak beklenenden daha fazla ilaç salmıştır. Bu hidrojin karşı iyon salımı zayıf ilaç –katyon etkileşimi [446] sonucu oluşan kuvvetli çapraz bağlanmadan dolayı diğer hidrojelere göre daha az olmuştur. FT-IR spektra analizinde görüldüğü gibi A7.30Zn30 filminde teofilin katyonlarla etkileşime girememektedir. Bu nedenle katyon salımı da düşük olmuştur. Böylece şişme esnasında, dış ortamda iyon konsantrasyonu artışı da düşük olmuştur. Büyük olasılıkla Zn^{2+} , teofilin yerine galakturonik asid rezidüsünün $-COO^-$ veya $-OH^-$ gruplarıyla kuvvetli etkileşim yapmıştır. 50 mg Zn-zeolit kullanıldığında ise, COO^- ve OH^- grupları için doygunluğun üstünde olan Zn^{2+} iyonu, teofilin ile etkileşmektedir. Şekil 7.15'te ilaç salım miktarı ve şişme hızına maksimum ilaç miktarı, ilaç konsantrasyonu ve zeolit konsantrasyonu arasındaki ilişkiler gösterilmiştir.



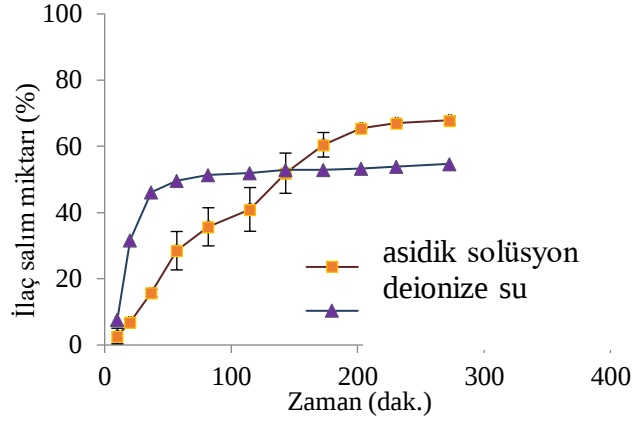
Şekil 7.15 : Zn-zeolit ve Na-zeolit filmlerin tasarım parametreleri arasındaki ilişki (a) zeolit konsantrasyonu ile maksimum ilaç salın miktarının değişimi, (b) başlangıç ilaç konsantrasyonu ile maksimumu ilaç salımının değişimi, (c) zeolit konsantrasyonuna bağlı olarak şişme oranının değişimi, (d) şişme oranına bağlı olarak maksimum ilaç salımı ve (e) Zn-zeolitli filmlerin ilaç salımlarının şişme oranına bağlı olarak değişimi [2].

FT-IR (Şekil 7.6) ve ICP (Şekil 7.13) sonuçlarına göre, A7-30Zn30 formülasyonunda Ca^{2+} ve Zn^{2+} iyonlarının teofiline daha düşük oranda bağlanması, dış salın ortamındaki iyonik konsantrasyonun daha az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Böylece bu hidrojel daha fazla şişerek daha fazla ilaç salabilmiştir. Teofilin moleküllerinin bir kısmı hidrojel matrisi içinde sıkışmış ve başlangıçta yüklenen ilacın tamamı salınamamıştır. Hidrojellerin XRD desenlerinde görülen (CaZn_{13} , Ca_5Zn_3) metal-metal kompleksleri hidrojel içinde bir bariyer oluşturmuş olabilir.

İlaç salım verilerinde gözlenen bir başka olay ise, kümülatif salım platoya ulaştığında dahi, başlangıçta yüklenen ilacın tamamen salınamamış olmasıdır. Bu tamamlanmamış salımın, teofilin partiküllerinin hidrojel matriks içinde sıkışmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İlaç moleküllerinin bir kısmı kendi aralarında kümeler oluşturarak, hidrojel yüzeyine doğru yeterli difüzyon yolu bulamamakta ve salım ortamına ulaşamayıp, hidrojel içinde sıkışıp kalmaktadır. Bu kümeler, salım ortamı difüzyon yolu üstündeki diğer partikül kümeleri ile de yeterli bağlantı sağlayamamaktadır. Teofilin moleküllerinin salım ortamına difüzyonu sadece film yüzeyine doğru difüzyon olarak değil, aynı zamanda birbiri ile ilişkili parçacık kümelerinin internal difüzyonu ile de gerçekleşmektedir. Ayrıca teofilinin difüzyonel salımı, birbirine bağlı parçacık kümeleri içinde hidrojel boyunca difüzyon olarak değil, iç difüzyon olarak da meydana gelmektedir. Başlangıçta yüklenen ilacın tamamen salınamaması ilaç kümeleri sıkışması ile açıklanırsa, yüklenen ilacın sıkışmış bölümü, hidrojel degradasyon ile parçalanıp difüzyon yolu oluşturan kadar salınamayacaktır. Bu eksik salımın üstesinden gelmek için film sentezlenirken homojenizasyonun sağlanması amacıyla sonikasyona maruz bırakmak ve daha uygun kurutma yolları bulmak gerekebilir.

Asidik ilaç çözeltisi hazırlama ortamının ilaç salım performansına etkisi : İlaç çözeltisi pH değerinin hidrojelden ilaç salım profiline etkisini incelemek amacıyla, 50 mg g-film⁻¹ konsantrasyonunda zeolit ve 30 mg teofilin g-film⁻¹ konsantrasyonunda ilaç içeren A.50Na30_A hidrojeli, ilaç teofilin 0,1 N HCl çözeltisinde çözülmüştür.

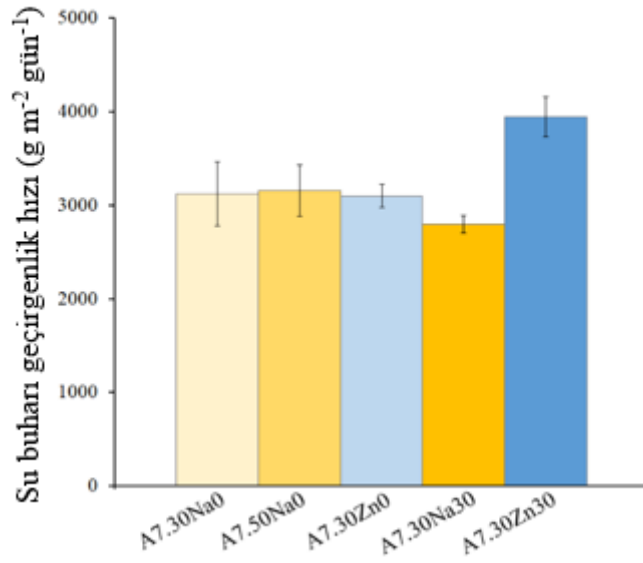
Teofilinin 0,1 N HCl ortamındaki çözünürlüğü su içindeki çözünürlüğünden daha yüksektir [447]. Kuvvetli asidik çözeltiler, filmin yapısını bölerek efektif yüzey alanını artırmakta, böylece ilaç salım performansı da artmaktadır. Şekil 7.16'da görüldüğü gibi teofilin asidik ortamda çözüldüğünde, daha yüksek pH değerinde hazırlanan hidrojele göre patlama salım düşmekte ve toplam kümülatif ilaç salımı artmaktadır. Asidik ortamda hazırlanan A7.50Na30_A filmi su ortamında hazırlanan A7.50Na30 filmine göre platoya 3 saat daha geç ulaşmış ve kümülatif ilaç salımı da A7.50Na30 filminin yaklaşık 1,5 katı kadar olmuştur. Bu durum, (i) asidik ortamda daha porlu, geniş yüzey alanlı ve daha uzun difüzyon yolu olan hidrojel yapısı oluşması; (ii) bu ortamda hazırlananan pektin hidrojelinin şişmesinin gecikmesi ve (iii) teofilinin düşük pH'da daha yüksek çözünürlüğü ile açıklanabilir.



Şekil 7.16 : İlaç çözeltisi pH değerinin A7.50Na30 hidrojelinden ilaç salımına etkisi.

7.3.6 Su buharı geçirgenliği

Su buharı geçirgenliği (*Water vapor transmission rate- WVTR*) yara örtüsü malzemeleri için önemli bir parametredir [448]. İdeal bir yara örtüsü, aşırı dehidrasyonu engelleyecek şekilde optimum su kaybına izin vermelidir [449 - 451]. Normal sağlıklı bir deri için bu değer günlük 204 g m^{-2} iken, granülasyonlu yaralar veya yanık yaralarında 5138 g m^{-2} değerine çıkmaktadır. Şekil 7.17’de görüldüğü gibi sentezlenen kuru hidrojel filmlerin WVTR değerleri $\sim 3000 \text{ g.m}^{-2}.\text{gün}^{-1}$ ’dir. Sonuçlar literatür ile uyumludur [441].



Şekil 7.17 : Hidrojellerin su buharı geçirgenliği hızı analizi [2].

Hazırlanan hidrojel filmlerin oldukça yüksek oranda su buharı geçirgenliğine sahip oldukları tespit edilmiştir. LM-pektin-zeolit hidrojellerinin sunduğu en önemli avantajlardan biri olan kişiye özel tasarım yapılabilmesi sayesinde, hastanın ve hastalığın durumuna göre, özel uygulamalar için, sentezlenen hidrojellerin kalınlık ve/veya plastikleştirici miktarlarını ve/veya cinsi değiştirilerek [62-64] WVTR değerleri daha düşük veya yüksek seviyeye çıkarılabilir.

7.3.7 Filmlerin *in vitro* yara örtüsü karakterizasyonu

30 mg g-film⁻¹ ve 50 mg g-film⁻¹ zeolit içeren hidrojel filmlerin (A7.30Na0 ve A7.50Na0) *in vitro* yara örtüsü karakterizasyonu sonuçları Çizelge 7.5'te görülmektedir.

Çizelge 7.5 : A7.30Na0, A7.50Na0 formülasyonları ve ticari ürünün *in vitro* yara iyileşmesi deneyleri.

Test	Kod		Kaltostat ^a
	A7.30Na0	A7.50Na0	
Shore A sertliği	72	73	Veri yok
Esneklik ^b (mm)	2	2	Veri yok
Su tutma kapasitesi (g g ⁻¹)	4.74 ± 1.33	5.93 ± 0.49	18.44 ± 1.30
Dehidrasyon hızı x 10 ⁴ (g dak ⁻¹)	28 ± 2	32 ± 3	350
Dispersiyon karakteristiği	Disperse olmadı	Disperse olmadı	Disperse oldu
De-iyonize su içinde pH değeri			
3 saat sonra	5.70	5.76	6.00 ^c
24 saat sonra	5.88	5.94	6.80 ^c
Birim alan başına kütle (g m ⁻²)	137 ± 6	121 ± 12	148 ± 4
Kalınlık (mm)	0.11 ± 0.06	0.13 ± 0.00	2.00

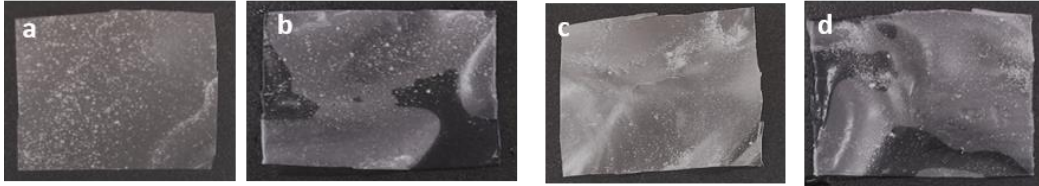
ASTM D2240 standartlarına göre bir durometre ile yapılan Destek (Shore) A sertliği ölçümlerine göre hidrojel filmler, en küçük çaplı silindir (2 mm) ile dahi kırılmayacak esneklikte (Çizelge 7.5) oldukları için yara tedavisinde büyük konfor sağlayacaklardır.

Hidrojellerin su tutma kapasiteleri, ticari ürün Kaltostat'ınki ile beraber Çizelge 7.5'te verilmiştir. A7.30Na0 and A7.50Na0 absorbladıkları sıvı, kendi ağırlıklarının sırasıyla yaklaşık beş (4.74 ± 1.33 g g-film⁻¹) ve altı (5.93 ± 0.49 g g-film⁻¹) katıdır. Önceki çalışmalardan belirlendiğine göre LM-pektin hidrojin su tutuma kapasitesi kendi ağırlığının üç katıdır (3.08 ± g.g-film⁻¹) [173]. LM-pektin-zeolit hidrojellerin su tutma kapasiteleri, Kaltosta'nın su tutma kapasitesinden (18.44 ± 1.30 g g-film⁻¹) yaklaşık 3-4 kat daha düşüktür. Optimal bir yara örtüsünün su tutma kapasitesi ise 2.3 g g-film⁻¹

¹ civarındadır [419]. Bu nedenle, LM-pektin zeolit temelli hidrojellerin su tutma kapasiteleri, yara tedavisi uygulamaları için uygundur denilebilir.

Fimlerin yara tedavisinde uygulanabilirliğini desteklemek amacıyla dehidrasyon hızları da ölçülmüştür (Çizelge 7.5). Önceki çalışmayla karşılaştırıldığında [173] zeolit ilavesinin LM-pektin fimlerin dehidrasyon hızını ($7.05 \pm 0.25 \times 10^{-4} \text{ g dak}^{-1}$) arttırdığı belirlenmiştir. Hidrojellerin dehidrasyon hızı, ticari üründen 12 kat daha düşük hesaplanmıştır. Sonuç olarak, dehidrasyon hızı ve su tutma kapasitesini beraber gözönüne alındığında Kaltostat, LM pektin-zeolit hidrojellerinden 3-4 kat daha yüksek sıvı absorblamasına rağmen, evaporasyon ile daha fazla sıvı kaybetmektedir. LM pektin-zeolit filmler ise Kaltosta'ya göre daha nemli bir ortam sağlamaktadırlar; bu da yara tedavisi için önemli bir avantajdır.

Fimlerin sıvı ile etkileştikleri zamandaki mekanik özelliklerini belirlemek amacıyla dispersiyon özellikleri incelenmiştir. Filmler, deriden uzaklaştırılırken hastaya acı vermemesi için bütünlüklerini korumalıdır. Tuz çözeltisi içinde Kaltostat tamamen dağılırken, A7.30Na0 and A7.50Na0 numuneleri bütünlüklerini korumuşlardır (Çizelge 7.5). Buna ilave olarak, filmlerin test koşullarında şekil ve şeffaflıklarında bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 7.18).

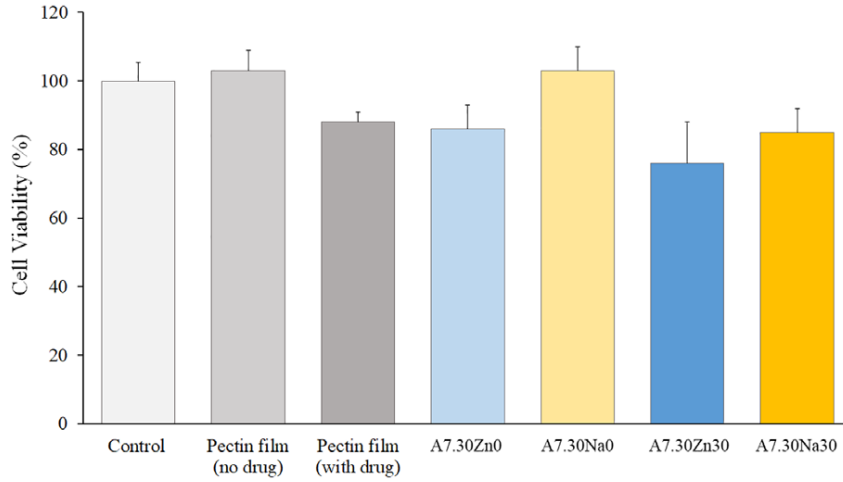


Şekil 7.18 : Hidrojel filmlerin dağılma karakteristikleri (a) kuru A7.30Na0, (b) ıslak A7.30Na0, (c) kuru A7.50Na0, (d) ıslak A7.50Na0 [2].

Deiyonize su içinde 24 saat boyunca bekletilen A7.30Na0 ve A7.50Na0, ticari ürün Kaltostat'a göre daha fazla asidik ortam oluşturmıştır. Asidik ortamın, yara ortamında bakterilere karşı iyi bir bariyer olacağı düşünülmektedir [162]. Son olarak, hidrojel filmlerin kalınlığı ticari numuneden yaklaşık 15 kat daha incedir (Çizelge 7.5). Bu durum hasta için daha konforlu bir ortam sağlamaktadır.

7.3.8 Hücre canlılığı deneyleri

PCS-201-012 hücrelerinin 24 saatlik hücre canlılığı analizi WST-1 metodu takip edilerek farklı numuneler için Doç. Dr. Saime Batirel tarafından yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar Şekil 7.19'da verilmiştir.

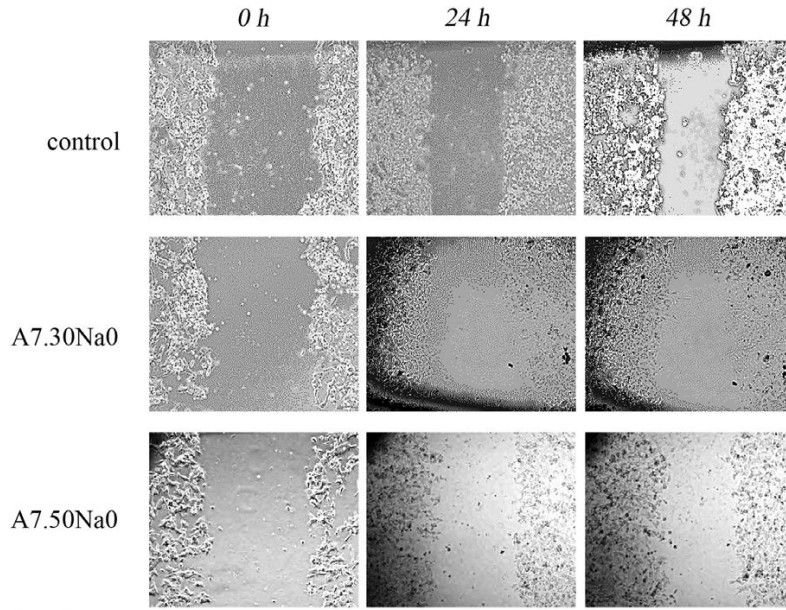


Şekil 7.19 : Hidrojellerin hücre canlılık analizleri [2].

LM-pektin ve Na-zeolit hidrojelleri, kontrol grubu ile kıyaslandığında hücrelere karşı toksik etki göstermemişlerdir. 24 saat sonunda LM-pektin ($103 \pm 6\%$) ve Na-zeolit ($103 \pm 7\%$) hidrojelleri arasında canlılık ve yayılmaları arasında bir fark görülmemiştir. Bu durum, LM-hidrojeline Na-zeolit partiküllerinin eklenmesinin hücre canlılığına olumsuz bir etkisi olmadığını göstermektedir. Hücre canlılığı ilaç yüklü LM-pektin hidrojelde %88, ilaç yüklü Na-zeolit hidrojelde %85 değerine düşmesi model ilaç teofilinin toksik etki oluşturduğunu göstermektedir. Aynı şekilde hücre canlılığı Zn-zeolit hidrojelde %86, ilaç yüklü Zn-zeolit hidrojelde ise %75'e kadar düşmüştür. Bu durumda filmin içindeki Zn-zeolit partiküllerinin de toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Zn-zeolit sitotoksik etkisi iyi bilinen anti bakteriyel özelliğinden kaynaklanmaktadır [452, 453].

7.3.9 *In vitro* yara iyileşmesi

48 saatlik uygulama sonucunda, iyileşen alanların kontrol grubu ile benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 7.20). Bu, hidrojellerin hücrelere karşı toksik olmadığını ve migrasyon (yayınım) özelliklerini değiştiremediklerini göstermektedir.



Şekil 7.20 : A7.30ZnO ve A7.50ZnO hidrojenlerinin yara iyileşmesi deneyleri temsili fotomikrografikleri. Orijinal büyütme $\times 10$ [2].

7.3.10 *In vitro* antibakteriyel analiz

Antimikromiyal etkinlik çalışması (Çizelge 7.6) *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* 'a karşı gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kontrol olarak STX diski (Trimethoprim-sulfamethoxazole, 25 μ g) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre pektin ve pektin-Na zeolit hidrojelin önemli ölçüde antimikrobiyel etkinlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 7.6 : Pektin ve Pektin-Na zeolit hidrojenlerinin antibakteriyel etkinlik sonuçları.

Numune	<i>E. coli</i> ATCC 25922 Zon çapı (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213 Zon çapı (mm)
Pektin hidrojel	11	12
Pektin-Na-zeolit (A7.30Na0)	10	9

7.4 Vargılar

Tez çalışmasının bu bölümünde LM-pektin temelli Na-zeolit veya Zn-zeolit içeren hidrojellerinin topikal ilaç salımındaki uygunlukları araştırılmıştır. Zeolit A partikülleri, ilaç deposu olarak kullanılırken aynı zamanda da hidrojel stabilitesi ve oksijen geçirgenlik hızını arttırmıştır.

Membrana difüzyon metodu ile hazırlanan hidrojeller ilacı kontrollü bir şekilde salabilmişlerdir. Morfolojik analiz sonuçlarına göre hazırlanan hidrojellerin hepsi ilaç yüklenmesiyle topolojilerindeki çok az değişikliklerle pürüzsüzlüklerini korumuşlardır. Pektin-zeolit hidrojellerin ilaç salımına etki eden en önemli parametrelerinin şişme oranı ve matris içi ve salım ortamı iyon konsantrasyonu olduğu belirlenmiştir. İlaç salımı genellikle hidrojeldaki ilaç ve/veya zeolit oranı arttıkça artmıştır. Aynı kompozisyondaki filmler karşılaştırıldığında, Zn-zeolit filmler genellikle katyonların valans elektron farklarından dolayı, Na-zeolit filmlerden daha az şişme oranı ve ilaç salımı göstermişlerdir. Ayrıca, çalışmanın bu kısmında beklenenden daha yüksek bir şişme oranı ve kümülatif ilaç salım miktarına sahip bir hidrojel formülasyonu (A7.30Zn30) belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen bir diğer önemli bulgu da, Zn-zeolit hidrojellerin Zn^{2+} iyonu salabildiğidir. Literatürde Zn^{2+} iyonlarının kolajen sentezi, hücre büyümesi ve replikasyonu, serbest radikal aktivitesini düşürme, bakteriyel büyümeyi engelleme, epitelizasyonu stimüle etme gibi etkileri bilinmektedir [454, 455]. LM-pektin ve LM-pektin-Na-zeolit hidrojellerin hücre büyümesini destekledikleri belirlenmiştir.

Çalışmanın bu bölümünde, kullanılan yöntem ile ekonomik bir şekilde hazırlanabilen zeolit A katkılı LM-pektin hidrojellerin topikal uygulamalar için tedavi edici ajan salımında kullanılabileceği ve kişiye özel tasarım yapılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Bir sonraki bölümde ise hem yüksek kanamalı ve yanık yaralarında önemli bir problem olan serum albümin kaybına karşı önlem alabilmek hem de hidrojellerin büyüme faktörlerinin yarılanma ömürlerini arttırma potansiyellerini tahmin edebilmek amacıyla serum albümin yüklü LM-pektin-NaA-zeolit hidrojellerinin hazırlanması, karakterizasyonu, bu hidrojellerin tasarım parametreleri, ilaç salım performansları ve protein yapısını koruyup koruyamadıklarını belirlemek için yapılan çalışmaların sonuçları verilmiştir.

8. SERUM ALBÜMİN SALIMI YAPAN ZEOLİT KATKILI PEKTİN HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

8.1 Giriş

Kandaki başlıca protein olan serum albüminin, osmotik basıncı korumak, mikrovasküler geçirgenliği sağlamak, asit-baz fonksiyonu ve trombosit agregasyonunu önlemek gibi hayati işlevleri bulunmaktadır [456]. Düşük albümin seviyesi akut miyokardiyal enfarktüsü [457, 458], ve kanser [459, 460] nedeniyle gelişebilir. Düşük serum albümin düzeyi, vücutta sistemik bir enflamasyon varlığına işaret etmektedir [461, 462] ve bu nedenle COVID-19 vakalarının da beklenen bir sonucudur [463].

Albümin, yara tedavisinde doku onarımı ve yeniden şekillenme kademeleri için gerekli olan hücresel aktiviteleri desteklemektedir [456]. Albümin seviyesi, yara ile ilgili komplikasyonlarda yaranın akut veya kronik olduğunun en iyi belirtecidir [468]. Hipoalbüminemi, inflamasyon aşamasının uzamasına, doku ödeme, reaktif oksijen türlerinin artmasına, kas yıkımına ve hatta ölüm oranının artmasına neden olduğu için [469] yara tedavisinin önemli seviyede uzamasına neden olmaktadır [22, 468, 470, 471]. Cerrahi operasyon sonrası hipoalbüminemi hastalarının hem yara komplikasyonlarına maruz kalma [472] hem de morbidite ve mortalite olasılıkları daha yüksektir [472, 473].

Eksuda, normal yara tedavisi sürecinin bir parçası olarak üretilen ve büyük oranda albümin, globülin ve fibrinojen içeren bir vücut sıvısıdır [474, 475]. Eksuda üretimi akut yaralarda zamanla azalmasına rağmen, bazı kronik yaralar, yanık ve ameliyat yaralarında yüksek oranda eksuda üretimi olduğu için, albümin kayıpları da yüksek olmaktadır [22]. Düşük albümin seviyeli hastalardaki majör yanık yaralamalarında morbidite ve mortalitede önemli artışlar gözlenmiştir [22, 472]. Albümin aynı zamanda doku büyümesi, immün sistem fonksiyonları ve kolajen sentezinde önemli olan çinko-taşıyıcı bir protein olduğu için, özellikle kronik yaraların tedavisi için yüksek oranda ihtiyaç duyulmaktadır [476].

Günümüzde hipoalbuminemi tedavisinde albumin infüzyonu ve normal protein diyeti uygulaması gibi yöntemler kullanılmaktadır [469]. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada intravenöz albumin uygulamasının, ilaç verimliliğini arttırdığı, deri yapılanmasını hızlandırdığı ve mortalite oranını düşürdüğü belirlenmiştir [470]. Ancak protein temelli ilaçlar mide ortamında hızla denatüre olduğu ve sindirim barsak kanalındaki enzimler tarafından kolaylıkla degrade edildikleri için oral yolla alınamamakta; bu nedenle bu sistemden geçmeyecek uygun etkili bir topikal uygulamanın geliştirilmesi gerekmektedir. Hidrojel sistemler, protein ilaçların taşınımında yaygın olarak kullanılan güvenilir bir yoldur [477, 478]. Yapılan çalışmalarda petkin hidrojelinin farklı ilaçları (örneğin prokain ve teofilin) başarılı bir şekilde kontrollü olarak salabileceği belirlenmiştir. Bu tezin 7. Bölümünde verilen sonuçlara göre pektin-zeolit hidrojelinin *in vitro* yara örtüsü olarak uygun olduğu, dermal fibroblast hücrelerine karşı toksik etki göstermediği ve pektin hidrojele zeolit partiküllerinin eklenmesiyle oksijen geçirgenliğinin önemli oranda arttığı kanıtlanmıştır [2].

Tezin bu bölümünde, aşırı eksudalı yaralardan albumin adsorblayan ve yaralı bölgeye iki-boyutlu yapısını korumuş albumin salımı yapabilen uygun maliyetli özgün bir yara örtüsü tasarımı gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda, bu yara örtülerinin yara tedavisinde çok önemli rol oynayan, ancak yarılanma ömürleri çok kısa olan büyüme faktörlerini adsorblayıp salabilme performanslarının da tahmin edilmesi amaçlanmıştır. İnsan serum albuminine yüksek oranda yapısal benzerliğinden dolayı sığır serum albumin (BSA) model protein olarak kullanılmıştır [479]. BSA 66,4 KDa moleküler ağırlığında globüler kalp şeklinde olan bir proteindir. Çok farklı koşullarda moleküler düzenlemeler ile yüzeylere bağlanabilme özelliği vardır [480]. Bu çalışmada proteinin yapısal bütünlüğü ve salım profiline etki eden hidrojel hazırlama koşulları detaylı olarak çalışılmıştır. Protein-karbonhidrat etkileşimlerine iyi bir model olacağı düşünülen bu çalışmanın bulgularının, aşırı ekzudalı yaralar ve yanık yaralarının yanı sıra aynı zamanda hipoalbuminemi hastalarının cerrahi operasyonlarına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

8.2 Malzeme ve Yöntemler

8.2.1 Malzemeler

Düşük metoksi (%31) (LM) amitlenmiş pektin Herbstreith & Fox firmasından (Neuenbürg, Almanya) temin edilmiştir. Gliserin (%99 saflık), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, TRIS (2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol) ve sığır serum albümin (BSA) Sigma-Aldrich (Düsseldorf, Almanya)'dan alınmıştır. Na- ve Zn-zeolit-A İTÜ Kimya Mühendisliği laboratuvarlarında Prof. Dr. Melkon Tatlıer tarafından sentezlenmiştir (Çizelge 7.1). Bütün kimyasallar analitik derecededir ve saflaştırma uygulanmamıştır. Deneylerde ultra deiyonize su kullanılmıştır.

8.2.2 Zeolit katkılı sığır serum albümin yüklü hidrojel filmlerin sentezi

Bölüm 7.2' de detaylı olarak açıklandığı gibi NaA zeolit partikülleri katkılı LM-pektin hidrojeller, çapraz bağlayıcı olarak CaCl_2 , plastikleştirici olarak ise gliserin kullanılarak iyonotropik jelleşme yöntemi ile hazırlanmıştır. Sulu LM-pektin (% 2 ağırlık), gliserin (%5 ağırlık) bir petri kabındaki 10 ml CaCl_2 (0.7 ağırlık) çözeltisi üstüne dökülerek kendiliğinden jelleştirilmiştir (Kocaaga vça., 2019). Farklı konsantrasyon (10, 25, 50, 75 veya 100 mg BSA g⁻¹ film) ve pH (4,3, 4,7 veya 6,4) değerlerinde BSA, karıştırma ve adsorpsiyon olmak üzere iki farklı hazırlama yöntemi ile hidrojellere eklenmiştir.

8.2.2.1 Karıştırma metodu

Karıştırma metodu ile hazırlanan hidrojel filmler BSA yüklü zeolit partikülleri çekirdek kısım olarak kullanılmış ve bu çekirdek, hem BSA hem de su moleküllerinin rahatlıkla difüze olabileceği pektin zincirleri ile çevrelenmiştir. Deneylerde, bir gece boyunca vakum altında 120 °C'de dehidrate edilmiş 30 mg-zeolit g⁻¹-film konsantrasyonunda NaA-zeolit partikülleri kullanılmıştır. Deneyler 3 farklı pH (4,3, 4,7 ve 6,4) ve farklı konsantrasyondaki (10, 25, 50, 75 veya 100 mg BSA g⁻¹ film) BSA çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

BSA yüklü film hazırlamak amacıyla öncelikle NaA-zeolit partikülleri ile ilaç çözeltisi karanlık bir ortamda 25 °C, 100 d/d dönme hızında bir orbital karıştırıcı üzerinde 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Zeolit partiküllerine yüklenen albümin miktarını bulabilmek için pH 6,4, 4,7 veya 4,3 TRIS tampon çözeltisi içinden alınan çözeltilerde LAMBDA 35 UV/Vis Spektrofotometre kullanılarak 279 nm dalga boyunda kuvars

küvetler ile yapılan ölçümlerden elde edilen verilerden, adsorblanmayan albümin miktarı hazırlanmış kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplanmıştır. Çözelti başlangıç miktarı bilindiğine göre fark Na-zeolitA partiküllerine yüklenen albümin miktarını vermektedir. Deneyler aynı koşullar altında üçer defa tekrarlanmıştır.

Bölüm 7.2 'de detaylı açıklandığı gibi LM-pektin ve çapraz bağlayıcı çözeltileri, kuru toz pektin ve CaCl_2 'ün ultra deiyonize su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hidrojel film hazırlamak için öncelikle, % 5 (ağ ağ^{-1}) gliserin çözeltisi, % 2'lik (ağ ağ^{-1}) pektin çözeltisi üzerine yavaşça eklenip bir manyetik karıştırıcı üzerine 2 saat boyunca 150 d/d'da karıştırılmıştır. Polielektrolitikler ile proteinlerin mümkün olan en yüksek oranda bir kompleks oluşturabilmesi uzun süre almaktadır [481]. Bu nedenle, BSA yüklü zeolit süspansiyonu pektin-gliserin çözeltisine eklenmiş ve bu karışım 150 d/d, 27 ± 1 °C sıcaklığında 24 saat boyunca karanlık ortamda karıştırılmıştır. Burada zeolit partikülleri doymuş albümin rezervarı olarak kullanılmıştır. 24 saatin sonunda bu süspansiyon bir petri kabındaki 10 ml CaCl_2 (0,7 % ağ ağ^{-1}) çözeltisinin üzerine dökülerek, spontane bir şekilde jelleşme sağlanmış ve 27 ± 1 °C sıcaklığında 100 d/d dönme hızındaki orbital karıştırıcı içinde kurutulmuştur. Elde edilen kuru BSA yüklü filmler desikatöre alınmıştır.

Albümin yüklü pektin hidrojeller (X-Ta- β), pektin-zeolit hidrojeller (Ta- β), albümin içermeyen hidrojeller ise (XY- α) olarak kodlanmışlardır. Burada X pektin, Y zeolit, T hazırlama metodu (Adsorbsiyon:A, Karıştırma: M), α BSA çözünme ortam pH değeri, β mg g-film $^{-1}$ biriminde BSA konsantrasyonudur. Hidrojellerin içerikleri Çizelge 8.1' de verilmiştir.

8.2.2.2 Adsorpsiyon metodu

Adsorpsiyon deneyleri de, karıştırma deneyleri gibi 3 farklı pH (4,3, 4,7 ve 6,4) ve farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 75 veya 100 mg BSA g $^{-1}$ film) BSA çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ultra deiyonize su içindeki zeolit partikülleri 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda karıştırılıp, 2 saat karışmış olan pektin-gliserin çözeltisi üzerine eklenmiş ve bu süspansiyon bir gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Orbital çalkalayıcıda kurutularak hazırlanan pektin hidrojel filmleri elde edildikten sonra, farklı konsantrasyon ve pH değerlerinde hazırlanmış BSA çözeltileri, bu kuru hidrojel filmlerin üzerine eklenerek 100 d/d dönme hızı $27 \pm$

1 °C sıcaklık koşullarındaki bir orbital karıştırıcı üzerinde 24 saat boyunca tutularak adsorbsiyon ve kuruma işlemlerinin tamamlanması beklenmiştir.

Çizelge 8.1 : Farklı yöntemlerle hazırlanan hidrojel formülasyonları, temas açısı, şişme oranı, BSA adsorblama ve salım miktarı.

Kod	Metot	Başlangıç BSA (mg/g film)	BSA çözeltisi pH değeri	Temas Açısı (°)	Şişme Oranı	Adsorblanan BSA (mg/g film)	BSA salım miktarı (mg /g film)
PZ-50	-	0	-	77	-	-	-
PZ-30	-	0	-	76	-	-	-
A6.4-10	Adsorbsiyon	10	6.4	-	-	10	0
A6.4-25	Adsorbsiyon	25	6.4	-	79.15	16	0
A6.4-50	Adsorbsiyon	50	6.4	-	49.20	37	35
A6.4-100	Adsorbsiyon	100	6.4	88	24.91	88.5±11	77
M6.4-25	Karıştırma	10	6.4			10	Salım yok
M6.4-25	Karıştırma	25	6.4	105	-	25	Salım yok
M6.4-50	Karıştırma	50	6.4	107	29.92	50	5
M6.4-75	Karıştırma	75	6.4	-	27.29	75	23
M6.4-100	Karıştırma	100	6.4	100	19.35	100	41
A4.7-50	Adsorbsiyon	50	4.7	-	8.17-	20	17
A4.7-100	Adsorbsiyon	100	4.7	99		49.82±10.82	-
A4.3-50	Adsorbsiyon	50	4.3	-	-	0	0
P-A4.3-50	Adsorbsiyon	50	4.3	-	-	21	5

8.2.3 Hidrojel filmlerin karakterizasyonu ve BSA moleküllerinin immobilizasyon davranışı

8.2.3.1 BSA moleküllerinin yük dağılım analizi

Serum albümin kristal yapısının elektrostatik yüzey dağılımları PROPKA Graphical User Interface (GUI) programı ve Adaptive Poisson-Boltzmann Solver ile belirlenmiştir [482]. BSA'nın üç-boyutlu kristal yapısı olarak PDB ID: 3V03 kullanılmıştır [479, 483]. Elektrostatik yüzey özellikleri deneysel çalışmalarda kullanılan pH 4,3, 4,7 ve 6,4 sulu ortamları dikkate alınarak hesaplanmıştır. Üç boyutlu yapı ve elektrostatik özellikler PYMOL Moleküler Grafik Programı kullanılarak görselleştirilmiştir [357].

8.2.3.2 Zeta potansiyel ölçümü

Zeta potansiyel ölçümleri, hidrojel hazırlarken kullanılan oranlardaki pektin, pektin-gliserin ve pektin-gliserin-zeolit çözeltileri ve farklı pH koşullarında hazırlanmış (pH 6,4, 4,7 ve 4,3) BSA yüklü pektin-gliserin-zeolit çözeltileri için yapılmıştır. Ölçümleri alınan bütün çözeltilerin karışma süreleri, hidrojel oluşumunda kullanılan sürelerle aynı tutulmuştur. Ölçümler Laser Doppler Micro-electrophoresis A Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, Birleşik Krallık) cihazı ile ölçülmüştür. Ortalama elektroforetik hareketlilik, Smoluchowski denklemi (Denklem 7.1) kullanılarak zeta potansiyel hesaplanarak belirlenmiştir Her pH değeri için 5 adet ölçüm alınmıştır.

8.2.3.3 Reolojik analiz

Serum albümin yüklü hidrojellerin reolojik analiz çalışmaları, Anton Paar physica MCR 301 cihazı ile CP25 ve PP25 ölçüm plakaları kullanılarak yapılmıştır. Numune sıcaklığı VT2 viskoterminde kontrol edilmiştir. CP25 ölçüm plakası kullanılarak, hidrojel sentezinde kullanılan konsantrasyonlarında, 100 mg g⁻¹ film BSA konsantrasyonu için pH 4,3, 4,7 ve 6,4 koşullarında LM-pektin-zeolit-BSA çözeltilerinin akış özellikleri belirlenmiştir. Akış ve viskozite eğrileri deneysel verilere dayanarak çizilmiştir. Bunun yanı sıra, farklı pH'larda hazırlanmış PZ-6.4, PZ-4.7 and PZ-4.3 (BSA yüklenmemiş) LM-pektin-zeolit hidrojelleri ve karıştırma metodu ile albümin yüklenmiş M6.4-100, M4.7-100, M4.3-100 hidrojellerin çapraz bağlandıktan

6 saat sonra, henüz tam olarak kurumamış numunelerinin viskoelastik davranışları araştırılmıştır. Osilasyon modunda oda sıcaklığında yapılan bu deneylerde PP25 ölçüm plakası kullanılmıştır. Ölçümlerde GAP 2.7 ± 0.1 mm olarak alınmıştır. 10 rad s^{-1} sabit frekansta gerinim taraması yapılarak lineer viskoelastik bölge belirlendikten sonra $10 - 0.1 \text{ rad s}^{-1}$ aralığında frekans testi uygulanarak, depolama (G') ve kayıp modülü (G'') belirlenmiştir.

8.2.3.4 FT-IR analizi

Hidrojel filmlerin FT-IR spektrum analizleri $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ aralığında KBR pellet ve toplam yansıtma (ATR) tekniği kullanılarak Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR Spektrometre ile oda sıcaklığında yapılmıştır.

8.2.3.5 Morfolojik analiz

Kuru filmlerin ara yüzey morfolojik analizi Jeol Marka taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla yapılmıştır. Yüzey özellikleri, Nanosurf atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile $20 \times 20 \text{ mm}^2$ yüzey alanı için araştırılmıştır.

8.2.3.6 Temas açısı ölçümü

Yüzey temas açısı ölçümleri KSV CAM-200 goniometre kullanılarak, hidrojel yüzeyine $5 \mu\text{L}$ su eklenerek yapılmıştır.

8.2.3.7 Şişme oranının hesaplanması

Farklı formülasyonlarda hazırlanmış hidrojel filmler, şablon kullanılarak eşit çapta küçük parçalara kesilip bir gece boyunca 30°C 'de vakum etüvüne konularak nemi giderilmiş, ardından biyolojik ortamı taklit edebilen pH 6,4 tampon çözelti içinde bekletilerek, sabit ağırlığa ulaşana kadar belli zaman aralığında tartım yapılmıştır. Tartım yapmadan önce hidrojel yüzeyi hafifçe kurulanmıştır. Bütün formülasyonların denge şişme oranı Denklem 4.1. kullanılarak hesaplanmıştır.

8.2.4 *In vitro* ilaç salım çalışmaları

In vitro ilaç salım çalışmaları pH 6,4 TRIS tampon çözelti ortamında gerçekleştirilmiştir. Deney boyunca bir vial içindeki $0,8 \text{ cm}$ çapında kesilmiş protein yüklü hidrojel numuneleri, orbital karıştırıcı üzerinde $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ' de 100 d/d dönme hızında karıştırılmıştır. Tampon çözeltiye salınan protein konsantrasyonu 279 nm 'de

UV Spektrofotometre kullanılarak önceden çıkarılmış kalibrasyon eğrisi (A.5, A.6, A.7) yardımıyla Bölüm 3.2.7 de açıklanmış olan metotla hesaplanmıştır.

8.2.5 UV-Vis Absorbsiyon spektra ölçümleri

Bütün UV-Vis ölçümleri Perkin Elmer UV-Vis spektrofotometre ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Pektin-protein kompleksi oluşumunu ve bu esnada gerçekleşen majör değişimleri belirlemek amacıyla, 200-300 nm aralığında, hidrojel hazırlama esnasında BSA eklemeyen ve ekledikten sonra yapılmıştır [484]. Bütün çözeltiler ultra deiyonize su ile ve 25 °C’de hazırlanmıştır. Bütün ölçümler üç defa tekrarlanmıştır.

8.2.6 Circular dichroism (CD) ölçümleri

Farklı formülasyonlarda seçilmiş BSA yüklü hidrojel numuneleri, içinde pH 6,4 ortamında TRIS tampon çözelti bulunan viallere konulmuş ve orbital karıştırıcı üzerinde 100 d/d dönme hızı ve 25±1 °C sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır. CD ölçümleri viallerdeki çözeltilere uygulanmıştır. CD ölçümleri azot atmosferi altında, uzak-UV (190-260 nm) bölgesinde 0,1 cm yol uzunluğundaki kuvarz küvetler ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bütün UV-spektrallarda referans hattı olan pH 6,4 TRIS tampon çözelti çıkarılmış ve sonuçlar eliptiklik olarak mdeg biriminde alınmıştır.

8.2.7 Hidrojel Filmler için *in vitro* yara iyileşmesi çalışmaları

Bölüm 7.3.9’da açıklanan aynı yöntemler Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalında Doç. Dr. Saime Batirel tarafından yapılmıştır.

8.3 Sonuçlar ve Tartışma

Tez çalışmasının bu bölümünde hem albümin eksikliği yaşayan vakalar, yüksek eksudalı yaralanmalar ve yanık yaraları için albümin eksikliğini giderme, hem de yara örtülerinin büyüme faktörlerini adsorbe edebilme kapasitelerini incelemek motivasyonu ile çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla karıştırma ve adsorbsiyon yöntemleri kullanılarak BSA yüklü hidrojeller hazırlanmıştır.

Pektin-zeolit hidrojeller çapraz bağlayıcı olarak CaCl₂, plastikleştirici olarak gliserin kullanılarak iyonotropik jelleşme motoduyla hazırlanmıştır. Plastikleştirici malzeme gliserinin kullanılma amacı polimer zincirleri arasındaki hidrojen bağlarını azaltıp

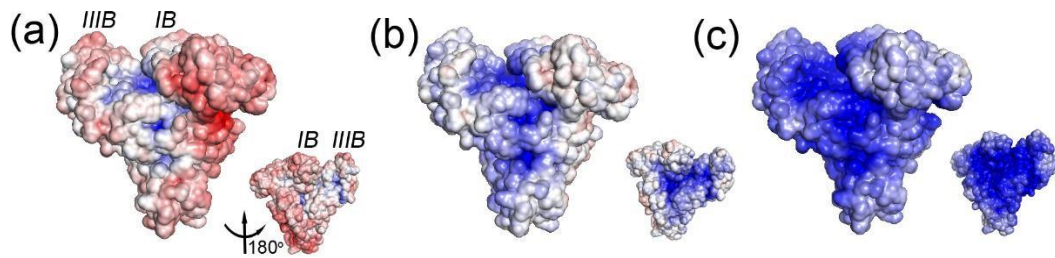
moleküler hacmi arttırarak film esnekliğini arttırmaktır. NaA-zeolit partikülleri ise film stabilitesini arttırmak [396] ve/veya ilaç deposu olarak kullanılmak amacıyla hidrojellere eklenmiştir.

Sentezlenmiş BSA yüklü bütün hidrojel filmler homojendir; üzerlerinde herhangi bir yarık, çatlak bulunmamaktadır. Hastaya sıkıntı vermeden yarayı takip edecek şekilde şeffaftır. Filmlerin yüzeyinde protein kristallerine rastlanmamıştır.

8.3.1 Moleküler seviyedeki etkileşimlerin incelenmesi

8.3.1.1 BSA yük dağılımı

Farklı pH değerlerindeki serum albüminin elektrostatik yüzey özellikleri, hidrojellere yükleme ve salım performansına etki etmesi beklenmektedir. Pektin zincirleri, zeolit partikülleri ve BSA molekülleri arasındaki etkileşimleri daha iyi anlayabilmek amacıyla öncelikle deney koşullarındaki BSA molekülü elektrostatik yüzey özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla albümin kristal yapısı (4LB9.pdb) yüzeyindeki yük dağılımı, APBS (Adaptive Poisson-Boltzmann Solver) yöntemi ile deney koşulları olan pH 6,4, 4,7 ve 4,3 için hesaplanmıştır ve Şekil 8.1’de yapılar üzerinde gösterilmiştir. Buna göre BSA toplam yükü pH 6,4 ortamında $-7e^-$, pH 4,7’de $+14e^-$ ve pH 4,3’te ise $+43e^-$ olarak hesaplanmıştır. pH 6,4’te albümin yapısı homojen olmayan bir yük dağılımına sahiptir. (Şekil 8.1 a). pH 6,4’te, kalp şekilli albümin yapısı IB ve IIIB bölgeleri arasında, geniş pozitif yüklü bir yama (mavi renkli) görülmüştür. Yüzeyin geri kalanı genellikle negatif yüklüdür (kırmızı renkli). pH 4,7’de (albümin izoelektrik noktası) elektrostatik yüzeyin değiştiği ve daha dengeli bir yük dağılımı olduğu belirlenmiştir (Şekil 8.1 b). Daha düşük pH değeri olan 4,3’te bütün protein yüzeyinin pozitif yüklü olduğu hesaplanmıştır (Şekil 8.1 c).

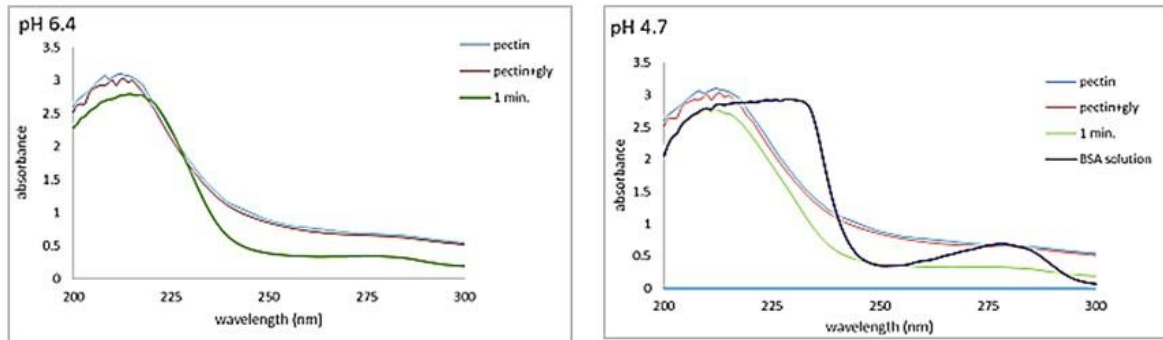


Şekil 8.1 : Serum albümin elektrostatik yüzey (a) pH 6,4; (b) pH 4,7; (c) pH 4,3. Renk skalası -10 kT/e (kırmızı) ve +10 kT/e (mavi) arasındadır.

8.3.1.2 Sentez çözeltilerinde pektin-BSA etkileşimi tayini

UV-Vis adsorpsiyon ölçümleri ile protein molekülündeki yapısal değişiklikler, pektin-protein kompleks oluşumu [485] ve protein yapısında majör bir değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır [484]. Bu çalışmanın aynı zamanda protein-karbonhidrat etkileşimlerine de iyi bir model olacağı düşünülmektedir.

(Pektin), (pektin + gliserin), (pektin + gliserin + BSA) ve (BSA) çözeltileri hidrojel sentezlenirken kullanılan koşullarda karıştırıldıktan sonra UV-Vis absorpsiyon ölçümleri 200-300 nm aralığında alınmıştır. Şekil 8.2’de görüldüğü gibi BSA esas olarak 200-300 nm aralığında, triptofan, tayrosin ve fenilalanin aromatik rezidülerine ait pik vermektedir [486]. Aromatik rezidülerin absorpsiyon spektrumunda bulundukları ortama göre dalga boyu ve şiddetinde değişiklik olabilmektedir. Dalga boyundaki değişiklik çoğunlukla proteinin katlı yapısının bozulmasıyla oluşan yeni bir yapının varlığını göstermektedir. Bu çalışmada, Şekil 8.2’de görüldüğü gibi 279 nm’de görülen saf BSA çözeltisi absorpsiyon piki dalga boyu, BSA çözeltisinin pektin-gliserin çözeltisi içine karıştırılmasıyla bir değişikliğe uğramamıştır. Bu sonuç, BSA moleküllerinin pektin-gliserin çözeltisi içine karıştırılarak kompleks oluşturulduğunda ciddi bir değişikliğe uğramadığını, BSA’nın katlı yapısının bozulmadığını göstermektedir.



Şekil 8.2 : Pektin, pektin-gliserin ve pektin-gliserin-BSA çözeltilerinin UV-taraması.

BSA yapısındaki değişiklikleri daha detaylı araştırmak, ikincil yapının korunup korunmadığını belirlemek amacıyla amacılı CD-UV çalışmaları yapılmıştır (bkz. Bölüm 8.3.7). Pektin-gliserin çözeltisine BSA çözeltisinin eklenmesiyle, 279 nm dalga boyundaki pikin şiddetinde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir (Şekil 8.2). Bu çözeltideki saf BSA miktarının azaldığını yani BSA molekülleri ile pektin zincirleri arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir.

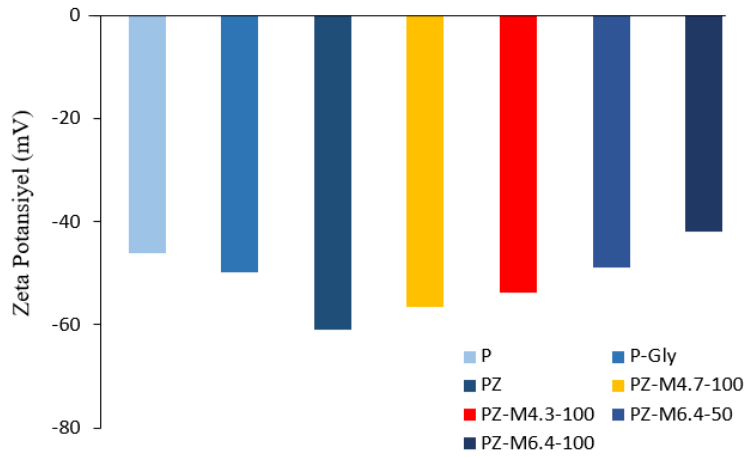
8.3.1.3 Sentez çözeltilerinin zeta potansiyel ölçümleri

Zeta potansiyelin (ζ) büyüklüğü kolloidal stabilitenin bir ölçüsüdür. Düşük ζ değerleri veren dispersiyonlar, van der Waals partiküller arası çekme kuvvetlerinin etkisiyle agregasyona uğrayabilirler [434].

Şekil 8.3' de sentez çözeltilerinin zeta potansiyel değerleri verilmiştir. Bütün çözeltilerin ζ değerleri negatif çıkmıştır. Bölüm 7.3.2.3' de tartışıldığı gibi pektin (P), pektin-gliserin (P-Gly) ve pektin-gliserin-NaA zeolit (PZ) çözeltilerinin ζ değerleri sırasıyla $-46,0 \pm 0,3$, $-49,8 \pm 0,7$ ve $-61,0 \pm 0,2$ mV olarak ölçülmüştür. ζ değeri +25 mV ile -25 mV dışında olan nanopartiküllerin önemli oranda stabil oldukları bilinmektedir. Dolayısıyla bu değerler, tüm çözeltilerin stabil bölgede olduğunu göstermektedir. Pektin çözeltisine gliserin ilavesi, solüsyonun ζ değerini çok fazla değiştirmemiştir. Buna karşın, zeolit partiküllerinin elektronegatif özelliğinden dolayı, zeolit ilavesiyle beraber pektin-gliserin çözeltisinde ζ değerinde önemli ölçüde değişmiştir.

Pektin zincirlerindeki COO^- grupları ile çapraz bağlayıcı Ca^{2+} arasındaki elektrostatik etkileşim ile oluşan çapraz bağlı kuru hidrojel filmlerin, pektin-gliserin çözeltisi ile karşılaştırıldıklarında daha az elektronegatif olması beklenmektedir. % 0,1 pektin çözeltisinin (LM amittli pektin) pH 4,0'da zeta potansiyel değeri -30 mV iken, bu çözelti çagraz bağlandığında ise bu değerin -10.4 mV'a düştüğü belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, 100 mg BSA içeren PZ-BSA çözeltisinin pH 6,4 ortamında zeta potansiyel değeri (PZ-6.4-100; - 41.9 mV), pH 4,7 ortamındaki zeta potansiyel değerine göre (PZ.4.7-100; -56.6 mV) daha düşüktür. PZ.6.4-100 çözeltisinin elektronegativitesi ise PZ.6.450 çözeltisinininkine göre daha düşüktür. Hidrojel filmlere daha fazla BSA molekölü bağlandığında yük nötralizasyonu oluşması beklenmektedir. PZ.4.7-100 formölasyonunun daha düşük elektronegativiteye sahip olması, bu pH'da BSA moleküllerinin daha fazla total pozitif yüke sahip olması (Şekil 8.1) ve pektin zincirleri üzerinde protonlanmış COO^- gruplarının daha az (pH 4,7 pektin polimerinin pKa değerine yakın bir pH olduğu için) bulunmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, pektin polimerinin pKa değeri yaklaşık pH 4,5 olduğundan, PZ.4.3-100 formölasyonunun zeta potansiyelinin PZ.4.7-100 formölasyonundan daha yüksek olması, pektinin bu pH değerinde daha az elektronegatif ve aynı zamanda BSA molekölünün ise önemli ölçüde pozitif yüklü

olmasına bağlanabilir. Sonuçlar Bölüm 8.3.4.2’de tartışılacak olan adsorpsiyon çalışmaları ile uyumludur.



Şekil 8.3 : Çözelti formundaki formülasyonların zeta potansiyel değerleri.

8.3.2 Hidrojellerin reolojik analizi

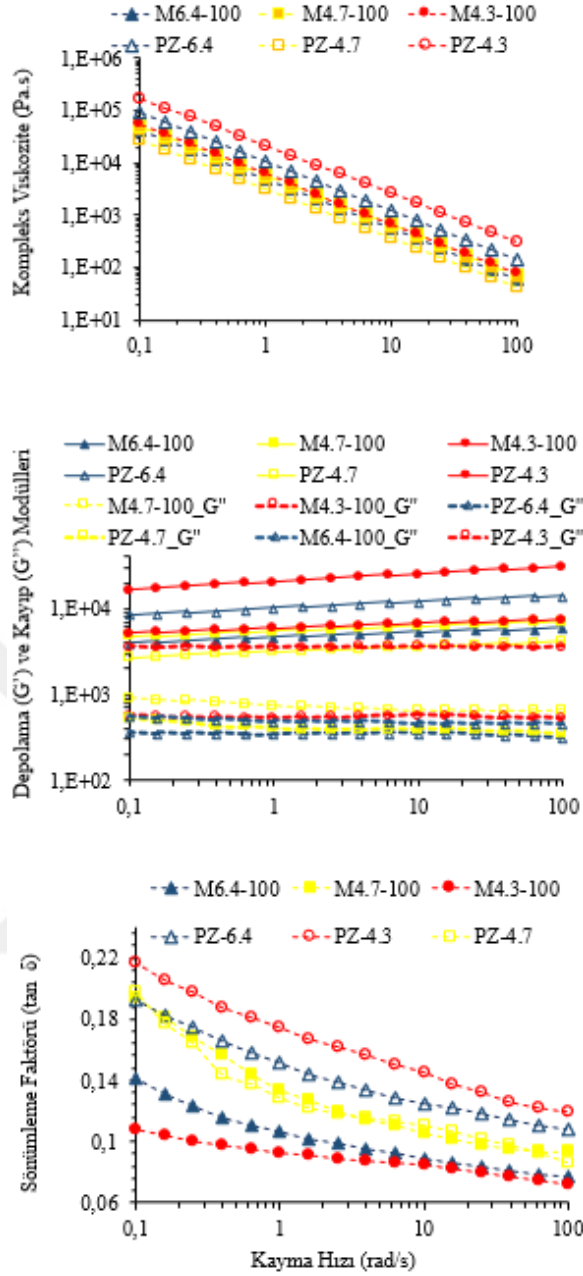
Reolojik analiz, hidrojellerin yapı-özellik ilişkisini belirlemek amacıyla henüz kurumamış, farklı pH değerlerindeki BSA içermeyen (PZ-6.4, PZ-4.7 ve PZ-4.3) ve 100 mg g⁻¹ film BSA’lı (M6.4-100, M4.7-100, M4.3-100) ıslak hidrojellere uygulanmıştır. Tez çalışmasının Bölüm 7 kapsamında yapılan çalışmalarında pektin temelli hidrojellerin reolojik özelliklerinin ortam pH değeri ve zeolit miktarından etkilendikleri belirlenmiştir.

Süspansiyonların kompleks viskozite (η) ve hidrojellerin depolama (G') ve kayıp modülleri (G'') ile G''/G' oranından hesaplanan sönümlleme faktörü ($\tan \delta$) ölçüm sonuçları radyal frakansın bir fonksiyonu olarak Şekil 8.4’ de verilmiştir. Bütün formülasyonların η değerlerinin frekans artışı ile birlikte düşmesi çözeltilerinin/süspansiyonların genel kayma incelmesi yapısında olduğunu göstermektedir(Şekil 8.4a). pH 4,3 koşullarında hazırlanmış pektin-zeolit süspansiyonu (PZ-4.3) en yüksek kompleks viskozite değerini vermiştir. PZ-6.4 süspansiyonunun η değeri PZ-4.7’ den daha yüksek ölçülmüştür. Bu durum, pektin zincirlerinin pH 6,4 ortamında, pH 4,7’ ye göre daha fazla toplam yüke sahip olmasıyla açıklanabilir. Pektin zincirleri daha fazla yüklü olduğu zaman, zincir içi ve zincirler arası itme kuvvetleri artacağından, hidrodinamik çap da daha düşük pH koşullarında artacaktır. Buna karşın, düşük pH koşullarında (PZ-4.7), toplam yük miktarındaki düşme zincir esnekliği ve dolaşıklılığının azalmasına neden olacak ve böylece

moleküller daha fazla yer tutacak, zincir esnekliği düşerek çözeltinin viskozitesi düşecektir. pH 6,4 ve pH 4,3 koşullarında BSA içermeyen süspansiyonların (PZ-6.4 and PZ-4.3) kompleks viskoziteleri, BSA yüklü süspansiyonların BSA (M6.4-100 and M4.3-100) kompleks viskozitelerinden yüksek bulunmuştur. Buna karşın pH 4,7 ortamındaki BSA yüklü pektin-zeolit süspansiyonunun (M4.7-100) kompleks viskozitesinin BSA içermeyen PZ-4.7 süspansiyonundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Şekil 8.4.b’de pH 4,3, 4,7 ve 6,4 koşullarında hazırlanmış hidrojellerin frekans taraması sonuçları (mekanik spektra) görülmektedir. G' ve G'' değerlerinin frekansa bağlı olarak değiştiği ve G' değeri G'' ’den önemli oranda yüksek olduğu için pektin-zeolit ve pektin-zeolit-BSA hidrojellerinin katı benzeri elastik davranış gösterdikleri söylenebilir. Mekanik spektrada bütün formülasyonlarda depolama modülü frekans ile artarken, kayıp modülü azalmaktadır. PZ-4.3’ün G'' değerinin çok yüksek olduğu ve bu formülasyonun solüsyonu da genel eğilimlere uymadığı için bu formülasyonun reolojik analiz sonuçları değerlendirilmeyecektir. Bu farklılığın, zeolit partiküllerinin asidik koşullarda dekompoze olma eğiliminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

PZ-6.4 hidrojelinin G' değeri PZ-4.7’ nin G' değerinden daha yüksek ölçülmüştür. pH 4,7 civarında, pH 6,4’e göre pektin ağ yapısı daha açıktır. pH 4,7’ de, pektin-zeolit hidrojel, agregasyonun daha az olduğu ve yapının lineer zincirlerden oluştuğu kompleks viskozite sonuçlarından da görülmektedir. pH 6,4 ortamında toplam yük miktarının artışıyla, zincirler agregasyona uğamaktadırlar. Agregasyon miktarı attıkça hidrojellerin depolama modülleri de artmaktadır [487].



Şekil 8.4 : Hidrojellerin reolojik analizi.

Hem pH 4,7 hem de pH 6,4 ortamında hidrojellerin kayıp modülü (G''), BSA moleküllerinin eklenmesiyle artmıştır. pH 4,7 koşullarında hidrojele BSA eklenmesi (M4.7-100) depolama modülünü arttırmıştır. Buna karşın, pH 6,4 ortamında, BSA yüklü hidrojelin (M6.4-100) depolama modülü, aynı pH'daki BSA içermeyen hidrojele (PZ-6.4) göre düşüş göstermiştir. Polisakaritlerin proteinler ile karışma proseslerinde pH, protein/polisakkarit oranı ve iyonik konsantrasyonuna bağlı olarak ya antagonist (G' değerinde düşüşe neden olur) ya da sinerjestik etki (G' değerinde artışa neden olur) oluşmaktadır [487 - 489]. Ortam pH veya protein/polisakkarit oranı

kritik bir noktaya ulaştığında, antagonist etki dolayısıyla protein ilavesiyle G' değerinde düşüş gözlenecektir [488, 490]. Polisakkarit ve protein arasındaki sinerjestik etki dış hacim etkisi ile oluşmaktadır [488]. pH 4,7 koşulunda G' artışı, faz ayırımı olmadan her bir polimerin sadece toplam hacmin bir bölümünü kaplamasıyla açıklanabilir [490]. Bu pH değeri, BSA'nın izoelektrik noktası olduğu ve pektin zincirlerinde de az miktarda COO^- bulunduğu için, zeta potansiyel analizi (Şekil 8.3) sonuçlarında da görüldüğü gibi iki polimer düşük bir oranda etkileşime girmektedir. Buna karşın PZ-6.4 hidrojeline BSA moleküllerinin ilavesi G' değerini düşürmektedir. Bu pH değerinde, her iki polimerin de net yükü negatif olmasına karşın, polisakkarit zincirleri protein yüzeyinin pozitif yüklü bölümlerine bağlanacağından, pektin zincirleri ile BSA arasındaki etkileşim artmaktadır [491]. Aynı zamanda yapıdaki Ca^{2+} iyonlarının, hem pektin hem de BSA ile etkileşime girmesi beklenmektedir. Bu etkileşimde pektin, BSA ve Ca^{2+} elektrostatik kompleksini oluşturacak ve böylece G' düşecektir.

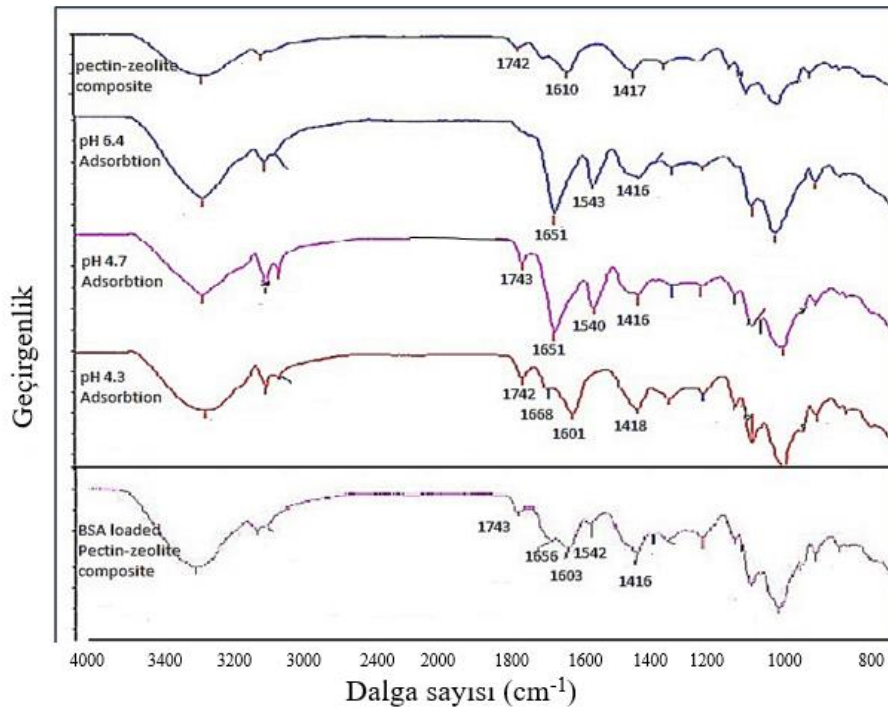
Ek veriler elde etmek amacıyla, her bir örnek için G'' değerinin G' 'ne oranı olan sönümleme faktörü ($\tan \delta$) hesaplanmıştır (Şekil 8.4). $\tan \delta$ daha hassas bir kıyaslama olanağı tanıdığı ve yapılar arasındaki farkları daha iyi ortaya çıkardığı için daha çok kullanılan bir indikatördür. Açısal hız 100 rad/s olduğunda, PZ-6.4'ün $\tan \delta$ değeri 0,11 iken, PZ-4.7 hidrojelinde bu değer 0,093'e düşmüştür (Şekil 8.4). Daha düşük $\tan \delta$, daha sert ve daha kuvvetli molekül içi etkileşimin bulunduğu bir yapıyı göstermektedir. Antagonist etki nedeniyle PZ-6.4'ün G' değeri, BSA ilavesiyle (M6.4-100) azalmasına karşın, $\tan \delta$ değeri 0,11' den 0,0768'e düşmüştür (1,4 kat azalma). Bu sonuç M6.4-100 yapısında PZ-6.4 yapısına göre daha kuvvetli fizikokimyasal etkileşimler olduğunu göstermektedir. Bu durum pH 6,4 ortamında albümin yüzeyindeki pozitif yüklü bölgelerin, pektin zincirleri ile etkileşerek, ek çapraz bağlayıcı gibi davranmasıyla açıklanabilir. Literatürde, pozitif yüklü peptit veya proteinlerin katyonik bölgelerinin çağraz bağlayıcı gibi davranarak anyonik polisakkaritler ile etkileşimde bulunduğu belirtilmektedir [492].

PZ-4.7 hidrojelinde ise albümin ilavesi (M4.7-100) $\tan \delta$ değerini çok az değiştirmiştir.

8.3.3 BSA yüklü hidrojelilerin yapısal ve morfolojik analizi

8.3.3.1 FT-IR Analizi

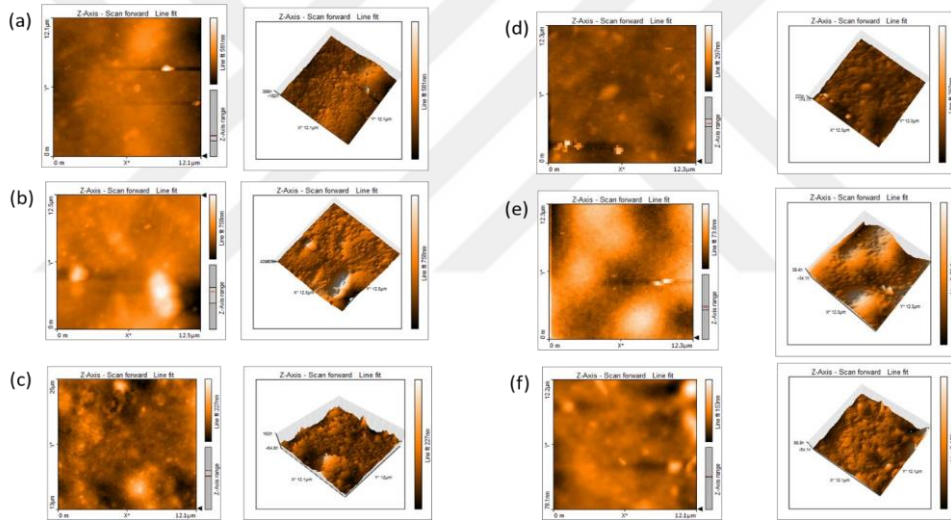
Pektin-zeolit-BSA etkileşimlerini incelemek amacıyla hidrojel filmler FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Şekil 8.5'te farklı koşullarda hazırlanmış hidrojel filmlerin FTIR spektralları görülmektedir. Pektin-zeolit hidrojelinin FTIR spektrumu analizi Şekil 6.6 'da detaylı olarak açıklanmıştır. BSA molekülünün ikincil yapısını temsil eden C=O gerilme (1656 cm^{-1} -amit I) ve N-H bükülme ile birleştirilmiş C-N gerilme (1540 cm^{-1} - amit II) karakteristik piklerini vermektedir[493]. A4.7-100 ve A6.4-100 hidrojellerinde BSA'nın varlığı FTIR spektrumunda görülen amit I ve amit II piki ile konfirme edilmiştir. pH 6,4 ve pH 4,7'de (A6.4-100, A4.7-100 ve M6.4-100) karıştırma ve adsorpsiyon örneklerinin FTIR spektrumu, albümin molekülünün karakteristik piklerini (1656 cm^{-1} and 1540 cm^{-1}) vermiştir. Bu nedenle BSA'nın bu pektin-zeolit hidrojel filmlere başarı ile yüklendiği rahatlıkla söylenebilir. Buna karşın, pH 4,3 ortamında hazırlanan A4.3-100 hidrojel filminin spektrasında amit I (1656 cm^{-1}) ve amid II (1540 cm^{-1}) piklerinin görülmemesi, bu koşullarda pektin-zeolit filmlere albümin moleküllerinin adsorplanamadığını ya da yapının bozulmadığını göstermektedir. Bu sonuçlar, pektin-zeolit filme albümin adsorplama deneyinde alınan (Bölüm 8.3.4.2) sonuçlar ile uyumludur.



Şekil 8.5 : BSA yüklü hidrojelilerin FTIR spektrumu.

8.3.3.2 AFM analizi

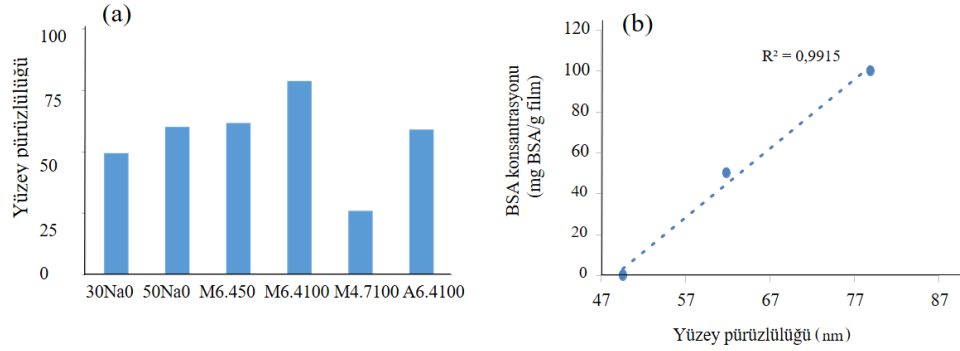
AFM görüntüleri alınarak kuru hidrojel filmlerin yüzey pürüzlülükleri analiz edilmiştir. Her örnek için $12.5 \times 12.5 \text{ mm}^2$ kuru filmlerin AFM analizleri yapılmış ve yüzey pürüzlülükleri belirlenmiştir. Analizi yapılan hidrojel filmlerin yüzey topolojileri Şekil 8.6, yüzey pürüzlülükleri ise Şekil 8.7a’da verilmiştir. Yüzey topoloji görüntülerindeki farklılık, değişik koşullarda sentezlenen filmlerin farklı yapısal özellikler taşıdığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre pH 5,8 ortamında ultra-deiyonize su ile hazırlanmış pektin-zeolit hidrojelinde zeolit miktarının artışı ile ortalama yüzey pürüzlülüğü de artmıştır. Bu sonuç, SEM analizinde zeolit eklenmesiyle daha geniş porların elde edildiği yorumu yapılmış olan önceki çalışmamız [2] ile uyumludur.



Şekil 8.6: Farklı koşullarda hazırlanmış pektin-zeolit ve BSA yüklü pektin-zeolit hidrojellerinin AFM yüzey topoloji görüntüleri: (a) 30 mg zeolitli NaA-zeolit-pektin (30Na0) (b) 50 mg zeolitli NaA-zeolit-pektin (50Na0) (c) M6.4-100 (d) M6.4-50 (e) A6.4-100 (f) M4.7-100.

pH 5,8 ortamında hazırlanmış 30Na0 hidrojeline BSA immobilizasyonu sonrası (M6.4-100), hidrojel filmlerin yüzey pürüzlülüğü artmıştır (Şekil 8.7a). Yüzey pürüzlülüğü aynı zamanda, başlangıç BSA konsantrasyonu artışı ile de yükselmiştir. 30Na0 hidrojelinin yüzey pürüzlülüğü 49,6 nm iken, M6.4- 50 hidrojelindeki (50 mg g-film⁻¹ başlangıç BSA konsantrasyonu) 61,9 nm, M6.4-100 hidrojelinin (100 mg g-film⁻¹ başlangıç BSA konsantrasyonu) yüzey pürüzlülüğü ise 79,8 nm olarak belirlenmiştir. Karıştırma metodu için yüzey pürüzlülüğü ile hidrojel filmlerdeki BSA konsantrasyonu arasında lineer regresyon katsayısı $R^2=0.99$ olacak şekilde yüksek bir

korelasyon hesaplanmıştır (Şekil 8.7a). Yüzey pürüzlülüğündeki bu artış aynı zamanda, protein adsorpsiyonu için geniş bir yüzey oluşmasını sağlayacaktır. Sonuçlar adsorpsiyon çalışmaları ile (Bölüm 8.3.4.2) uyumludur.

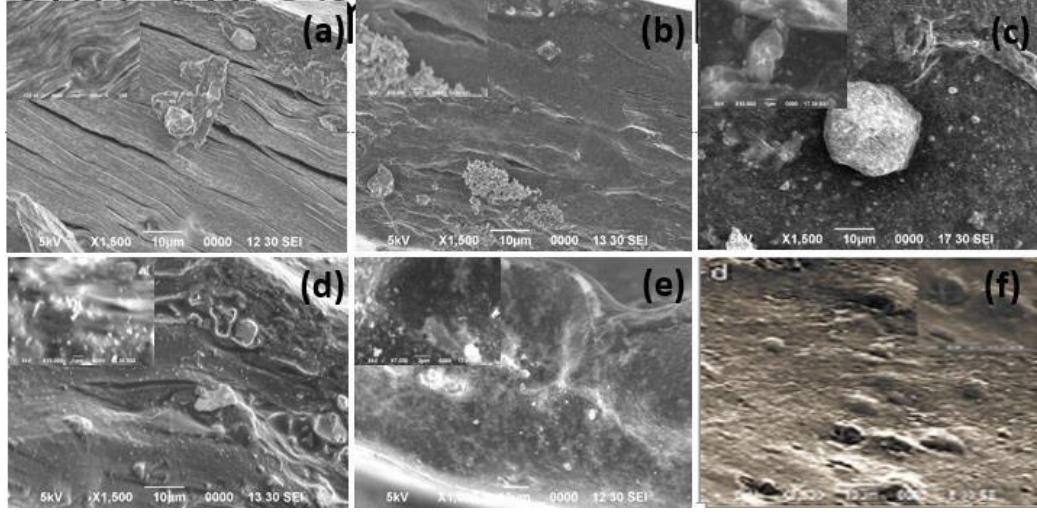


Şekil 8.7 : (a) Farklı koşullarda hazırlanmış hidrojellerin yüzey pürüzlülükleri, (b) Yüzey pürüzlülüğü ile BSA konsantrasyonu arasındaki ilişki.

Aynı koşullarda adsorpsiyon metodu ile hazırlanan hidrojel filmlerin yüzey pürüzlülüğü (A6.4-100: 59 nm), karıştırma metodu (M6.4-100:79.8 nm) ile hazırlananlara göre daha düşük bulunmuştur. Adsorpsiyon filmlerinde BSA çözeltisi, pektin-zeolit solüsyonu Ca^{2+} iyonu ile çapraz bağlandıktan sonra matrikse eklenmektedir. Bu durumda, pektin zincirlerindeki COO^- grupları öncelikli olarak Ca^{2+} iyonu ile etkileşecektir. Ardından film kurutulduktan sonra eklenen BSA çözeltisi, açıkta kalan COO^- grupları ile etkileşecek veya (Ca^{2+} - COO^- - BSA fonksiyonel gruplarının) ikili olarak aralarındaki dağılım katsayısının büyüklüğüne göre etkileşime geçecektir. Oysa ki karıştırma filmlerinde öncelikli olarak pektin çözeltisine BSA yüklü zeolit solüsyonu eklenecek ve pektin zincirlerinin fonksiyonel grupları ile BSA molekülünün fonksiyonel grupları, henüz çözelti halinde iken, sisteme daha çapraz bağlayıcı Ca^{2+} girmeden etkileşeceklerdir. Bu durumda BSA molekülü, sanki bir çapraz bağlayıcı ajan gibi davranarak [494] albumin ilavesiyle ‘yumurta kutusu’ benzeri bir yapının oluşmasını sağlayarak, daha porlu bir yapı elde edilmesine sebep olacaktır.

8.3.3.3 SEM analizi

Farklı metot (karıştırma ve adsorpsiyon), pH (pH 6,4 ve 4,7) ve başlangıç BSA konsantrasyonu (25, 50 and 100 mg g-film⁻¹) ile hazırlanmış olan kuru hidrojel filmlerin ara kesitlerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri Şekil 8.8’de verilmiştir.

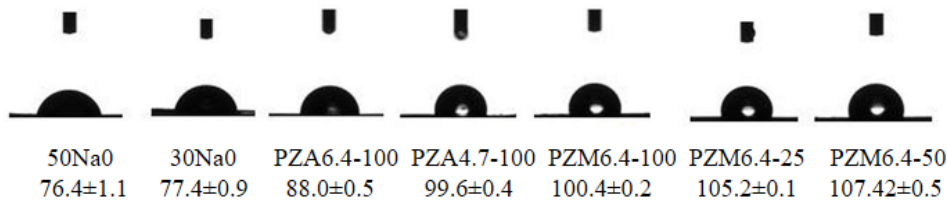


Şekil 8.8 : BSA yüklü hidrojenlerin SEM görüntüleri (a) PZ-A4.7-100; (b) PZ-M6.4-100; (c) PZ-A6.4-100; (d) PZ-M6.4-50; (e) PZ-M6.4; (f) PZ-0.

Şekil 8.9 f’de, pektin-zeolit hidrojenin düzensiz yapıdaki küresel geniş porlardan oluşmuş az pürüzlü yapısı görülmektedir. Bu yapı, çözücünün hidrojen filminden içeri penetrasyonu ve filmlerden BSA salımı için çok uygun bir yapıdır. Pektin filmlere BSA molekülü eklendiğinde (Şekil 8.8 a - d) SEM görüntülerinde küçük protein partikülleri belirmiştir. BSA başlangıç konsantrasyonu ve ortam pH değerinin film morfolojisi üzerine önemli etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Daha az BSA kullanıldığında (M6.4-25, M6.4-50) küçük protein partiküllerinin hidrojen boyunca yayıldığı (Şekil 8.8 d ve e), buna karşın 100 mg albumin g⁻¹ film formülasyonunda, hem adsorpsiyon (A6.4-100) hem de karıştırma (M6.4-100) metodunda, yaygın olarak BSA kristallerinin bulunduğu porlu bir yapı gözlenmiştir (Şekil 8.8. b ve c). pH 4,7 ortamında adsorpsiyon metodu ile hazırlanmış 100 mg BSA/g film albuminli hidrojen filmlerin (A4.7100) kesitlerinde çatlaklar açıkça görülmüştür (Şekil 8.8 a). Pektin-zeolit filmlerin BSA yüklü olan ve olmayan örneklerinin morfolojilerinde gözlenen farklılıklar, pektin hidrojeninin boşluklarına protein moleküllerinin difüzyonundan kaynaklanıyor olabilir. Yapılan SEM analizi ile pektin-zeolit filmlere BSA moleküllerinin başarılı bir şekilde yüklendiği ve elde edilen yapıların birbirinden farklı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

8.3.3.4 Su temas açısı ölçümü

Kuru hidrojel filmlerin hidrofilik yüzey özellikleri, durgun damla (*sessile drop*) görüntü analizi metodu ile temas açıları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 8.9). Bu şekilde, hazırlama metodu, başlangıç BSA konsantrasyonu ve ortam pH değerinin hidrojel filmlerin yüzey hidrofilitesi özelliği üzerine etkileri incelenmiştir. Pektin hidrojelinin temas açısı değeri 55° iken [124], bu değer zeolit ilavesiyle (PZ hidrojeli) 77°'ye yükselmiştir (Şekil 8.9). BSA immobilizasyonunun filmlerin temas açısı değerini yaklaşık 25° daha arttırdığı belirlenmiştir. Adsorpsiyon örneklerinin (A6.4-100: 88°, A4.7-100: 99.6°) temas açısı değeri karıştırma metoduyla hazırlanan örneklerininkine göre (M6.4-100: 100.4°; M6.4-25:105°; M6.4-50: 107°) daha düşük ölçülmüştür. Adsorpsiyon filmleri hazırlanırken, Ca^{2+} iyonu ile iyonik jelleşmenin ardından ortamda kalan çok az miktarda karboksilik asit grupları ile BSA molekülü etkileşebilmekte ve bu nedenle BSA molekülleri toplam yükünün önemli bir kısmını koruyabilmektedir. Hidrojel yüzeyindeki daha yüksek yük ise, su molekülleri ile kolaylıkla hidrojen bağı da oluşturarak etkileşebilmektedir. Bu durum yüzey hidrofilitesinin artmasına neden olmakta ve dolayısıyla temas açısı değerini düşürmektedir.



Şekil 8.9 : BSA yüklü hidrojellerin temas açıları.

pH 6,4 ortamında pektin zincirlerinde daha fazla miktarda deprotonlanmış karboksilik asit grup bulunduğu, dolayısıyla ortamda daha fazla yük olduğu için, beklendiği şekilde pH 6,4 ortamında hazırlanan A6.4-100 filminin temas açısı (88°), pH 4,7 ortamında hazırlanan A4.7100 (99°) filminin temas açısından daha küçük ölçülmüştür. Bu durum hidrojel yapısında pH 6.4'te daha fazla sayıda bulunan polar grupların ($-COO^-$) Ca^{2+} ile artan etkileşimi sonucu daha porlu bir hidrojel yapı oluşmasıyla açıklanabilir. Su buharı geçirgenliğinin yüzey alanı ve polariteye bağlı olduğu bilinmektedir [495]. Yüzeyin pürüzlülüğünün çok arttığı durumlarda, hidrofilik yüzeyler, bu aşırı pürüzlülük nedeniyle hidrofobik yüzey gibi davranabilirler [496].

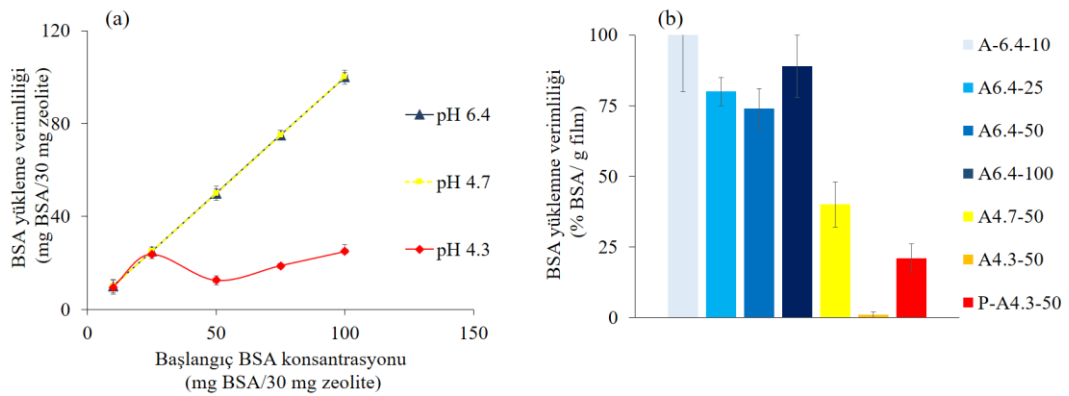
Sonuçlar zeta potansiyel (Şekil 8.3.2), reoloji (Şekil 8.3.5) ve aşağıda tartışılacak olan şişme sonuçları ile uyumludur.

8.3.4 Pektin-Zeolit hidrojel filmlere BSA yükleme deneyleri

8.3.4.1 Zeolit partiküllerine BSA adsorpsiyonu

Öncelikli olarak, membrana difüzyon metodu ile hazırlanacak hidrojel filmlerin çekirdek bölümünü oluşturacak olan zeolit yüzeyine, BSA moleküllerinin adsorpsiyonu incelenmiş ve farklı pH değerlerinde adsorpsiyon verimliliği incelenmiştir (Şekil 8.10). Deneyler farklı pH (6,4, 4,7 veya 4,3) ve konsantrasyonlardaki BSA çözeltileri (10, 25, 50, 100 mg BSA/ 30 mg NaA-zeolit) ile yapılmıştır.

Şekil 8.10' de görüldüğü gibi düşük pH'da (pH 4,3) BSA başlangıç konsantrasyonu arttıkça, yükleme verimliliği düşmüştür. pH 6,4 ve pH 4,7 koşullarında BSA başlangıç konsantrasyonunun yaklaşık %100'ü zeolit partiküllerine yüklenmiştir. Buna karşın, pH 4,3'te adsorpsiyon verimliliği düşmüştür. Sonuçlar literatür ile uyumludur [483].



Şekil 8.10 : (a) Farklı başlangıç konsantrasyonu ve pH değerlerinde, NaA-zeolit yüzeyine BSA adsorpsiyon verimliliği, (b) pektin-zeolit ve pektin hidrojellere BSA adsorbsiyon verimliliği.

Protein molekülleri yüzeylerinde hem pozitif hem de negatif yük taşıyan amfoterik yapılardır. Bu nedenle protein ve polisakarit zincirleri arasında kendiliğinden hem elektrostatik itme hem de çekme oluşabilir. Gerçekten de BSA yüzey yükü dağılımı hesapları (Şekil 8. 1) pH 6,4 ortamında net negatif yüklü albümin molekülünün, negatif yüklü zeolit partiküllerine nasıl adsorblandığı hakkında fikir vermektedir. APBS hesaplarına göre, BSA'nın yüzeyinde pozitif ve negatif yüklü geniş bölgeler

mevcuttur[497]. BSA yüzeyindeki bu heterojen yük dağılımı, toplam yüzey yükü negatif (-7e) (Şekil 8.10) olduğu pH değerinde bile (pH 6,4), BSA moleküllerinin negatif yüklü zeolit partiküllerine adsorpsiyonun gerçekleşmesini sağlamıştır.

8.3.4.2 Pektin-zeolit hidrojel filmlere BSA adsorpsiyonu

Pektin-zeolit hidrojel filmlere farklı pH ve başlangıç BSA konsantrasyonlarında adsorplanan BSA miktarları Çizelge 8.1 ve Şekil 8.10'da verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ortam pH değeri ve çözeltideki BSA konsantrasyonu adsorpsiyon verimliliğine önemli ölçüde etki etmektedir. FTIR ve SEM analizlerinde de belirlendiği gibi BSA molekülleri hem pH 6,4 hem de 4,7'de pektin-zeolit matrikse başarılı bir şekilde yüklenmiştir. PZ-A6.4-100 filmi 88 mg BSA g⁻¹ film (% 88), PZA6.4-50 filmi 37 mg BSA g⁻¹ film (% 74) BSA adsorplarken, PZ-A4.7-50 filmi sadece 20 mg BSA g⁻¹ film (%40) adsorplayabilmiştir. PZA4.3-50 formülasyonu albümin moleküllerini adsorblayamamıştır. Buna karşılık aynı koşullardaki zeolit içermeyen pektin hidrojeli (P-A4.3-50) 21 mg BSA g⁻¹ film miktarında adsorplamıştır. PZA-4.3-50 ile P-A4.3-50 arasındaki farkın zeolit partiküllerinin asidik ortamda dekompoze olma eğiliminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

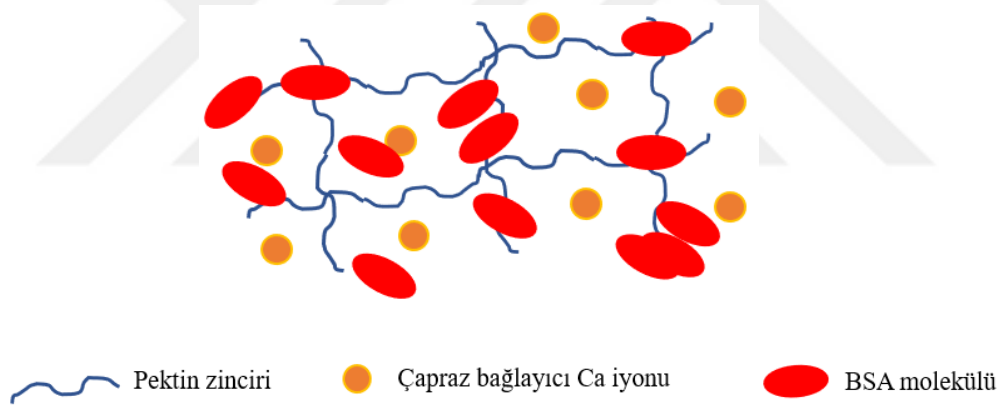
Adsorpsiyon verimliliği pH artışıyla beraber artmıştır (Çizelge 8.1). Sonuçlar, pH 6,4 değerinde yükleme oranının arttığını destekleyen zeta potansiyel ve reolojik analiz sonuçları ile uyumludur. pH artışıyla beraber pektin zincirlerindeki yük miktarı da artmaktadır. BSA esnek bir protein olduğundan, bir yüzeye adsorplanırken çözelti pH değerinden önemli ölçüde etkilenmektedir [483]. Lokal yük yoğunluğu BSA ve pektin arasındaki kompleks oluşumunda etkilidir [381].

pH 6.4'te negatif yüklü polimer yüzeyi ile negatif yüklü protein arasındaki yüksek adsorpsiyon verimliliği; (i) BSA yüzeyindeki heterojen yük dağılımı, (ii) pektin zincirlerindeki COO⁻ sayısının artışı, (iii) çapraz bağlayıcı Ca iyonları ile albüminin negatif yüklü rezidülerinin olası etkileşimi ile açıklanabilir.

Temel makromolekül etkileşimleri hidrojen bağı veya hidrofobik etkileşimler ile başlatılmaktadır. Bunun yanı sıra, farklı yüklü rezidülerin karışmasıyla oluşan kompleks çözeltilerin etkileşimlerinin tersine, benzer yüklü çözeltiler itici elektrostatik kuvvetleri yenen kısa mesafeli kuvvetli katyon- π etkileşimleri ile de domine edilebilirler. Moleküler ve yüzey kuvveti ölçümleri çalışmaları, sulu çözeltide katyon- π etkileşimlerinden kaynaklanan ve kısa mesafeli katyon ve aromatik polimerler

arasındaki kuvvetli adhezyon kuvvetlerinin, sulu çözeltideki farklı yüklü polimerler arasındaki elektrostatik etkileşimlerden daha kuvvetli olduğunu kanıtlamıştır [498, 499] Her iki makromolekülün de net yüzey yükünün 0 olduğu durumlarda zayıf Coulomb kuvvetlerin varlığı literatürde gösterilmiştir [500]. Birçok makalede, bu tarz etkileşimlerin, proteinlerin yüzeyindeki pozitif yüklü yamaların bulunmasına bağlanmıştır[428].

Bunun yanı sıra proteinler ve katı yüzeyler arasındaki etkileşim, adsorblanan molekülün yüzey heterojenitesi ve moleküler özelliklerinden etkilenmektedir [501]. Bilindiği gibi iyonik jelleşme ile oluşan hidrojel filmler porludurlar. Pektin, pH 4,7 ve 4,3'te pH 6,4'e göre daha az dolaşık ve porlu bir yapı oluşturmaktadır. Pozitif yüklü proteinler ile anyonik polisakkaritler arasındaki elektrostatik çekme etkileşimleri jelleşme oluşturmaktadır. Burada katyonik fragment bir çapraz bağlayıcı gibi davranmaktadır (Şekil 8.11) [494].

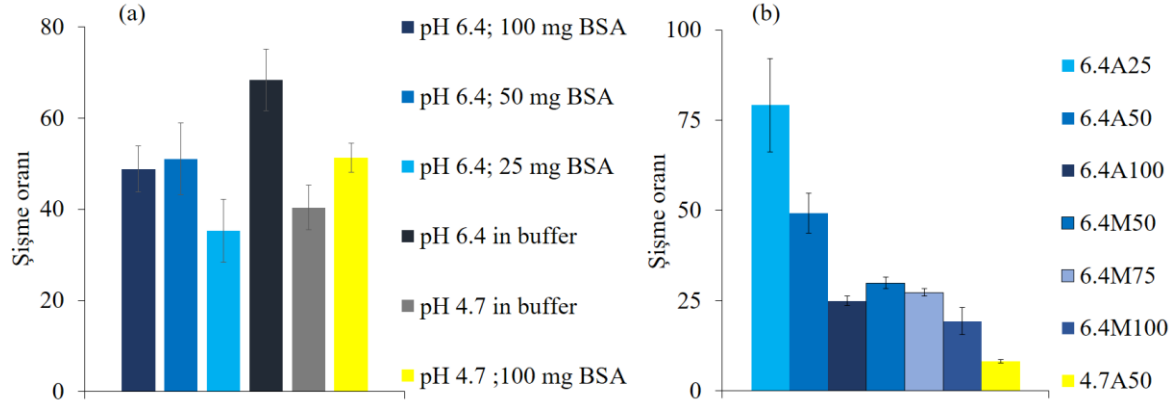


Şekil 8.11 : Pektin zincirleri ile BSA molekülleri etkileşiminin şematik gösterimi.

8.3.5 Hidrojel filmlerin BSA adsorpsiyonu esnasında şişme analizi

Pektin-zeolit hidrojel filmlerin, pH 6,4 ve pH 4,7 koşullarında BSA adsorpsiyon çözeltisi ve tampon çözeltisi içindeki denge şişme oranları sırasıyla Şekil 8.12 ve 8.12b'de verilmiştir. pH 6,4'te A6.4-100, A6.4-50 ve A6.4-25 hidrojel filmleri için adsorblanan BSA konsantrasyonu sırasıyla 88,5, 37,0 ve 16,0 mg g⁻¹ film (Şekil 8.11, Çizelge 8.1) iken, bu filmlerin adsorpsiyon esnasında şişme oranları sırasıyla 50, 51 ve 35 olarak hesaplanmıştır (Şekil 8.12). PZ hidrojel filminin bu pH değerinde tampon çözelti içindeki şişme oranı ise 68 olarak ölçülmüştür. Bu oran aynı koşullarda BSA

çözeltisi içindeki şişme oranına göre yüksektir. Bu durum, BSA molekülünün pozitif yüklü amino asitlerinin pektin zincirlerinin karboksil ve/veya hidroksil grupları ile etkileşerek ek çapraz bağlayıcı gibi davranmasıyla açıklanabilir [487, 492]. Böylece, hidrojel yapıda güçlenme, dolayısıyla geçirgenlikte azalma olacak ve çözücü penetrasyonu düşecektir.



Şekil 8.12 : Hidrojellerin şişme oranları (a) pektin zeolit hidrojellerin adsorbsiyon çözeltileri ve tampon çözelti içinde (b) BSA yüklü pektin-zeolit hidrojellerin pH 6,4 tampon çözelti içindeki şişme oranları.

Buna karşın, adsorpsiyon işlemi pH 4,7'deki BSA çözeltisi ile yapıldığında, tampon çözeltisi içindeki hidrojel film (PZ; 40.37), BSA çözeltisi içindeki hidrojel filminden (A4.7-100; 51) daha az şişmiştir. Bu farklılık pektin zincirlerinin asidik koşullarda pH 6,4 ortamına göre, protein molekülünün pozitif yüklü amino asitleri ile etkileşebilecek daha az sayıda iyonize -COOH grupları bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Böylelikle, pektin-zeolit filmi ile BSA etkileşmesi daha az olacağı için, BSA molekülleri ek çapraz bağlayıcı görevini de düşük bir seviyede gerçekleştirebilir. Bu şekilde BSA çözeltisi içindeki pektin-zeolit hidrojel filmi (bu durumda BSA yapıya eklenerek toplam ağırlığı arttırdığı için), tampon çözeltisi içindeki pektin-zeolit hidrojel filminden daha fazla şişebilir.

8.3.6 Zeolit partikülleri ve hidrojel filmlerden BSA salımı

BSA yüklü hidrojel filmlerin denge şişme oranları Çizelge 8.1 ve Şekil 8.12' de verilmiştir. Hazırlama metodu, BSA başlangıç konsantrasyonu ve yükleme pH değeri hidrojel filmlerin şişme oranına önemli oranda etki etmektedir.

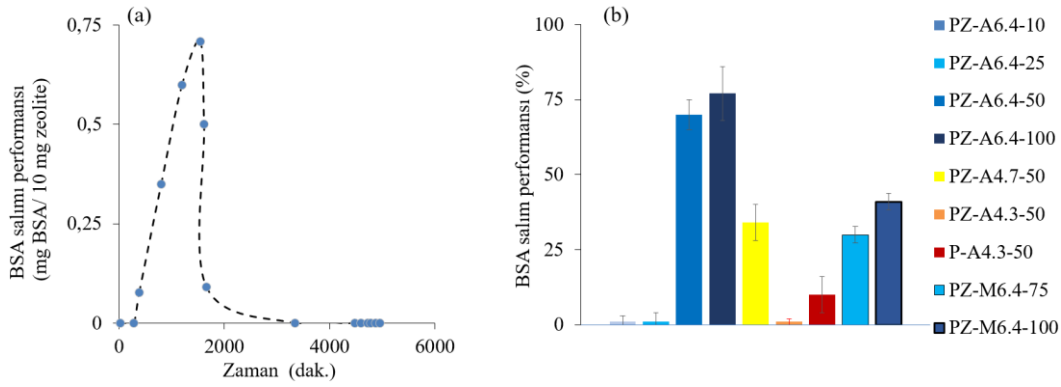
Adsorpsiyon metodu ile hazırlanmış filmlerin (A6.4-50; % 49,2) şişme oranının, karıştırma metodu ile hazırlananlara göre (M6,4-50; % 29,0) çok daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 8.12). Karıştırma metodu ile hazırlanan filmlerde, filme eklenen

BSA'nın tamamı pektin-zeolit karışımına çözelti halinde iken eklenmektedir. Halbuki, adsorpsiyon metodunda kuru pektin-zeolit hidrojel filmleri, başlangıç albümin miktarının sadece %74'ünü adsorplayabilmiştir. Daha önce tartışıldığı gibi ve literatür ile uyumlu olarak, BSA molekülünün pektin-zeolit filmleri üzerinde yapı kuvvetlendirici ve ek çapraz bağlayıcı etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bunun sonucu olarak BSA miktarı daha fazla olan film daha az şişmektedir.

Ayrıca, A6.4-50 hidrojel filminin A4.7-50 filminden daha fazla şişmesini, pH 6,4'te daha fazla miktarda albümin adsorplamasına ve pH 6,4'te pektin zincirlerinin pH 4,7'ye göre daha fazla şişmesine bağlanabilir.

Şişme oranı, başlangıç BSA konsantrasyonunun artışı ile düşüş göstermiştir. Bu durum da BSA moleküllerinin pektin zincirleri üzerinde yapı kuvvetlendirici ve ilave çapraz bağlayıcı davranışı ile açıklanabilir. Daha fazla albümin bağlandığında yapı daha az şişebilmektedir.

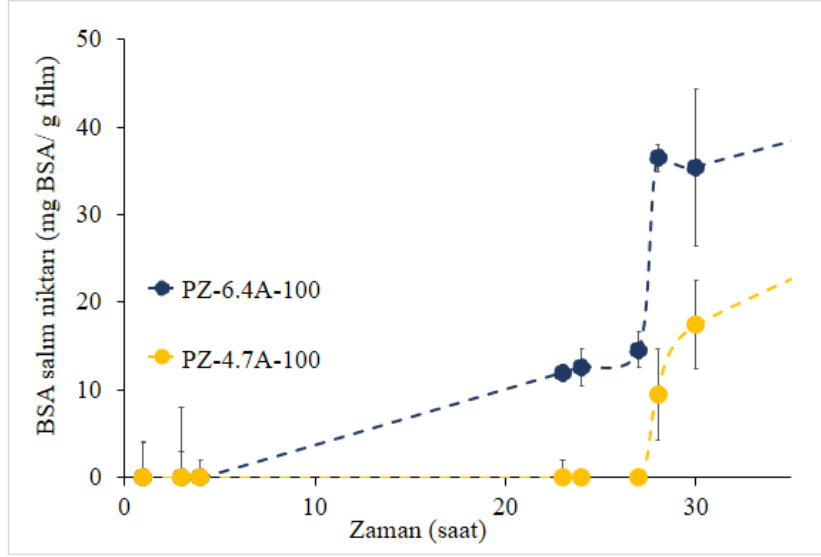
pH 6,4 tris TRIS tampon çözelti ortamına seçilmiş pektin ve pektin-zeolit hidrojellerinden BSA salım miktarı Şekil 8.13'te verilmiştir. Salım miktarının yükleme metodu (karıştırma veya adsorpsiyon) ve başlangıç BSA konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilendiği belirlenmiştir. Adsorpsiyon metoduyla hazırlananlarda, düşük başlangıç BSA konsantrasyonlarında (PZ-A6.4-10; 10 mg g⁻¹ film, PZ-A6.4-25; 25 mg g⁻¹ film), BSA moleküllerinin yaklaşık tamamı yüklendiği halde hiç salım olmamıştır. Bu durumun yeterli itici gücün eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşın yüksek BSA derişimlerinde hazırlanan A6.4-50 (50 mg g film⁻¹ BSA) ve A6.4-100 (100 mg g.film⁻¹ BSA) hidrojel fimlerinde adsorplanan proteinin çoğu çözeltiye salınabilmiştir. Karıştırma metodu ile hazırlanan hidrojel fimler, adsorpsiyon filmlerine göre daha düşük ilaç salımı yapabilmiştir: M6.4-100 formülasyonu 41 mg g⁻¹ film, M6.4-75 filmi ise 23 mg g⁻¹ film BSA salabilmiştir. Bu değerler, başlangıç BSA konsantrasyonunun sırasıyla yaklaşık % 40 ve %30'una denk düşmektedir. Öte yandan, adsorpsiyon ile hazırlanan filmler yaklaşık olarak yüklenen BSA'nın tamamını salabilmişlerdir.



Şekil 8.13 : Pektin-zeolit hidrojenlerinden BSA salımı.

Polimerik sistemin şişme oranı ve ilaç salım performansı arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. Adsorpsiyon ve karıştırma yöntemleriyle hazırlanan örnekler arasındaki salım miktarı farkı, bu iki metotta BSA'nın adsorplandığı yüzeylerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Adsorpsiyon metodunda, BSA difüzyonu öncelikle hidrojele doğru olmakta; BSA molekülleri ilk olarak pektin molekülleri ile karşı karşıya kalmaktadır. Buna karşın karıştırma metoduyla hazırlanan filmlerde ise BSA ilk olarak zeolit partikülleri yüzeyine yüklenmekte, ardından BSA yüklü bu çekirdek kısım pektin çözeltisi ile karıştırılmaktadır.

Farklı pH'larda yüklenen BSA çözeltilerinin ilaç salım profilleri benzerlik sergilemiştir (Şekil 8.14). Aralarındaki en belirgin fark gecikme zamanıdır. pH 6,4 ortamında hazırlanmış hidrojel filmler, pH 4,7 ve pH 4,3 ortamında hazırlananlara göre daha fazla miktarda BSA salımı gerçekleştirmiştir. Bu, pH 6,4 ortamında şişme oranının daha düşük pH' lara göre daha fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra, BSA yük dağılımı dikkate alındığında, pH 6,4 ortamında pH 4,7 ve pH 4,3'e göre daha fazla nötr bölgeler bulunmaktadır. Bu bölgeler sayesinde, kolaylıkla hidrojel filminden ayrılarak dışarı doğru difüze olabilirler.

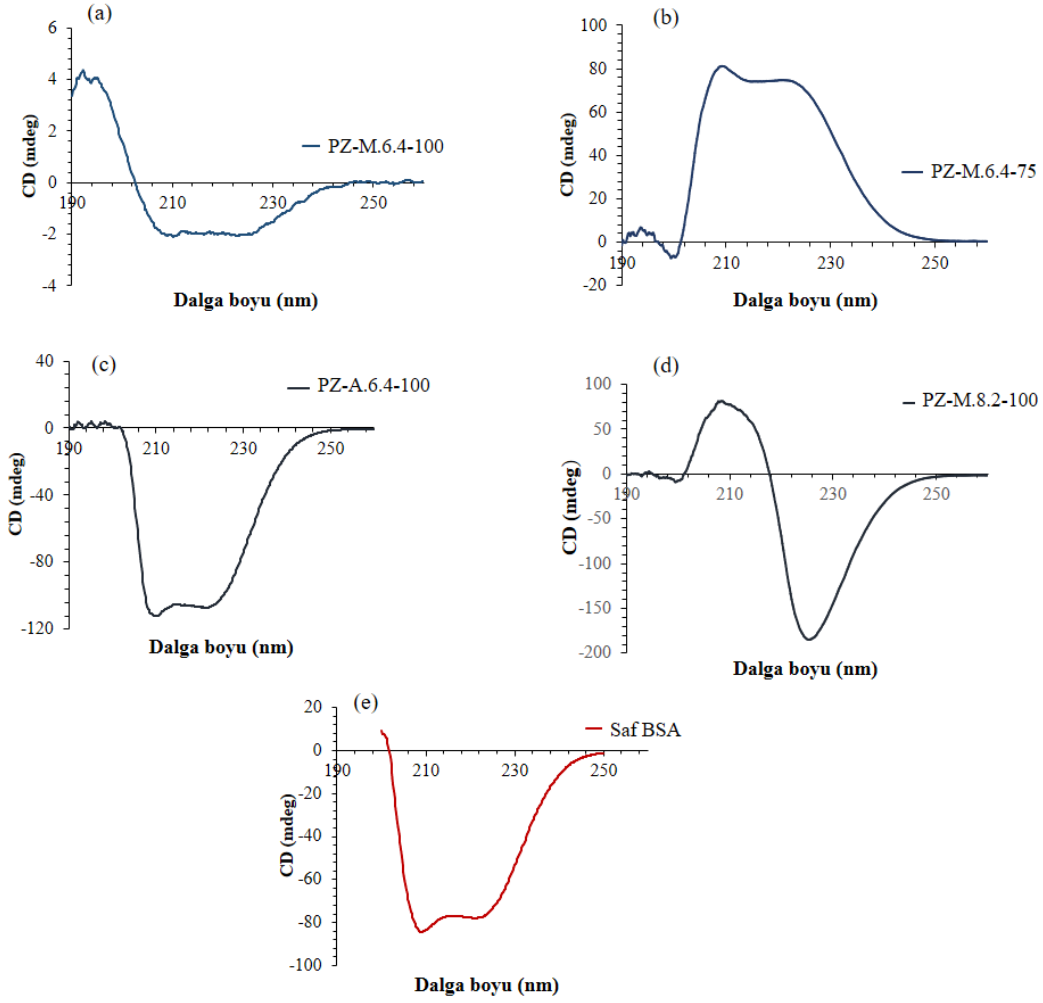


Şekil 8.14 : PZ-A6.4-50 ve PZ-A4.7-50 hidrojellerinden BSA salım profili.

8.3.7 CD spektrofotometre analizi

CD (Circular dichroism) analizi, hidrojellere yüklü BSA moleküllerinin dış ortama salımı esnasında, olası ikincil yapı bozunmasını belirlemek amacıyla yapılmıştır. BSA molekülündeki ikincil yapı değişiklikleri 250-190 nm aralığındaki uzak-UV CD ile izlenmiştir. CD analizi ile hem adsorpsiyon hem de karıştırma metodu ile hazırlanan hidrojellerden tampon çözeltiye salınan BSA moleküllerinde oluşacak yapısal değişikliklere pH ve konsantrasyon değişikliklerinin de etkisi gözlenmiştir.

BSA molekülü, uzak-UV bölgesinde 208 nm (içerdiği yüksek oranda ikincil yapı alfa-helikslardan dolayı) ve 222 nm (aromatik rezidülerinden dolayı) civarında belirgin bir elips şekline sahip, iki negatif bant ile karakterize edilmektedir (Şekil 8.15) [502]. Bu yapının korunmuş olması, proteinin ikincil yapısının korunduğunu ve büyük olasılıkla üçüncül yapıda da bozulma olmayarak BSA'nın hidrojel filmlerden dış ortama salınırken biyolojik aktivitesinin korunmuş olacağına işaret etmektedir. Şekil 8.15'te da görüldüğü gibi, BSA molekülleri pH 6,4 TRIS tampon çözeltisi ortamına M8.2-100 ve M6.4-75 hidrojel filmlerinden salınırken ikincil yapısını koruyamazken, pH 6,4 ortamında adsorpsiyon ve karıştırma metotları ile hazırlanmış A6.4-100 ve M6.4-100 filmlerinden salınan BSA, karakteristik alfa-heliks bandını vererek, ikincil yapısında herhangi bir bozunma olmadığını göstermiştir.



Şekil 8.15 : Saf BSA ve hidrojellerden salınan BSA'nın CD-UV spektraları; (a) PZ-M6.4-100; (b) PZ-M6.4-75; (c) PZ-A6.4-100; (d) PZ-M8.2-100 (e) Saf BSA.

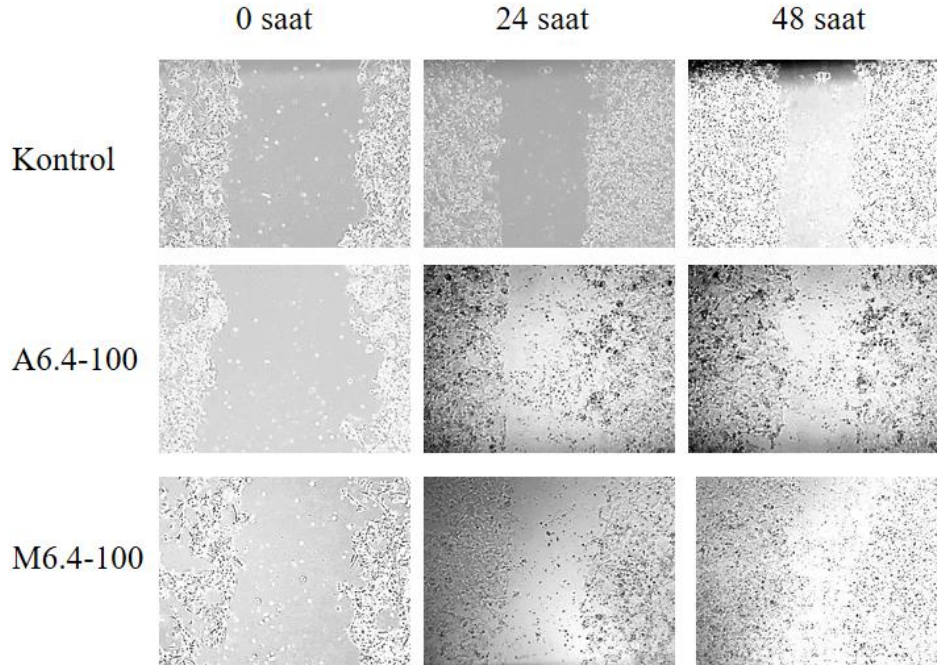
Literatürde albümin ve metal komplekslerin çoğunlukla proteinin ikincil yapısını bozabileceği belirtilmiştir. Ca iyonları BSA molekülü ile pH 6,5 – 8,5 arasında daha kuvvetli olarak bağlanmaktadır [503]. Elde edilen sonuçlara göre hem karıştırma hem de adsorpsiyon ile hazırlanan 100 mg BSA içeren (A6.4-100, M6.4-100) numunelerdeki BSA, dış ortama (pH 6,4 TRIS tampon çözeltisi) salınırken ikincil yapısını koruduğu belirlenmiştir (Şekil 8.16a). Buna karşın, pH 8,2 ortamında hazırlanan karıştırma numunesi M8.2-100 karakteristik alfa-heliks pikini vermemiştir (Şekil 8.16b). Bunun, pH 8,2 koşulunda pektin zincirlerindeki fazla miktardaki deproton olmuş COO^- gruplarından dolayı oluşan iyon-iyon itme kuvvetlerinin etkisi ile oluşan yüksek orandaki hareketlilikten ve olası Ca-BSA etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Daha az miktarda BSA içeren pH 6,4 ortamında karıştırma metodu ile hazırlanmış filmler (75, 50, and 25 mg BSA g^{-1} film) saf BSA molekülünün kiral pikini vermiştir.

100 mg BSA içeren aynı koşullarda hazırlanmış filmlerdeki BSA molekülleri ikincil yapılarını koruyarak dış ortama salınacağı halde, daha az BSA içeren filmlerde bu yapının korunamaması, BSA konsantrasyonu düşüklüğünden dolayı, yumuşak yapılı BSA'nın tutunduğu yüzeyde daha geniş bir ortama yayılmasıyla açıklanabilir. Oluşan bozulmanın kiral yapı vermesi ve bunun nedenleri daha detaylı bir çalışma ile açıklanmalıdır.

8.3.8 *In vitro* yara iyileşme analizi

In vitro yara iyileşmesi analizleri Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı laboratuvarlarında Doç. Dr. Saime Batırel tarafından yapılmıştır. Analiz, ilaç salım profilleri kontrollü salım profilen uyan ve CD-UV analizleri ile BSA molekülünü dış ortama katlı yapısını bozmadan saldığı belirlenen A.6.4-100 ve M6.4-100 hidrojellerine uygulanmıştır. Şekil 8.16'da görüldüğü gibi, 48 ve 72 saat inkübasyon periyotları esnasında bütün gruptaki hücreler yaralı bölgeye doğru göç etmişlerdir. Bu, hem karıştırma hem de adsorpsiyon metodu ile hazırlanmış 100 mg BSA içeren hidrojel filmlerin, hücrelerin migrasyonuna etki etmediği ve fibroblast hücreleri üzerinde toksik bir etki göstermediğini belirtmektedir.



Şekil 8.16 : A6.4-100 ve M6.4-100 filmleri *in vitro* yara iyileşmesi analizleri.

8.4 Vargılar

BSA'nın polimer yüzeyine adsorblanmasına etki eden parametreler listelenmiş ve her bir parametrenin ayırt edici özellikleri hesaplamalı çalışma ve deneyler yardımıyla açıklanmış, sonuçlar literatür ile de desteklenmiştir.

1. Amfoterik BSA moleküllerinin pozitif ve negatif yüklerinin heterojen olarak dağılması. Burada aynı zamanda BSA ve polimerin zıt yüklü bölümlerinin arasındaki mesafe de aradaki etkileşime etki etmektedir.
2. Proteinlerin pH' a bağlı çözünürlüğü [504].
3. Pektin zincirlerindeki COO^- gruplarının pH' a bağlı deprotonasyon sayısı, ve buna bağlı olarak şişme davranışı ve yüzey pürüzlülüğündeki değişim [2].
4. BSA ve pektin molekülleri ile etkileşen Ca katyonu sayısı. Bu sayı her iki polimerdeki negatif yüklü rezidülerin sayısı ile değişiklik göstermektedir.
5. Katyon-pi etkileşimleri [505].
6. Zeolit partiküllerinin pH'a bağımlı dekompozisyonu [506].

Pektin-zeolit hidrojellere pH 6.4 ortamında adsorbsiyon metoduyla yüklenen albümin molekülleri, kontrollü bir şekilde, katlı yapılarını bozmadan dış ortama salınabilmişlerdir. Bu sonuç, bu koşullarda hazırlanan albümin yüklü pektin-zeolit hidrojellerinin albümini yara ortamına biyoaktivitesini koruyarak salabileceğinin bir göstergesi olduğu gibi aynı zamanda pektin-zeolit hidrojelin yara sıvısından adsorblayacağı büyüme faktörlerinin de yarılanma ömürlerini uzatabileceğine işaret etmektedir.

9. SONUÇLAR

Günümüzde, diyabet gibi çeşitli hastalıkların neden olduğu kronik yaralar, hızla yaşlanan nüfus, trafik kazaları ve cerrahi prosedürlerin artışı ile etkili gelişmiş yara örtülerine olan gereksinim gittikçe artmaktadır. Gelişmiş bir yara örtüsü, öncelikle kanı hızlı bir şekilde tutabilmeli, mükemmel biyouyumluluk ile beraber bakteri kolonizasyonunu engellemeli, biyoadeziv olmalı, fazla eksudayı absorbe edebilmeli, uygun su buharı ve oksijen geçirgenliği oranı ile de iyileşmeyi hızlandırmalıdır. Aynı zamanda, hasta ve hasta yakınları için konforlu bir kullanıma sahip olması, mekanik dayanıklılık, uzun raf ömrü, uygun maliyet ve biyobozunurluk da bir yara örtüsü malzemesinde aranan önemli özelliklerdendir. Bütün bunların yanı sıra tedavi için gerekli olan aktif ajanları kontrollü bir şekilde salabilmesi modern bir yara örtüsünün aranan özellikleri arasındadır. Ancak, mevcut gelişmiş yara örtülerinin çoğu oldukça yüksek maliyetli olup, yukarıda sayılan özelliklerden çok azını bir arada içermektedir. Bu nedenle, tüm aranan özellikleri bir arada barındıran, düşük maliyetli gelişmiş yara örtülerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu motivasyonla, bu tez çalışması kapsamında *in siliko* ve *in vitro* yöntemlerin beraber kullanıldığı bir yaklaşımla bir atık veya yan ürün olan pektin polimeri temelli yara örtüsü olarak kullanılabilecek hidrojeller geliştirilmiştir. Biyouyumlu ve antibakteriyel olan yara örtüsü formundaki pektin hidrojellerin yüklenmiş ilaç veya proteini katlı yapılarını bozmadan dış ortama kontrollü salabildiği gösterilmiştir. Zeolit katkılı pektin hidrojellerin piyasadaki muadiline göre yara iyileşmesi için gereken yüksek oksijen, su buharı geçirgenliği ve iyi su tutma kapasitesine sahip olduğu, yara iyileşmesini hızlandıracak daha fazla asidik ortam oluşturduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda bu çalışmalar esnasında malzemelerin *in vitro* karakterizasyonu, reolojik analizleri, aktif ajan yükleme/salım çalışmaları, hücre analizleri ve moleküler modelleme çalışmaları ile özellikle karbonhidrat sistemlerin etkileşimleri moleküler ve sistem seviyesinde incelenmiştir.

Bu çalışma ile;

1. Tüm-atom moleküler dinamik (MD) simülasyonlarını kullanılarak, düşük metoksil (LM)-pektin yapısının yanı sıra, daha kuvvetli antienflamatuvar özelliğe

sahip olan yüksek metoksil (HM)-pektin yapısının da hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimlerin desteğiyle, Ca^{2+} iyonu varlığında, kontrollü salım için stabil bir kompleks oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

2. Pektin hidrojelinde hedeflenen ilaç salım hızına göre tek katlı veya çok katlı olarak farklı hazırlama metotları ile (adsorbsiyon, şişme ve karıştırma) hazırlanabileceği ve ilaç salımı yapabileceği gösterilmiştir.
3. MD simülasyonları ile pektin hidrojelden kontrollü salım yapılabilen ilaç konsantrasyonlarını tahmin edebilmek için genel bir metodoloji geliştirilmiştir. Bu amaçla,
 - Farklı ilaç konsantrasyonlarındaki çapraz bağlı pektin polimerlerin, özellikle çapraz bağlı GAL çiftlerine odaklanarak, global ve lokal dinamik davranışları incelenmiştir.
 - PGAL zincirlerinin yapı esnekliğinin belli bir noktaya kadar ilaç konsantrasyonu artışıyla arttığı belirlenmiş, rezidülerin lokal hareketlerinin hidrojel ağ yapısının degradasyona etkisi öngörülmüştür.
 - Hesaplamalardan yapılan öngörülerin doğruluğu ilaç yüklü pektin hidrojellere *in vitro* standart karakterizasyon protokolleri ile gösterilmiştir.
 - Artan ilaç konsantrasyonu ile ilaç moleküllerinin, çapraz bağlı zincirlerin arasına penetre olarak bir plastikleştirici gibi davranıp, zincirlerin hareketliliği ve buna bağlı olarak zincirlerin arasındaki mesafeyi arttırarak çapraz bağlanmanın bozulmasına neden olduğu önerilmektedir.

Tez çalışmasında uygulanan bu hesaplamalı yaklaşım, benzer polimer sistemlere de uygulanabilir. Buna göre, kontrollü salımı koruyan ilaç konsantrasyonu aralığı veya patlama salımına yol açan kritik konsantrasyon tahmin edilerek, kontrollü verime sahip sistemlerin tasarımında kullanılabilir.

4. İyonotropik jelleşme metodu ile pektin temelli, homeostatik özelliği bilinen Na-zeolit veya Zn-zeolit katkılı hidrojeller hazırlanarak, hidrojel yapısı ve ilaç salımı arasındaki

ilişkiyi belirlemek amacıyla başlıca; (i) hazırlama metodu, (ii) çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, (iii) zeolit konsantrasyonu ve (iv) zeolite bağlı iyon cinsi olmak üzere dört farklı tasarım parametresi üzerinde çalışılmış, ve her bir parametrenin malzemenin ilaç salım performansına etkisi ayrı ayrı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

- Zeolit A partikülleri, hidrojel stabilitesi ve oksijen geçirgenlik hızını arttırmıştır.
- Zeolit A partiküllerinin ilaç deposu olarak kullanılması salımı daha kontrollü hale getirmiştir.
- Pektin-zeolit hidrojellerin ilaç salım profilini, hidrojin şişme davranışı ve matriks içi ve dışı iyon dinamiği yönetmektedir.
- Zn-zeolit hidrojeller, yara tedavisinde önemli etkileri olduğu bilinen Zn iyonlarını dış ortama salabilmektedir.
- Sentezlenen hidrojeller hücre büyümesini desteklemekte ve *E.coli* ve *S.aureus*'a karşı antibakteriyel özellik göstermektedir.

5. Tez çalışmasında ayrıca serum albümin yüklü pektin-zeolit hidrojeller geliştirilmiştir. Bu hidrojeller, yüksek kanamalı cerrahi operasyon veya yaralanmalar ile yanık yaralarında önemli bir problem olan, aynı zamanda kalp krizi, kanser ve COVID-19 nedeniyle gelişebilen serum albümin eksikliği yaşayan hastaların cerrahi operasyonları ve yaralanmalarında kullanılabilir. Bu çalışmalar esnasında serum albümin moleküllerinin polimer yüzeyine adsorblanmasına etki eden parametreler listelenmiş ve her bir parametrenin ayırt edici özellikleri hesaplamalı çalışma ve deneyler yardımıyla açıklanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; (i) albümin moleküllerinin asimetrik yük dağılımı, (ii) albüminin pH'a bağlı çözünürlüğü, (iii) albümin ve pektin molekülleri ile etkileşen Ca^{2+} katyonu sayısı ve (iv) zeolit partiküllerinin pH bağımlı dekompozisyonu, albümin moleküllerinin pektin-zeolit hidrojeline adsorbsiyon veriminde etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda pH 6,4 ortamında hazırlanan 100 mg.g⁻¹ film albümin yüklü pektin hidrojin, yapısında immobilize olmuş albümini kontrollü bir şekilde proteinin yapısını bozmadan dış ortama salabildiği belirlenmiştir. Bu çalışma temel alınarak, pektin hidrojellerin yara tedavisinin en önemli ajanlarından olan büyüme faktörlerinin yüklenmesi ve salınması için uygun bir sistem oluşturduğu ön görülmektedir.

Gelecek alışmalar

Gerçekleştirilen *in vitro* deneyler ile, piyasadaki muadillerinden yara iyileşmesi bakımından daha üstün olduğu belirlenen pektin-zeolit yara örtülerinin, matriks içine bakteri sensörü tasarımı, ve ardından *in vivo* deneylerinin gerçekleştirilmesiyle katma değeri yüksek ve sağlık sektöründe yara bakım maliyetlerini azaltan ürünlerin üretilmesi için ürün formülasyonları geliştirilmesi planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] **Ninan N, Muthiah M, Park I-K, Wong TW, Thomas S, Grohens Y.** (2015). Natural Polymer/Inorganic Material Based Hybrid Scaffolds for Skin Wound Healing. *Polymer Reviews*, 55, 453-90.
- [2] **Kocaaga B, Kurkcuoglu O, Tatlier M, Batirel S, Guner FS.** (2019). Low-methoxyl pektin-zeolite hydrogels controlling drug release promote in vitro wound healing. *Journal of Applied Polymer Science*, 47640-47656.
- [3] **Ostomel TA, Shi Q, Stoimenov PK, Stucky GD.** (2007). Metal Oxide Surface Charge Mediated Hemostasis. *Langmuir*, 23, 11233-11241.
- [4] **Xu R, Luo G, Xia H, He W, Zhao J, Liu B, Tan J, Zhou J, Liu D, Wang Y, Yao Z, Zhan R, Yang S.** (2015). Biomaterials Novel bilayer wound dressing composed of silicone rubber with particular micropores enhanced wound re-epithelialization and contraction. *Biomaterials*, 40, 1-11.
- [5] **Sinno H, Prakash S.** (2013). Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plastic Surgery International*. 1-7.
- [6] **W.D. James, T.G. Berger, and D.M. Elston,** Diseases of the Skin: Clinical Dermatology (10th ed., p. 1), Philadelphia: Elsevier Saunders. Copyright 2006 by Elsevier Saunders .
- [7] **Tavakoli S, Klar AS.** (2020). Advanced hydrogels as wound dressings. *Biomolecules*. 10, 1–20.
- [8] **Borkow G, Gabbay J, Zatzoff RC.** (2008). Could chronic wounds not heal due to too low local copper levels? *Medical Hypotheses*. 70, 610–3.
- [9] **Torres FG, Commeaux S, Troncoso OP.** (2013). Starch-based biomaterials for wound-dressing applications. *Starch/Staerke*. 65, 543–51.
- [10] **Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM.** (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems : A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97, 2892–923.
- [11] **Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT.** (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*. 453, 314–21.
- [12] **Frykberg RG, Banks J.** (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances In Wound Care*, 4, 1–23.

- [13] **Dhivya S, Padma VV, Santhini E.** (2015). Wound dressings - A review. *BioMedicine (Netherlands)*. 5, 24–8.
- [14] **Szycher M, Lee SJ.** (1992). Modern Wound Dressings : A Systematic Approach to. *Journal of Biomaterials Applications*, 7, 142-210.
- [15] **Xu Z, Han S, Gu Z, Wu J.** (2020). Advances and Impact of Antioxidant Hydrogel in Chronic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*. 9, 1–11.
- [16] **DesJardins-Park HE, Mascharak S, Chinta MS, Wan DC, Longaker MT.** (2019). The spectrum of scarring in craniofacial wound repair. *Frontiers in Physiology*. 10, 1–14.
- [17] **Sheldon IM, Cronin JG, Pospiech M, Turner ML.** (2018). Symposium review: Mechanisms linking metabolic stress with innate immunity in the endometrium¹. *Journal of Dairy Science*. 101, 3655–64.
- [18] **Mavrogenis AF, Antoniadou T, Dimopoulos L, Sfyroeras GS, Lazaris A.** (2018). Foot & Ankle Current concepts for the evaluation and management of diabetic foot ulcers. *EFORT*, 3, 514-521.
- [19] **Posnett J, Franks PJ.** (2008). The burden of chronic wounds in the UK. *Nursing times*. 104, 44–5.
- [20] **Jc D, Ba L, Hoey C, Cruciani M, Fiscon M, Xia J.** Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes Copyright © 2017 The Cochrane Collaboration. Published by John Wiley & Sons, Ltd.
- [21] **Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S,** (2015). Burn wound healing and treatment : review and advancements. *Critical Care*. *Critical Care*; 1–12.
- [22] **Soedjana H, Bowo SA, Putri NM, Davita TR.** (2020). Serum albumin level difference in burn injury after tangential excision: A prospective cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*. Elsevier; 52, 1–4.
- [23] **Bus SA,** (2017). Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. 2367–75.
- [24] **Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S.** (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*. 169–80.
- [25] **Boykin J V., Hoke GD, Driscoll CR, Dharmaraj BS.** (2020). High-dose folic acid and its effect on early stage diabetic foot ulcer wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 28, 517–25.
- [26] **Raviglione A, Reif R, Macagno M, Vigano D, Schram J, Armstrong D.** (2017). Real-Time Smart Textile-Based System to Monitor Pressure Offloading of Diabetic Foot Ulcers. *J. of Diabetes Science and Technology*. 3–7.

- [27] **Aldana PC, Khachemoune** (2020). A. Diabetic Foot Ulcers: Appraising Standard of Care and Reviewing New Trends in Management. *American J. of Clinical Dermatology*. 21, 255–64.
- [28] **Bessa LJ, Fazii P, Giulio M Di, Cellini L.** (2013). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern : some remarks about wound infection. *International Wound Journal*. 1–6.
- [29] **Patel H, Bonde M, Srinivasan G.** (2011). Biodegradable Polymer Scaffold for Tissue Engineering. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 25, 20-29.
- [30] **Mishra RK, Majeed B , Banthia K.** (2011). Development and characterization of pektin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *International Journal of Plastics Technology*. 15, 82–95.
- [31] **Pereira RF, Mendes A, Bártolo PJ.** (2013). Novel alginate/aloe vera hydrogel blends as wound dressings for the treatment of several types of wounds. *Chemical Engineering Transactions*. 32, 1009–14.
- [32] **Opt Veld RC, Walboomers XF, Jansen JA, Wagener FADTG.** (2020). Design Considerations for Hydrogel Wound Dressings: Strategic and Molecular Advances. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 26, 230–48.
- [33] **Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E, Mehrabian A, Feily A.** (2014). Skin wound healing and phytomedicine: A review. *Skin Pharmacology and Physiology*. 27, 303–10.
- [34] **Rossaint J, Margraf A, Zarbock A.** (2018). Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front. Immunol*. 9, 1–13.
- [35] **Emmerson E.** (2010). The role of estrogen and MIF in cutaneous wound healing. 1–364.
- [36] **Yang Y, Wu W, Liu H, Xu H, Zhong Y, Zhang L.** (2020). Aggregation behaviors of thermo-responsive methylcellulose in water: A molecular dynamics simulation study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 97, 107554.
- [37] **Kuznetsova TA, Andryukov BG, Besednova NN, Zaporozhets TS, Kalinin A V.** (2020). Marine algae polysaccharides as basis for wound dressings, drug delivery, and tissue engineering: A review. *Journal of Marine Science and Engineering*. 8.
- [38] **Davis SC, Ricotti C, Cazzaniga A, Welsh E, Eaglstein WH, Mertz PM.** (2008). Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo. *Wound Repair and Regeneration*. 23–9.
- [39] **Slaughter B V., Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA.** (2009). Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials*. 21, 3307–29.

- [40] **Liu X, Yang Y, Niu X, Lin Q, Zhao B, Wang Y.** (2017). An in situ photocrosslinkable platelet rich plasma – Complexed hydrogel glue with growth factor controlled release ability to promote cartilage defect repair. *Acta Biomaterialia*. 62, 179–87.
- [41] **Lord MS, Ellis AL, Farrugia BL, Whitelock JM, Grenett H, Li C.** (2017). Perlecan and photocrosslinkable platelet rich plasma – Complexed hydrogel glue with growth factor controlled release ability to promote cartilage defect repair. *Acta Biomaterialia*. 2017;62:179–87. vascular endothelial growth factor-encoding DNA-loaded chitosan scaffolds promote angiogenesis and wound healing. *Journal of Controlled Release*. 250, 48–61.
- [42] **Laiva AL, O'Brien FJ, Keogh MB.** (2018). Innovations in gene and growth factor delivery systems for diabetic wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 12:e296–312.
- [43] **Shamloo A, Sarmadi M, Aghababaie Z, Vossoughi M.** (2018). Accelerated full-thickness wound healing via sustained bFGF delivery based on a PVA/chitosan/gelatin hydrogel incorporating PCL microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 537, 278–89.
- [44] **Augustine R, Hasan A, Dalvi YB, Rehman SRU, Varghese R, Unni RN,** (2021). Growth factor loaded in situ photocrosslinkable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/gelatin methacryloyl hybrid patch for diabetic wound healing. *Materials Science and Engineering C*. 118, 111519.
- [45] **Zhu J, Jiang G, Hong W, Zhang Y, Xu B, Song G.** (2020). Rapid gelation of oxidized hyaluronic acid and succinyl chitosan for integration with insulin-loaded micelles and epidermal growth factor on diabetic wound healing. *Materials Science and Engineering C*. 117, 111273.
- [46] **Mustoe TA, Purdy J, Gramates P, Deuel TF, Thomason A, Pierce GF.** (1989). Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB. *The American Journal of Surgery*. 158, 345–50.
- [47] **Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF.** (1987). Accelerated healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor- β . *Science*. 237, 1333–6.
- [48] **Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N.** (2004). Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *American Journal of Pathology* 164, 1935–47.

- [49] **Zhang F, Lei MP, Oswald TM, Pang Y, Blain B, Cai ZW.** (2003). The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *British Journal of Plastic Surgery*. 56, 334–41.
- [50] **Raeder K, Jachan DE, Müller-Werdan U, Lahmann NA.** (2020). Prevalence and risk factors of chronic wounds in nursing homes in Germany. *International Wound Journal*. 17, 1128–34.
- [51] **Edwards JV, Howley P, Davis R, Mashchak A, Goheen SC.** (2007). Protease inhibition by oleic acid transfer from chronic wound dressings to albumin. *International Journal of Pharmaceutics*. 340, 42–51.
- [52] **Han W, Meng Y, Hu C, Dong G, Qu Y, Deng H.** (2017). Mathematical model of Ca^{2+} concentration, pH, pektin concentration and soluble solids (sucrose) on the gelation of low methoxyl pektin. *Food Hydrocolloids*. 66, 37–48.
- [53] **Guo S, DiPietro L.** (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*. 219–29.
- [54] **Salazar JJ, Ennis WJ, Koh TJ, PT NU SC.** (2016). Diabetes Medications: Impact on Inflammation and Wound Healing. *Journal of Diabetes and Its Complications* 30, 746-752.
- [55] **Okonkwo UA, Dipietro LA.** (2017). Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1–15.
- [56] **Malone-Povolny MJ, Maloney SE, Schoenfisch MH.** (2019). Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*. 8, 1–18.
- [57] **Vural F, Savci A.** (2017). Yara Bakımında Yeni Uygulamalar New Practices in Wound Care. *Türkiye Klinikleri J Surg Nurs-Special Topics*. 3(3):224-32.
- [58] **Aslıhan Hilal; KARATAŞ K.** (2009). Yara tedavisinde güncel yaklaşımlar: modern yara örtüleri. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 38, 211–32.
- [59] **Ovington LG.** (2002). The Evolution of Wound Management. Home Healthcare Nurse: *The Journal for the Home Care and Hospice Professional*. 20, 652–6.
- [60] **Elgohary M.** (2006). Al Zahrawi: The Father of Modern Surgery. *Annals of Pediatric Surgery* 2, 82–7.
- [61] **Efe Z. Şerefeddin Sabuncuoğlu,** (2019). Cerrahiyetü'l-Haniyye, Hazırlayan: İlter Uzel, 2 Cilt. (Ankara: Türk Tarih Kurumu Yayınları 1992). *e-Şarkiyat İlmi Araştırmaları Dergisi/Journal of Oriental Scientific Research (JOSR)*. 2, 1058–62.
- [62] **Bekraki A, Görkey Ş, Aktan AÖ.** (2000). Anal surgical techniques in early ottoman period performed by şerefeddin sabuncuoğlu. *World Journal of Surgery*. 24, 130–2.

- [63] **Devrimler B, Revolutions S.** (2002). İbn-İ Sinâ ' Nın Bilim Tarihindeki Yeri : Kuhn ' Ca Bir Yaklaşımla. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 55, 115–22.
- [64] **Broughton G, Janis JE, Attinger CE.** (2006). A brief history of wound care. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 117, 6–11.
- [65] **Paul W, Sharma CP.** (2004). Chitosan and Alginate Wound Dressings : A Short Review. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*. 18, 18–23.
- [66] **Smith AM, Moxon S, Morris GA.** (2016). Biopolymers as wound healing materials. *Wound Healing Biomaterials*.
- [67] **Staudinger H. Hermann Staudinger.** (1953). Nobel Lecture: Macromolecular Chemistry. *Nobel Lecture* .
- [68] **Agarwal A, McAnulty JF, Schurr MJ, Murphy CJ, Abbott NL.** (2011). Polymeric materials for chronic wound and burn dressings. *Advanced Wound Repair Therapies*. 186–208.
- [69] **Okan D, Woo K, Ayello EA, Sibbald G.** (2007). The role of moisture balance in wound healing. *Advances in skin & wound care*. 20, 39–53.
- [70] **Cameron Hinman HM.** (1963). Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds. *Nature*. 293.
- [71] **Miraftab M, Qiao Q, Kennedy JF, Anand SC, Grocock MR.** (2003). Fibres for wound dressings based on mixed carbohydrate polymer fibres. *Carbohydrate Polymers*. 53, 225–31.
- [72] **Klar AS, Güven S, Biedermann T, Luginbühl J, Böttcher-Haberzeth S, Meuli-Simmen C.** (2014). Tissue-engineered dermo-epidermal skin grafts prevascularized with adipose-derived cells. *Biomaterials*. 35, 5065–78.
- [73] **Klar AS, Michalak-Mińska K, Biedermann T, Simmen-Meuli C, Reichmann E, Meuli M.** (2018). Characterization of M1 and M2 polarization of macrophages in vascularized human dermo-epidermal skin substitutes in vivo. *Pediatric Surgery International*. 34, 129–35.
- [74] **Solati K, Karimi M, Rafieian-Kopaei M, Abbasi N, Abbaszadeh S, Bahmani M.** (2020). Phytotherapy for Wound Healing: The Most Important Herbal Plants in Wound Healing Based on Iranian Ethnobotanical Documents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 21, 500–19.
- [75] **Ciobanu G, Carja G, Ciobanu O.** (2007). Preparation and characterization of polymer-zeolite nanocomposite membranes. *Materials Science and Engineering C*. 27, 1138–40.
- [76] **Jain A, Paliwal V, Jain A, Lokesh D, Gupta A.** (2007). Evaluation of wound healing activity of herbal formulation. *Asian Journal of Chemistry*. 19, 1273–6.

- [77] **Vasile BS, Birca AC, Musat MC, Holban AM.** (2020). Wound dressings coated with silver nanoparticles and essential oils for the management of wound infections. *Materials*. 13, 1–13.
- [78] **Fahimi S, Abdollahi M, Mortazavi SA, Hajimehdipoor H, Hajimehdipoor H, Abdolghaffari AH.** (2015). Wound healing activity of a traditionally used poly herbal product in a burn wound model in rats. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 17.
- [79] **Pal RR, Parashar P, Singh I, Saraf SA.** (2019). Tamanu oil potentiated novel sericin emulgel of levocetirizine: repurposing for topical delivery against DNCB-induced atopic dermatitis, QbD based development and in vivo evaluation. *Journal of Microencapsulation*. 36, 432–46.
- [80] **Marzotto M, Arruda-Silva F, Bellavite P.** (2020). Fibronectin Gene Up-regulation by Arnica montana in Human Macrophages: Validation by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Homeopathy*. 109, 140–5.
- [81] **Givol O, Kornhaber R, Visentin D, Cleary M, Haik J, Harats M. A** (2019). Systematic review of Calendula officinalis extract for wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 27, 548–61.
- [82] **Süntar IP, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M.** (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of Hypericum perforatum L. *Journal of Ethnopharmacology*. 127, 468–77.
- [83] **Çobanoğlu A, Şendir M.** (2020). The effect of hypericum perforatum oil on the healing process in the care of episiotomy wounds: A randomized controlled trial. *European Journal of Integrative Medicine*. 34.
- [84] **Klass BR, Branford OA, Grobbelaar AO, Rolfe KJ.** (2010). The effect of epigallocatechin-3-gallate, a constituent of green tea, on transforming growth factor- β 1-stimulated wound contraction. *Wound Repair and Regeneration*. 18, 80–8.
- [85] **Tarameshloo M, Norouzian M, Zarein-Dolab S, Dadpay M, Mohsenifar J, Gazor R.** (2012). Aloe vera gel and thyroid hormone cream may improve wound healing in Wistar rats. *Anatomy & Cell Biology*. 45, 170.
- [86] **Tavares TD, Antunes JC, Padrão J, Ribeiro AI, Zille A, Amorim MTP.** (2020). Activity of specialized biomolecules against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antibiotics*. 9, 1–16.
- [87] **Ranzato E, Martinotti S, Burlando B.** (2011). Wound healing properties of jojoba liquid wax: An in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*. 134, 443–9.

- [88] **Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawahira K, Sakanaka M.** (2006). Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. *British Journal of Pharmacology*. 148, 860–70.
- [89] **Abu-Al-Basal MA.** (2010). Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 131, 443–50.
- [90] **Jandera V, Hudson DA, De Wet PM, Innes PM, Rode H.** (2000). Cooling the burn wound: Evaluation of different modalities. *Burns*. 26, 265–70.
- [91] **Lee YH, Chang JJ, Chien CT, Yang MC, Chien HF.** (2012). Antioxidant sol-gel improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental Diabetes Research*. 2012.
- [92] **Hu H, Xu FJ.** (2020). Rational design and latest advances of polysaccharide-based hydrogels for wound healing. *Biomaterials Science*. 8, 2084–101.
- [93] **Ulijn R V, Bibi N, Jayawarna V, Thornton PD, Todd SJ, Mart RJ.** (2007). Bioresponsive hydrogels We highlight recent developments in hydrogel materials with biological. Review *Literature And Arts Of The Americas*. 10, 40–8.
- [94] **Zhong Y, Xiao H, Seidi F, Jin Y.** (2020). Natural Polymer-Based Antimicrobial Hydrogels without Synthetic Antibiotics as Wound Dressings. *Biomacromolecules*. 21, 2983–3006.
- [95] **Stashak TS, Farstvedt E, Othric A, Verma S, Manjubala I, Narendrakumar U.** (2016). Protein and carbohydrate biopolymers for biomedical applications. *International Journal of PharmTech Research*. 9, 408–21.
- [96] **Stashak TS, Farstvedt E, Othric A.** (2004). Update on wound dressings: Indications and best use. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 3, 148–63.
- [97] **Sezer AD, Cevher E, Hatipoğlu F, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J.** (2008). Preparation of fucoidan-chitosan hydrogel and its application as burn healing accelerator on rabbits. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 31, 2326–33.
- [98] **Demir A, Cevher E.** (2011). Biopolymers as Wound Healing Materials: Challenges and New Strategies. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. 383 – 406.
- [99] **Rezvani Ghomi E, Khalili S, Nouri Khorasani S, Esmaeely Neisiany R, Ramakrishna S.** (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*. 136, 1–12.

- [100] **Hutmacher DW, David TW, Chen F.** (2005). Polysaccharides in Tissue Engineering Applications. *Handbook of Carbohydrate Engineering*. 29, 838 – 876.
- [101] **Stoica AE, Chircov C, Grumezescu AM.** (2020). Nanomaterials for Wound Dressings: An Up-to-Date Overview. *Molecules* (Basel, Switzerland). 25.
- [102] **Seixas FL, Turbiani FRB, Salomão PG, Souza RP, Gimenes ML.** (2013). Biofilms composed of alginate and pectin: Effect of concentration of crosslinker and plasticizer agents. *Chemical Engineering Transactions*. 32, 1693–8.
- [103] **Ge L, Xu Y, Li X, Yuan L, Tan H, Li D.** (2021). Fatty acid-based polyurethane films for wound dressing applications. *Macromolecular Symposia*. 6, 102160.
- [104] **Ozkaynak MU, Atalay-Oral C, Tantekin-Ersolmaz SB, Güner FS.** (2005). Polyurethane films for wound dressing applications. *Macromolecular Symposia*. 228, 177–84.
- [105] **Gholami H, Yeganeh H.** (2021). Soybean oil-derived non-isocyanate polyurethanes containing azetidinium groups as antibacterial wound dressing membranes. *European Polymer Journal*. 110142.
- [106] **Gulmez F, Yercan A, Kocaaga B, Guner FS.** (2021). pH-sensitive castor oil/PEG-based polyurethane films for drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 61, 102160.
- [107] **Hassan AA, Radwan HA, Abdelaal SA, Al-Radadi NS, Ahmed MK, Shoueir KR.** (2021). Polycaprolactone based electrospun matrices loaded with Ag/hydroxyapatite as wound dressings: Morphology, cell adhesion, and antibacterial activity. *International Journal of Pharmaceutics*. 593, 120143.
- [108] **Zhu J, Li F, Wang X, Yu J, Wu D.** (2018). Hyaluronic Acid and Polyethylene Glycol Hybrid Hydrogel Encapsulating Nanogel with Hemostasis and Sustainable Antibacterial Property for Wound Healing. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 10, 13304–16.
- [109] **Coindre VF, Hu Y, Sefton M V.** (2020). Poly-Methacrylic Acid Cross-Linked with Collagen Accelerates Diabetic Wound Closure. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 6, 6368–77.
- [110] **Kubera Sampath Kumar S, Prakash C, Subramanian S.** (2021). Study on Performance of Different Wound Dressings on Surgical Non Infected Wounds. *Journal of Natural Fibers* 18, 161–74.
- [111] **Ge L, Xu Y, Li X, Yuan L, Tan H, Li D.** (2018). Fabrication of Antibacterial Collagen-Based Composite Wound Dressing. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 6, 9153–66.

- [112] **Kamoun EA, Kenawy ERS, Chen X.** (2017). A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of Advanced Research. Cairo University*; 8, 217–33.
- [113] **Taylor MJ, Bentham RH, Ross KE.** (2014). Limitations of Using Propidium Monoazide with qPCR to Discriminate between Live and Dead *Legionella* in Biofilm Samples. *Microbiology Insights*. 15–24.
- [114] **Du Y, Li L, Peng H, Zheng H, Cao S, Lv G.** (2020). A Spray-Filming Self-Healing Hydrogel Fabricated from Modified Sodium Alginate and Gelatin as a Bacterial Barrier. *Macromolecular Bioscience*. 20, 1–11.
- [115] **Sezer AD, Hatipoğlu F, Cevher E, Oğurtan Z, Baş AL, Akbuğa J.** (2007). Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech* 8 (2).
- [116] **Zhu Y, Zhang J, Song J, Yang J, Du Z, Zhao W.** (2020). A Multifunctional Pro-Healing Zwitterionic Hydrogel for Simultaneous Optical Monitoring of pH and Glucose in Diabetic Wound Treatment. *Advanced Functional Materials*. 30, 1–9.
- [117] **Chen W, Zhu Y, Zhang Z, Gao Y, Liu W, Borjihan Q.** (2020). Engineering a multifunctional N-halamine-based antibacterial hydrogel using a super-convenient strategy for infected skin defect therapy. *Chemical Engineering Journal*. 379, 122238.
- [118] **Zhao X, Wu H, Guo B, Dong R, Qiu Y, Ma PX.** (2017). Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials*. 122, 34–47.
- [119] **Fan Z, Liu B, Wang J, Zhang S, Lin Q, Gong P.** (2014). A novel wound dressing based on Ag/graphene polymer hydrogel: Effectively kill bacteria and accelerate wound healing. *Advanced Functional Materials*. 24, 3933–43.
- [120] **Singh B, Dhiman A.** (2015). Designing bio-mimetic moxifloxacin loaded hydrogel wound dressing to improve antioxidant and pharmacology properties. *RSC Advances*. 5, 44666–78.
- [121] **Qu J, Zhao X, Liang Y, Zhang T, Ma PX, Guo B.** (2018). Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. *Biomaterials*. 183, 185–99.
- [122] **Madaghiele M, Sannino A, Ambrosio L, Demitri C.** (2014). Polymeric hydrogels for burn wound care: Advanced skin wound dressings and regenerative templates. *Burns & Trauma*. 2, 153.

- [123] **Hoffman AS.** (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 64, 18–23.
- [124] **Güner OZ, Cam C, Arabacioglu-Kocaaga B, Batirel S, Güner FS.** (2018). Theophylline-loaded pektin-based hydrogels. I. Effect of medium pH and preparation conditions on drug release profile. *Journal of Applied Polymer Science.* 135.
- [125] **Mathur AM, Moorjani SK, Scranton AB.** (1996). Methods for synthesis of hydrogel networks: A review. *Journal of Macromolecular Science - Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics.* 36, 405–30.
- [126] **Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R.** (2006) Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials.* 18, 1345–60.
- [127] **Michaels JA, Campbell WB, King BM, MacIntyre J, Palfreyman SJ, Shackley P.** (2009). A prospective randomised controlled trial and economic modelling of antimicrobial silver dressings versus non-adherent control dressings for venous leg ulcers: The VULCAN trial. *Health Technology Assessment.* 13, 1–114.
- [128] **Campbell KT, Stilhano RS, Silva EA.** (2018). Enzymatically degradable alginate hydrogel systems to deliver endothelial progenitor cells for potential revascularization applications. *Biomaterials.* 179, 109–21.
- [129] **Meng Y, Shi X, Cai L, Zhang S, Ding K, Nie S.** (2018). Triple-Helix Conformation of a Polysaccharide Determined with Light Scattering, AFM, and Molecular Dynamics Simulation. *Macromolecules.* 51, 10150–9.
- [130] **Li J, Li X, Ni X, Wang X, Li H, Leong KW.** (2006). Self-assembled supramolecular hydrogels formed by biodegradable PEO-PHB-PEO triblock copolymers and α -cyclodextrin for controlled drug delivery. *Biomaterials.* 27, 4132–40.
- [131] **Ghobril C, Grinstaff MW.** (2015). The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: A tutorial. *Chemical Society Reviews. Royal Society of Chemistry;* 44, 1820–35.
- [132] **Koehler J, Brandl FP, Goepferich AM.** (2018). Hydrogel wound dressings for bioactive treatment of acute and chronic wounds. *European Polymer Journal.* 100, 1–11.
- [133] **Jieling Li, a Ruirui Xing a SB and XY.** (2019). Recent Advances of Self-assembling Peptide-Based Hydrogels for 7 Biomedical Applications. *Soft Matter.* 15, 1704 - 1715.
- [134] **Wei Z, Yang JH, Liu ZQ, Xu F, Zhou JX, Zrínyi M,** (2015). Novel biocompatible polysaccharide-based self-healing hydrogel. *Advanced Functional Materials.* 25, 1352–9.

- [135] **Matricardi P, Di Meo C, Coviello T, Hennink WE, Alhaique F.** (2013). Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65, 1172–87.
- [136] **Layek B, Mandal S.** (2020). Natural polysaccharides for controlled delivery of oral therapeutics: a recent update. *Carbohydrate Polymers*. 230, 115617.
- [137] **Dragan ES, Dinu MV.** (2019). Polysaccharides constructed hydrogels as vehicles for proteins and peptides. A review. *Carbohydrate Polymers* 225, 115210.
- [138] **Serrano-Sevilla I, Artiga Á, Mitchell SG, De Matteis L, de la Fuente JM.** (2019). Natural polysaccharides for siRNA delivery: Nanocarriers based on chitosan, hyaluronic acid, and their derivatives. *Molecules*. 24.
- [139] **Li H, Wei X, Yi X, Tang S, He J, Huang Y.** (2021). Antibacterial, hemostasis, adhesive, self-healing polysaccharides-based composite hydrogel wound dressing for the prevention and treatment of postoperative adhesion. *Materials Science and Engineering C*. 123, 111978.
- [140] **Andryukov BG, Besednova NN, Kuznetsova TA, Zaporozhets TS, Ermakova SP, Zvyagintseva TN.** (2020). Sulfated polysaccharides from marine algae as a basis of modern biotechnologies for creating wound dressings: Current achievements and future prospects. *Biomedicines*. 8.
- [141] **Naseri-Nosar M, Ziora ZM.** (2018). Wound dressings from naturally-occurring polymers: A review on homopolysaccharide-based composites. *Carbohydrate Polymers*. 189, 379–98.
- [142] **Yang HS, Racine-Brzostek SE, Karbaschi M, Yee J, Dillard A, Steel PAD.** (2021). Testing-on-a-probe biosensors reveal association of early SARS-CoV-2 total antibodies and surrogate neutralizing antibodies with mortality in COVID-19 patients. *Biosensors and Bioelectronics*. 178, 113008.
- [143] **Patel DK, Dutta SD, Ganguly K, Lim KT.** (2021). Multifunctional bioactive chitosan/cellulose nanocrystal scaffolds eradicate bacterial growth and sustain drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 170, 178–88.
- [144] **Aderibigbe BA, Buyana B.** (2018). Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*. 10, 42.
- [145] **Martello F, Tocchio A, Tamplenizza M, Gerges I, Pistis V, Recenti R.** (2014). Acta Biomaterialia Poly (amido-amine) -based hydrogels with tailored mechanical properties and degradation rates for tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 10, 1206–15.

- [146] **Xua Q, Guob L, Sigen A, Gaoa Y, Zhoua D, Greisera U, Wanga B.** (2018). Injectable hyperbranched poly(β -amino ester) hydrogels with on- demand degradation profile to match wound healing process. *Chemical Science*. 9, 2179–2187.
- [147] **Chen S, Shi J, Xu X, Ding J, Zhong W, Zhang L.** (2016). Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Study of stiffness effects of poly (amidoamine)– poly (n -isopropyl acrylamide) hydrogel on wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 140, 574–82.
- [148] **Li X, Chen S, Li J, Wang X, Zhang J, Kawazoe N.** (2016). 3D Culture of Chondrocytes in Gelatin Hydrogels with Different Stiffness. *Polymers*. 8, 269.
- [149] **Sriamornsak P, Nunthanid J.** (1998). Calcium pektinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. *International Journal of Pharmaceutics*. 160, 207–12.
- [150] **Sriamornsak P.** (2003). Chemistry of pektin and its pharmaceutical uses: a review. *Silpakorn University International Journal*. 3, 207–28.
- [151] **Cao L, Lu W, Mata A, Nishinari K, Fang Y.** (2020). Egg-box model-based gelation of alginate and pektin: A review. *Carbohydrate Polymers*. 242, 116389.
- [152] **Costanza V, Bonanomi L, Moscato G, Wang L, Choi YS, Daraio C.** (2019). Effect of glycerol on the mechanical and temperature-sensing properties of pektin films. *Applied Physics Letters*. AIP Publishing LLC; 115.
- [153] **Löfgren C, Guillotin S, Evenbratt H, Schols H, Hermansson AM.** (2005). Effects of calcium, pH, and blockiness on kinetic rheological behavior and microstructure of HM pektin gels. *Biomacromolecules*. 6, 646–52.
- [154] **Powell DA, Morris ER, Gidley MJ, Rees DA.** (1982). Conformations and interactions of pektins. II. Influence of residue sequence on chain association in calcium pectate gels. *Journal of Molecular Biology*. 155, 517–31.
- [155] **Kirtil E, Oztop MH, Sirijariyawat A, Ngamchuachit P, Barrett DM, McCarthy MJ.** (2014). Effect of pektin methyl esterase (PME) and CaCl₂ infusion on the cell integrity of fresh-cut and frozen-thawed mangoes: An NMR relaxometry study. *Food Research International*. 66, 409–16.
- [156] **Renard CMGC, Jarvis MC.** (1999). Acetylation and methylation of homogalacturonans 2: Effect on ion-binding properties and conformations. *Carbohydrate Polymers*. 39, 209–16.

- [157] **Fraeye I, Duvetter T, Doungra E, Van Loey A, Hendrickx M.** (2010). Fine-tuning the properties of pectin-calcium gels by control of pectin fine structure, gel composition and environmental conditions. *Trends in Food Science and Technology*. 21, 219–28.
- [158] **Espitia PJP, Du WX, Avena-Bustillos R de J, Soares N de FF, McHugh TH.** (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. *Food Hydrocolloids*. 35, 287–96.
- [159] **Amirian J, Zeng Y, Shekh MI, Sharma G, Stadler FJ, Song J.** (2021). In-situ crosslinked hydrogel based on amidated pectin/oxidized chitosan as potential wound dressing for skin repairing. *Carbohydrate Polymers*. 251, 117005.
- [160] **Ghorbani M, Roshangar L, Soleimani Rad J.** (2020). Development of reinforced chitosan/pectin scaffold by using the cellulose nanocrystals as nanofillers: An injectable hydrogel for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 130, 109697.
- [161] **Li D qiang, Wang S ya, Meng Y jie, Li J fang, Li J.** (2020). An injectable, self-healing hydrogel system from oxidized pectin/chitosan/ γ -Fe₂O₃. *International Journal of Biological Macromolecules*. 164, 4566–74.
- [162] **Munarin F, Tanzi MC, Petrini P.** (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51, 681–9.
- [163] **Morris ER, Rees DA, Thom D, Boyd J.** (1978). Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation. *Carbohydrate Research*. 66, 145–54.
- [164] **Assifaoui A, Chambin O.** (2018). Pectin: Technological and Physiological Properties. *Springer*.
- [165] **Munarin F, Petrini P, Farè S, Tanzi MC.** (2010). Structural properties of polysaccharide-based microcapsules for soft tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21, 365–75.
- [166] **Munarin F, Guerreiro SG, Grellier MA, Tanzi MC, Barbosa MA, Petrini P.** (2011). Pectin-based injectable biomaterials for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*. 12, 568–77.
- [167] **Kaushik P, Priyadarshini E, Rawat K, Rajamani P, Bohidar HB.** (2020). pH responsive doxorubicin loaded zein nanoparticle crosslinked pectin hydrogel as effective site-specific anticancer substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*. 152, 1027–37.
- [168] **Munarin F, Giuliano L, Bozzini S, Tanzi MC, Petrini P.** (2010). Mineral phase deposition on pectin microspheres. *Materials Science and Engineering C*. 30, 491–6.

- [169] **Gazzi RP, Frank LA, Onzi G, Pohlmann AR, Guterres SS.** (2020). New pektin-based hydrogel containing imiquimod-loaded polymeric nanocapsules for melanoma treatment. *Drug Delivery and Translational Research. Drug Delivery and Translational Research*; 10, 1829–40.
- [170] **Clifford A, D’Elia A, Deering J, Lee BEJ, Grandfield K, Zhitomirsky I.** (2020). Electrochemical Fabrication and Characterization of Pektin Hydrogel Composite Materials for Bone Tissue Repair. *ACS Applied Polymer Materials*. 2, 3390–6.
- [171] **Sarioglu E, Arabacioglu Kocaaga B, Turan D, Batirel S, Guner FS.** (2019). Theophylline-loaded pektin-based hydrogels. II. Effect of concentration of initial pektin solution, crosslinker type and cation concentration of external solution on drug release profile. *Journal of Applied Polymer Science*. 136, 1–15.
- [172] **Rodoplu S, Celik BE, Kocaaga B, Ozturk C, Batirel S, Turan D, Guner FS.** (2020). Dual effect of procaine-loaded pektin hydrogels: pain management and in vitro wound healing. *Polymer Bulletin*. 78, 2227–2250.
- [173] **Güner OZ, Kocaaga B, Batirel S, Kurkcuoglu O, Güner FS.** (2020). 2-Thiobarbituric acid addition improves structural integrity and controlled drug delivery of biocompatible pektin hydrogels. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 70, 703–711.
- [174] **Khotimchenko M.** (2020). Pektin polymers for colon-targeted antitumor drug delivery. *Int. J. of Biological Macromolecules*. 158, 1110–24.
- [175] **Carle S, Maigler F, Flamm J, Kramer V, Mavoungou C, Schmid O.** (2017). A comprehensive screening platform for aerosolizable protein formulations for intranasal and pulmonary drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 532, 537-546.
- [176] **Liu L, Fishman ML, Hicks KB.** (2006). Pektin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*. 14, 15–24.
- [177] **Illum L.** (2012). Nasal drug delivery — Recent developments and future prospects. *Journal of Controlled Release*. 161, 254–63.
- [178] **Hintzen F, Hauptstein S, Perera G.** (2013). Synthesis and in vitro characterization of entirely S-protected thiolated pektin for drug delivery. *A. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 85, 1266–1273.
- [179] **Jurišić Dukovski B, Mrak L, Winnicka K, Szekalska M, Juretić M, Filipović-Grčić J.** (2019). Spray-dried nanoparticle-loaded pektin microspheres for dexamethasone nasal delivery. *Drying Technology*. 37, 1915–25.

- [180] **Nižić L, Potaš J, Winnicka K, Szekalska M, Erak I, Gretić M.** (2020). Development, characterisation and nasal deposition of melatonin-loaded pektin/hypromellose microspheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 141, 105115.
- [181] **Pardo J, Mena A, Jiménez E, Ortiz NAI, Mestre RRF.** (2019). Effectiveness of fentanyl pektin nasal citrate in controlling episodes of breakthrough cancer pain triggered by routine radiotherapy procedures. *Clinical and Translational Oncology Springer International Publishing*; 21, 1568–72.
- [182] **Liu H, Huang Z, Yang G, Lu W, Yu N.** (2008). Inhibitory effect of modified citrus pektin on liver metastases in a mouse colon cancer model. *World Journal of Gastroenterology*. 14, 7386–91.
- [183] **Sansoni R, Freitas L De, Tamie L, Diethelm H, Souza T, Shiga TM.** (2020). The purification of pektin from commercial fruit flours results in a jaboticaba fraction that inhibits galectin-3 and colon cancer cell growth. *Food Research International*. 137, 109747.
- [184] **Zhang W, Xu P, Zhang H.** (2015). Pektin in cancer therapy: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 44, 258–71.
- [185] **Nangia-makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ.** (2000). Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. *The American Journal of Pathology American Society for Investigative Pathology*; 156, 899–909.
- [186] **Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B.** (2004). Localized delivery of growth factors for bone repair. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58, 197–208.
- [187] **Cernencu AI, Lungu A, Stancu I.** (2019). Bioinspired 3D printable pektin-nanocellulose ink formulations. *Carbohydrate Polymers*. 220, 12–21.
- [188] **Moroni L, Burdick JA.** (2018). Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nature Reviews Materials*. 3, 21–37.
- [189] **Long J, Etxeberria AE, Nand A V., Bunt CR, Ray S, Seyfoddin A.** (2019). A 3D printed chitosan-pektin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery. *Materials Science and Engineering C*. 104, 109873.
- [190] **Lapomarda A, De Acutis A, Chiesa I, Fortunato GM, Montemurro F, De Maria C.** (2020). Pektin-GPTMS-Based Biomaterial: Toward a Sustainable Bioprinting of 3D scaffolds for Tissue Engineering Application. *Biomacromolecules*. 21, 319–27.

- [191] **Gao C, Rahaman MN, Gao Q, Teramoto A, Abe K.** (2012). Robotic deposition and in vitro characterization of 3D gelatin À bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. *Journal Of Biomedical Materials Research A*. 7, 1–11.
- [192] **Tallia F, Russo L, Li S, Orrin ALH, Shi X, Chen S.** (2018). Bouncing and 3D printable hybrids with self-healing properties. *Materials Horizons*. 5, 849–60.
- [193] **Tummalapalli M, Berthet M, Verrier B, Deopura BL, Alam MS, Gupta B.** (2016). Drug loaded composite oxidized pectin and gelatin networks for accelerated wound healing. *International Journal of Pharmaceutics*. 505, 234–45.
- [194] **Ganesan P.** (2017). Natural and bio polymer curative films for wound dressing medical applications. *Biochemical Pharmacology*. 18, 33–40.
- [195] **Moura LIF, Dias AMA, Carvalho E, De Sousa HC.** (2013). Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment - A review. *Acta Biomaterialia*. 9, 7093–114.
- [196] **Del Gaudio P, Amante C, Civale R, Bizzarro V, Petrella A, Pepe G.** (2020). In situ gelling alginate-pektin blend particles loaded with Ac2-26: A new weapon to improve wound care armamentarium. *Carbohydrate Polymers*. 227, 115305.
- [197] **Liu Y, Ahmad H, Luo Y, Gardiner DT, Gunasekera RS, Mckeehan WL.** (2001). Citrus Pektin : Characterization and Inhibitory Effect on Fibroblast Growth Factor - Receptor Interaction. *J. Agric. Food Chem*. 49, 3051–7.
- [198] **Markov PA, Popov S V, Nikitina IR, Ovodova RG, Ovodov YS.** (2011). Anti Inflammatory Activity of Pektins and Their Galacturonan Backbone. *Russian Journal Of Bioorganic Chemistry*. 37, 817–21.
- [199] **Birch NP, Barney LE, Pandres E, Peyton SR, Schiffman JD.** (2015). Thermal-responsive behavior of a cell compatible chitosan/pektin hydrogel. *Biomacromolecules*. 16, 1837–43.
- [200] **Yu N, Wang X, Ning F, Jiang C, Li Y, Peng H.** (2019). Development of antibacterial pektin from Akebia trifoliata var. australis waste for accelerated wound healing. *Carbohydrate Polymers*. 217, 58–68.
- [201] **Zhang W, Mahuta KM, Mikulski BA, Harvestine JN, Crouse JZ, Lee JC.** (2016). Novel pektin-based carriers for colonic drug delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*. 21, 127–30.
- [202] **Jones EM, Cochrane CA, Percival SL.** (2015). The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. *Advances in Wound Care*. 431–9.

- [203] **Monzerratt K, Jáuregui G, Carlos J, Cabrera C, Patricia E, Cenicerros S.** (2009). A New Formulated Stable Papin-pektin Aerosol Spray for Skin Wound Healing. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14, 450–6.
- [204] **Soubhagya AS, Moorthi A, Prabakaran M.** (2020). Preparation and characterization of chitosan/pektin/ZnO porous films for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*. 157, 135–45.
- [205] **Eliyahu S, Galitsky A, Ritov E, Bianco-peled H.** (2021). Hybrid Acrylated Chitosan and Thiolated Pektin Cross-Linked Hydrogels with Tunable Properties. *Polymers*. 13, 1–17.
- [206] **Guo A, Durymanov M, Permyakova A, Sene S, Serre C, Reineke J.** (2019). Metal Organic Framework (MOF) Particles as Potential Bacteria-Mimicking Delivery Systems for Infectious Diseases: Characterization and Cellular Internalization in Alveolar Macrophages. *Pharmaceutical Research*. 36, 53.
- [207] **Zhang X, Kang X, Jin L, Bai J, Liu W, Wang Z.** (2018). Stimulation of wound healing using bioinspired hydrogels with basic fibroblast growth factor (bFGF). *International Journal of Nanomedicine*. 13, 3897–906.
- [208] **Amirian J, Thuy N, Linh B, Ki Y, Lee B.** (2015). Bone formation of a porous Gelatin-Pektin-biphasic calcium phosphate composite in presence of BMP-2 and VEGF. *International Journal of Biological Macromolecules*. 76, 10–24.
- [209] **Li J, Mooney DJ.** (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*. 1, 1–18.
- [210] **Siepmann J, Peppas NA.** (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64, 163–74.
- [211] **Varshosaz J, Falamarzian M.** (2001). Drug diffusion mechanism through pH-sensitive hydrophobic/polyelectrolyte hydrogel membranes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 51, 235–40.
- [212] **Lemaire V, Bélair J, Hildgen P.** (2003). Structural modeling of drug release from biodegradable porous matrices based on a combined diffusion/erosion process. *International Journal of Pharmaceutics*. 258, 95–107.
- [213] **Heyer K, Augustin M, Protz K, Herberger K, Spehr C, Rustenbach SJ.** (2013). Effectiveness of advanced versus conventional wound dressings on healing of chronic wounds: Systematic review and meta-analysis. *Dermatology*. 226, 172–84.
- [214] **Guest JF, Ayoub N, Mcilwraith T, Uchegbu I, Gerrish A, Weidlich D.** (2015). Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ Open*. 5, 1–8.

- [215] **Jung K, Covington S, Sen CK, Januszyk M, Kirsner RS, Gurtner GC.** (2017). Rapid identification of slow healing wounds. *Wound Repair Regen.* 24, 181–8.
- [216] **Driver VR, Dpm MS, Fabbi M, Lavery LA.** (2007). The costs of diabetic foot : The economic case for the limb salvage team. *Journal of the American Podiatric Medical Association.* 52, 17S-22S.
- [217] **Tıbbi Cihaz Ve Tıbbi Malzeme Çalışma Grubu Raporu** Kalkınma Planı. T.C. Kalkınma Bakanlığı Onuncu Kalkınma Planı 2014-2018.
- [218] **Gooneie A, Schuschnigg S, Holzer C.** (2017). A Review of Multiscale Computational Methods in Polymeric Materials. *Polymers.* 9, 1–80.
- [219] **J. Andrew, McCammon, Bruce R. Gelin MK.** (1977). Dynamics of Folded Protein. *Nature.* 267, 585–90.
- [220] **Martinez-Mayorga K, Madariaga-Mazon A, Medina-Franco JL, Maggiora G.** (2020). The impact of chemoinformatics on drug discovery in the pharmaceutical industry. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 15, 293–306.
- [221] **Eslami M, Nikkhah SJ, Eslami E, Hashemianzadeh SM.** (2020). A new insight into encapsulation process of a drug molecule in the polymer/surfactant system: a molecular simulation study. *Structural Chemistry.* 31, 2051–62.
- [222] **Bernasconi M, Chiarotti GL, Focher P, Parrinello M, Tosatti E.** (1997). Solid-State Polymerization of Acetylene under Pressure : Ab Initio Simulation. *Physical Reviews Letters.* 78, 3–6.
- [223] **Quarti C, Milani A, Castiglioni C.** (2013). Ab Initio Calculation of the IR Spectrum of PTFE : Helical Symmetry and Defects. *The Journal of Physical Chemistry B.* 8, 706–18.
- [224] **Johnston K, Harmandaris V.** (2013). Hierarchical simulations of hybrid polymer – solid. *The Royal Society of Chemistry.* 9, 6696–710.
- [225] **Piscitelli F, Posocco P, Toth R, Fermeglia M, Pricl S, Mensitieri G.** (2010). Journal of Colloid and Interface Science Sodium montmorillonite silylation: Unexpected effect of the aminosilane chain length. *Journal of Colloid And Interface Science.* 351, 108–15.
- [226] **Galuschko A, Lang M, Kreer T, Sommer J, Lang M, Kreer T.** (2014). Monte Carlo Simulation of Thin Film Polymer Melts Monte Carlo Simulation of Thin Film Polymer Melts. *Soft Materials.* 12, 49–55.

- [227] **John A, Heinrich G.** (2007). Monte Carlo Simulation of Polymer Reactions at Interfaces. *Macromolecular Theory and Simulations*. 16, 430–40.
- [228] **Boudraa K, Bouchaour T, Maschke U.** (2020). Thermal analysis of interpenetrating polymer networks through molecular dynamics simulations: a comparison with experiments. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 140, 1845–57.
- [229] **Moeini M, Isfahani RB, Saber-samandari S, Aghdam MM.** (2020). Molecular dynamics simulations of the effect of temperature and strain rate on mechanical properties of graphene – epoxy nanocomposites. *Molecular Simulation*. 7022, 476–87.
- [230] **Xu Q, Jiang J.** (2020). Molecular simulations of liquid separations in polymer membranes. *Current Opinion in Chemical Engineering*. 28, 66–74.
- [231] **Cui J, Zhao J.** (2020). A comparative study on enhancement of mechanical and tribological properties of nitrile rubber composites reinforced by different functionalized graphene sheets: Molecular dynamics simulations. *Polymer Composites*. 1–15.
- [232] **Yang Y, Adhikari S, Xu G.** (2020). Molecular simulation to discover rheological properties and soil-binding ability of PHPA polymer on montmorillonite surface. *Surface and Interface Analysis*. 1–11.
- [233] **Saha T, Bhowmick AK, Oda T, Miyauchi T, Fujii N.** (2021). Understanding thermo-oxidative degradation of polyacrylic ester elastomer and its nanocomposites through molecular dynamics simulation and experiments. *Polymer Degradation and Stability*. 183, 109457.
- [234] **Yonglan Liu, Dong Zhang, Gong2, Xu L, Feng Z-Q, Chang, YungHe Y, , and Jie Zheng.** (2020). Molecular Simulations and Understanding of Antifouling Zwitterionic Polymer Brushes. *Journal of Materials Chemistry B*. 1–26.
- [235] **Rukmani SJ, Anstine DM, Munasinghe A, Colina CM.** (2020). An Insight into Structural and Mechanical Properties of Ideal-Networked Poly (Ethylene Glycol)– Peptide Hydrogels from Molecular Dynamics Simulations. *Macromol. Chem. Phys*. 1900326, 1–14.
- [236] **Eroglu B, Dalgakiran D, Inan T, Kurkcuoglu O, Güner FS.** (2018). A computational and experimental approach to develop minocycline-imprinted hydrogels and determination of their drug delivery performances. *Journal of Polymer Research. Journal of Polymer Research*, 25.
- [237] **Serapian SA, Marchetti F, Triveri A, Morra G, Meli M, Moroni E.** (2020). The Answer Lies in the Energy: How Simple Atomistic Molecular. *J Phys Chem Lett*. 11, 8084–8093.

- [238] **Keretsu S, Bhujbal SP, Cho SJ.** (2020). Rational approach toward COVID - 19 main protease inhibitors via molecular docking ,molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Scientific Reports Nature* 1–14.
- [239] **Allen M.** (2004). Introduction to molecular dynamics simulation. *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*. 23, 1–28.
- [240] **Metropolis N, Rosenbluth AW, Rosenbluth MN, Teller AH, Teller E.** (1953). Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*. 21, 1087–92.
- [241] **Rapaport D. C.** (2004). The Art Of Molecular Dynamics Simulation the Edinburgh Building, Cambridge CB2 2RU, UK:Cambridge University Press. Second Edi.
- [242] **Haile JM.** (1992). Molecular Dynamics Simulation. New York, NY, USA: JohnWiley\& Sons, Inc.
- [243] **Warshel A.** (2002). Molecular Dynamics Simulations of Biological Reactions. *Accounts of Chemical Research*. 35, 385–95.
- [244] **Vivo M De, Masetti M, Bottegoni G, Cavalli** (2016). A. Role of Molecular Dynamics and Related Methods in Drug Discovery. *J Med Chem*. 59, 4035–4061.
- [245] **Gordon M.** (2004). An Introduction to Statistical Mechanics. *Cognitive Economics*. 131-156.
- [246] **Theodorou N.** (2004). Simulation Methods for Polymers. *Simulation Methods for Polymers*.
- [247] **Rothman DH, Keller JM.** (1988). Immiscible cellular-automaton fluids. *Journal of Statistical Physics*. 52, 1119–27.
- [248] **Katiyar RS, Jha PK.** (2018). Molecular simulations in drug delivery: Opportunities and challenges. Wiley Interdisciplinary Reviews: *Computational Molecular Science*. 8, 1–18.
- [249] **Feng T, Li M, Zhou J, Zhuang H, Chen F, Ye R.** (2015). Application of molecular dynamics simulation in food carbohydrate research - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 31, 1–13.
- [250] **Loup Verlet.** (1967). Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard, -Jones Molecules. *Physical Reviews*. 159, 183–95.
- [251] **Eren D, Yalçın I.** (2020). The aim of implementation of the molecular mechanic and the molecular dynamic methods in rational drug design. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 44, 334–55.
- [252] **Masetti M, Rocchia W.** (2014). Molecular mechanics and dynamics: numerical tools to sample the configuration space. *Frontiers in Bioscience*. 578–604.

- [253] **Nerenberg PS.** (2018). Head-gordon T. New developments in force fields for biomolecular simulations. *Current Opinion in Structural Biology.* 49, 129–38.
- [254] **Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA.** (2004). Development and Testing of a General Amber Force Field. *Journal of Computational Chemistry.* 56531.
- [255] **Jamali SH, Westen T Van, Moulton OA, Vlugt TJH.** (2018). Optimizing Nonbonded Interactions of the OPLS Force Field for Aqueous Solutions of Carbohydrates: How to Capture Both Thermodynamics and Dynamics. *J Chem Theory Comput.* 14, 6690–700.
- [256] **Spoel Dvander, Lindahl E, Hess B, Groenhof G.** (2005). GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry.* 26, 1701–18.
- [257] **Warshel A, Lifson S.** (1970). Consistent force field calculations. II. Crystal structures, sublimation energies, molecular and lattice vibrations, molecular conformations, and enthalpies of alkanes. *The Journal of Chemical Physics.* 53, 582–94.
- [258] **Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J.** (2009). CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-Like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields. *Journal of Computational Chemistry.* 31, 1-20.
- [259] **Sprenger KG, Jaeger VW, Pfaendtner J.** (2015). The General AMBER Force Field (GAFF) Can Accurately Predict Thermodynamic and Transport Properties of Many Ionic Liquids. *J Phys Chem B.* 8, 5882–95.
- [260] **Vanommeslaeghe K, Mackerell AD.** (2012). Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing. *J Chem Inf Model.* 52, 3144–54.
- [261] **Elizabeth R. Hatcher, Olgun Guvench, and Alexander D. MacKerell J.** (2009). CHARMM Additive All-Atom Force Field for Acyclic Polyalcohols, Acyclic Carbohydrates, and Inositol. *J Chem Theory Comput.* 5, 1315–27.
- [262] **Glennon TM, Merz KM.** (1997). A carbohydrate force field for amber and its application to the study of saccharide to surface adsorption. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM.* 395–396:157–71.
- [263] **Guvench O, Hatcher ER, Venable RM, Pastor RW, MacKerell, Jr. AD.** (2009). CHARMM Additive All-Atom Force Field for Glycosidic Linkages. *Journal of Chemical Theory and Computation.* 5, 2353–70.

- [264] **Foley BL, Tessier MB, Woods RJ.** (2012). Carbohydrate force fields. *Computational Molecular Science*. 2, 652–97.
- [265] **Scherbinina SI.** (2020). Three-Dimensional Structures of Carbohydrates and Where to Find Them. *Int J Mol Sci*. 21, 1–46.
- [266] **Jo S, Song KC, Desaire H, MacKerell AD, Im W.** (2011). Glycan reader: Automated sugar identification and simulation preparation for carbohydrates and glycoproteins. *Journal of Computational Chemistry*. 32, 3135–41.
- [267] **Heinz H, Lin T, Mishra RK, Emami FS.** (2013). Thermodynamically Consistent Force Fields for the Assembly of Inorganic , Organic , and Biological Nanostructures : The INTERFACE Force Field. *Langmuir*. 29, 1754–65.
- [268] **Mackerell AD, Feig M, Iii CLB.** (2004). Extending the Treatment of Backbone Energetics in Protein Force Fields : Limitations of Gas-Phase Quantum Mechanics in Reproducing Protein Conformational. *Journal of Computational Chemistry*. 25, 1400–15.
- [269] **Cloutier T, Sudrik C, Sathish HA, Trout BL. Kirkwood** (2018). Buff -Derived Alcohol Parameters for Aqueous Carbohydrates and Their Application to Preferential Interaction Coefficient Calculations of Proteins. *J Phys Chem B* 2. 122, 9350–60.
- [270] **Raman EP, Guvench O, Mackerell AD.** (2010). CHARMM Additive All-Atom Force Field for Glycosidic Linkages in Carbohydrates Involving Furanoses. *J Phys Chem*. 114, 12981–94.
- [271] **Guvench O, Mallajosyula SS, Raman EP, Hatcher E, Vanommeslaeghe K, Foster TJ.** (2011). CHARMM Additive All-Atom Force Field for Carbohydrate Derivatives and Its Utility in Polysaccharide and Carbohydrate À Protein Modeling. *J. Chem. Theory Comput*. 3162–80.
- [272] **Dwell SR, Brooks BR, Ben-naim** (1994). A. Solvent-Induced Forces between Two Hydrophilic Groups. *The Journal of Physical Chemistr*. 98, 2198–202.
- [273] **Bruxelles UL De.** (1977). Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *Journal Of Computational Physics*. 341, 327–41.
- [274] **Petersen HG.** (2012). Accuracy and efficiency of the particle mesh Ewald method. *J Chem Phys*. 3668, 3668–79.
- [275] **Taylor P, Fincham D.** (2006). Leapfrog Rotational Algorithms. *Molecular Simulation*. 8, 37–41.
- [276] **Evans DJ, Holian BL.** (1985). The Nose–Hoover thermostat. *J Chern Phys*. 83, 4068–74.

- [277] **Beckedahl D, Obaga EO, Uken DA, Sergi A, Ferrario M.** (2016). On the configurational temperature Nosè-Hoover thermostat. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 461, 19–35.
- [278] **Quigley D, Probert MIJ.** (2004). Langevin dynamics in constant pressure extended systems. *Journal of Chemical Physics*. 120, 11432–41.
- [279] **Kmiecik S, Gront D, Kolinski M, Wieteska L, Dawid AE, Kolinski A.** (2016). Coarse-Grained Protein Models and Their Applications. *Chemical Reviews*. 116, 7898–936.
- [280] **Aline Maire du Poset, a Andrea Zitolo FC, Assifaoui A, Lerbret and A.** (2020). Evidence for an egg-box-like structure in iron(II)- polygalacturonate hydrogels: a combined EXAFS and molecular dynamics simulation study. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 6, 1–20.
- [281] **Braccini I, Grasso RP, Pérez S.** (1999). Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: A molecular modeling investigation. *Carbohydrate Research*. 317, 119–30.
- [282] **Braccini I, Prez S, Pe S.** (2001). Molecular Basis of Ca^{2+} -Induced Gelation in Alginates and Pektins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*. 1089–96.
- [283] **Plazinski W.** (2011). Molecular basis of calcium binding by polyguluronate chains. Revising the egg-box model. *Journal of Computational Chemistry*. 32, 2988–95.
- [284] **Plazinski W, Drach M.** (2013). Calcium- α - L - Guluronate Complexes: Ca^{2+} Binding Modes from DFT- MD Simulations. *J. Phys. Chem. B* 117, 40; 12105–12112 .
- [285] **Assifaoui A, Lerbret A, Uyen HTD, Neiers F, Chambin O, Loupiac C.** (2015). Structural behaviour differences in low methoxy pektin solutions in the presence of divalent cations (Ca^{2+} and Zn^{2+}): a process driven by the binding mechanism of the cation with the galacturonate unit. *Soft matter*. 11, 551–60.
- [286] **Huynh UTD, Lerbret A, Neiers F, Chambin O, Assifaoui A.** (2016). Binding of Divalent Cations to Polygalacturonate: A Mechanism Driven by the Hydration Water. *Journal of Physical Chemistry B*. 120, 1021–32.
- [287] **Stortz CA.** (1999). Disaccharide conformational maps : how adiabatic is an adiabatic map ? *Carbohydrate Research*. 322, 77–86.
- [288] **Manunza B, Deiana S, Pintore M, Gessa C.** (1998). Interaction of Ca^{2+} and Na^{+} ions with polygalacturonate chains : a molecular dynamics study. *Glycoconjugate Journal*. 297–300.
- [289] **Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A.** (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*. 44, 1202–13.

- [290] **Blomqvist J, Ahjopalo L, Mannfors B, Pietilä LO.** (1999). Studies on aliphatic polyesters I: Ab initio, density functional and force field studies of esters with one carboxyl group. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM.* 488, 247–62.
- [291] **Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG.** (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics.* 103, 8577–93.
- [292] **Lin Y, Pan D, Li J, Zhang L, Shao X.** (2017). Application of Berendsen barostat in dissipative particle dynamics for nonequilibrium dynamic simulation. *Journal of Chemical Physics* 146, 124108.
- [293] **Ono S.** (1948). The Radial Distribution Function in Liquid Argon. *Journal of the Physical Society of Japan.* 3, 167–71.
- [294] **Cifra P, Benková Z, Bleha T.** (2008). Persistence lengths and structure factors of wormlike polymers under confinement. *Journal of Physical Chemistry B.* 112, 1367–75.
- [295] **Bishop M, Kalos MH, Frisch HL.** (1979). Molecular dynamics of polymeric systems. *The Journal of Chemical Physics.* 70, 1299–304.
- [296] **Braccini I, Pérez S.** (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules.* 2, 1089–96.
- [297] **Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D.** (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters.* 32, 195–8.
- [298] **Braccini I, Pérez S.** (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules.* 2, 1089–96.
- [299] **Huynh UTD, Lerbret A, Neiers F, Chambin O, Assifaoui A.** (2016). Binding of Divalent Cations to Polygalacturonate: A Mechanism Driven by the Hydration Water. *Journal of Physical Chemistry B.* 120, 1021–32.
- [300] **Katz AK, Glusker JP, Beebe SA, Bock CW.** (1996). Calcium Ion Coordination: A Comparison with That of Beryllium , Magnesium , and Zinc. *J. Am. Chem. Soc.* 7863, 5752–63.
- [301] **Alba K, Bingham RJ, Gunning PA, Wilde PJ, Kontogiorgos V.** (2018). Pektin Conformation in Solution. *Journal of Physical Chemistry B.* 122, 7286–94.
- [302] **Kastner H, Einhorn-Stoll U, Drusch S.** (2017). Structure formation in sugar containing pektin gels - Influence of gel composition and cooling rate on the gelation of non-amidated and amidated low-methoxylated pektin. *Food Hydrocolloids.* 73, 13–20.

- [303] **Güner OZ, Cam C, Arabacioglu-Kocaaga B, Batirel S, Güner FS.** (2018). Theophylline-loaded pectin-based hydrogels. I. Effect of medium pH and preparation conditions on drug release profile. *Journal of Applied Polymer Science*. 135, 1–12.
- [304] **Sriamornsak P, Nunthanid J, Cheewatanakornkool K, Manchun S.** (2010). Effect of drug loading method on drug content and drug release from calcium pectinate gel beads. *AAPS PharmSciTech*. 11, 1315–9.
- [305] **Oakenfull D, Scott (1984).** A. Hydrophobic Interaction in the Gelation of High Methoxyl Pektins. *Journal of Food Science*. 49, 1093–8.
- [306] **Alonso-Mougán M, Meijide F, Jover A, Rodríguez-Núñez E, Vázquez-Tato J.** (2002). Rheological behaviour of an amide pectin. *Journal of Food Engineering*. 55, 123–9.
- [307] **Black Sa, Smit Cjb.** (1972). The Effect of Demethylation Procedures on the Quality of Low-Ester Pektins Used in Dessert Gels. *Journal of Food Science*. 37, 730–2.
- [308] **Löfgren C, Guillotin S, Hermansson AM.** (2006). Microstructure and kinetic rheological behavior of amidated and nonamidated LM pectin gels. *Biomacromolecules*. 7, 114–21.
- [309] **Altenhofen M, Cristiane A, Bierhalz K, Kieckbusch TG.** (2009). Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca^{2+} ions: Effect of the plasticizer concentration. *Carbohydrate Polymers*. 77, 736–42.
- [310] **Fang Y, Al-Assaf S, Phillips GO, Nishinari K, Funami T, Williams PA.** (2008). Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. *Carbohydrate Polymers*. 72, 334–41.
- [311] **Maire Du Poset A, Lerbret A, Boué F, Zitolo A, Assifaoui A, Cousin F.** (2019). Tuning the Structure of Galacturonate Hydrogels: External Gelation by Ca, Zn, or Fe Cationic Cross-Linkers. *Biomacromolecules*. 20, 2864–72.
- [312] **Liu LS, Fishman ML, Kost J, Hicks KB.** (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*. 24, 3333–43.
- [313] **Malovíková A, Rinaudo M, Milas M.** (1994). Comparative interactions of magnesium and calcium counterions with polygalacturonic acid. *Biopolymers*. 34, 1059–64.
- [314] **Emmerichs N, Wingender J, Flemming HC, Mayer C.** (2004). Interaction between alginates and manganese cations: Identification of preferred cation binding sites. *International Journal of Biological Macromolecules*. 34, 73–9.

- [315] **Siew CK, Williams PA, Young NWG.** (2005). New insights into the mechanism of gelation of alginate and pectin: Charge annihilation and reversal mechanism. *Biomacromolecules*. 6, 963–9.
- [316] **Fraeye I, Doungla E, Duvetter T, Moldenaers P, Van Loey A, Hendrickx M.** (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. *Food Hydrocolloids*. 23, 2069–77.
- [317] **Wei Z, Zhu P, Huang Q.** (2019). Investigation of ovotransferrin conformation and its complexation with sugar beet pectin. *Food Hydrocolloids*. 87, 448–58.
- [318] **Assifaoui A, Chambin O, Cayot P.** (2011). Drug release from calcium and zinc pectinate beads: Impact of dissolution medium composition. *Carbohydrate Polymers*. 85, 388–93.
- [319] **Dhalleine C, Assifaoui A, Moulari B, Pellequer Y, Cayot P, Lamprecht A.** (2011). Zinc-pectinate beads as an in vivo self-assembling system for pulsatile drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 414, 28–34.
- [320] **Lansdown ABG.** (2002). Calcium: A potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair and Regeneration*. 10, 271–85.
- [321] **Liners F, Thibault J-F, Van Cutsem P.** (1992). Influence of the Degree of Polymerization of Oligogalacturonates and of Esterification Pattern of Pectin on Their Recognition by Monoclonal Antibodies. *Plant Physiology*. 99, 1099–104.
- [322] **Luzio GA, Cameron RG.** (2008). Demethylation of a model homogalacturonan with the salt-independent pectin methyltransferase from citrus: Part II. Structure-function analysis. *Carbohydrate Polymers*. 71, 300–9.
- [323] **Sunghongjeen S, Sriamornsak P, Pitaksuteepong T, Somsiri A, Puttipipatkachorn S.** (2004). Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets. *AAPS PharmSciTech*. 5:E9.
- [324] **Ström A, Williams MAK.** (2003). Controlled calcium release in the absence and presence of an ion-binding polymer. *Journal of Physical Chemistry B*. 107, 10995–9.
- [325] **Chen R, Ratcliffe I, Williams PA, Luo S, Chen J, Liu C.** (2021). The influence of pH and monovalent ions on the gelation of pectin from the fruit seeds of the creeping fig plant. *Food Hydrocolloids*. 111, 106219.
- [326] **Gilsenan PM, Richardson RK, Morris ER.** (2000). Thermally reversible acid-induced gelation of low-methoxy pectin. *Carbohydrate Polymers*. 41, 339–49.

- [327] **Lootens D, Capel F, Durand D, Nicolai T, Boulenguer P, Langendorff V.** (2003). Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids*. 17, 237–44.
- [328] **Sawayama S, Kawabata A, Nakahara H, Kamata T.** (1988). A light scattering study on the effects of pH on pectin aggregation in aqueous solution. *Topics in Catalysis*. 2, 31–7.
- [329] **Silva D, Pinto LFV, Bozukova D, Santos LF, Serro AP, Saramago B.** (2016). Chitosan/alginate based multilayers to control drug release from ophthalmic lens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 147, 81–9.
- [330] **Wang B, Liu H, Sun L, Jin Y, Ding X, Li L.** (2018). Construction of High Drug Loading and Enzymatic Degradable Multilayer Films for Self-Defense Drug Release and Long-Term Biofilm Inhibition. *Biomacromolecules*. 19, 85–93.
- [331] **Swinehart DF.** (1962). The Beer-Lambert law. *Journal of Chemical Education*. 39, 333–5.
- [332] **Tiwari G, Tiwari R, Bannerjee S, Bhati L, Pandey S, Pandey P.** (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2:2.
- [333] **Malik DJ.** (2021). Approaches for manufacture, formulation, targeted delivery and controlled release of phage-based therapeutics. *Current Opinion in Biotechnology*. 68, 262–71 .
- [334] **Yetisgin AA, Cetinel S, Zuvin M, Kosar A, Kutlu O.** (2020). Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. *Molecules*. 25, 2193.
- [335] **Bera H, Ang SR, Chiong SW, Chan CH, Abbasi YF, Law LP.** (2020). Core-shell structured pullulan based nanocomposites as erlotinib delivery shuttles. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 69, 848–59.
- [336] **Bengani-Lutz P, Converse E, Cebe P, Asatekin A.** (2017). Self-Assembling Zwitterionic Copolymers as Membrane Selective Layers with Excellent Fouling Resistance: Effect of Zwitterion Chemistry. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 9, 20859–72.
- [337] **Brooks BR, Brooks CL, Mackerell AD, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B.** (2009). CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*. 30, 1545–614.
- [338] **Wu Y, Joseph S, Aluru NR.** (2009). Effect of cross-linking on the diffusion of water, ions, and small molecules in hydrogels. *Journal of Physical Chemistry B*. 113, 3512–20.
- [339] **Liggins RT, Burt HM.** (2001). Paclitaxel loaded poly(L-lactic acid) microspheres: Properties of microspheres made with low molecular weight polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 222, 19–33.

- [340] **Notario-Pérez F, Cazorla-Luna R, Martín-Illana A, Galante J, Ruiz-Caro R, Sarmento B.** (2021). Influence of Plasticizers on the pH-Dependent Drug Release and Cellular Interactions of Hydroxypropyl Methylcellulose/Zein Vaginal Anti-HIV Films Containing Tenofovir. *Biomacromolecules*. 22, 938–48.
- [341] **Agrawal CM, McKinney JS, Lanctot D, Athanasiou KA.** (2000). Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 21, 2443–52.
- [342] **Lu L, Peter SJ, D. Lyman M, Lai HL, Leite SM, Tamada JA.** (2000). In vitro and in vivo degradation of porous poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams. *Biomaterials*. 21, 1837–45.
- [343] **Tang S, Chi K, Xu H, Yong Q, Yang J, Catchmark JM.** (2021). A covalently cross-linked hyaluronic acid/bacterial cellulose composite hydrogel for potential biological applications. *Carbohydrate Polymers*. 252, 117123
- [344] **Hakkarainen M, Albertsson AC, Karlsson S.** (1996). Weight losses and molecular weight changes correlated with the evolution of hydroxyacids in simulated in vivo degradation of homo- and copolymers of PLA and PGA. *Polymer Degradation and Stability*. 52, 283–91.
- [345] **Sudarsan S, Selvi MS, Chitra G, Sakthivel M, Franklin DS, Guhanathan S.** (2020). Nontoxic pH-sensitive silver nanocomposite hydrogels for potential wound healing applications. *Polymer-Plastics Technology and Materials*. 00, 84–104.
- [346] **Li S, Girard A, Garreau H, Vert M.** (2000). Enzymatic degradation of polylactide stereocopolymers with predominant D-lactyl contents. *Polymer Degradation and Stability*. 71, 61–7.
- [347] **Alexis F.** (2005). Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly(lactic acid) and poly[(lactic acid)-co-(glycolic acid)]. *Polymer International*. 54, 36–46.
- [348] **Siepmann F, Le Brun V, Siepmann J.** (2006). Drugs acting as plasticizers in polymeric systems: A quantitative treatment. *Journal of Controlled Release*. 115, 298–306.
- [349] **Vieira MGA, Da Silva MA, Dos Santos LO, Beppu MM.** (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*. 47, 254–63.
- [350] **Huang X, Brazel CS.** (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 73, 121–36.

- [351] **Farid-ul-Haq M, Haseeb MT, Hussain MA, Ashraf MU, Naeem-ul-Hassan M, Hussain SZ.** (2020). A smart drug delivery system based on *Artemisia vulgaris* hydrogel: Design, on-off switching, and real-time swelling, transit detection, and mechanistic studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 58, 101795.
- [352] **Dodero A, Pianella L, Vicini S, Alloisio M, Ottonelli M, Castellano M.** (2019). Alginate-based hydrogels prepared via ionic gelation: An experimental design approach to predict the crosslinking degree. *European Polymer Journal*. 118, 586–94.
- [353] **Li J, Jin X, Yang Y, Zhang L, Liu R, Li Z.** (2020). Trimethyl chitosan nanoparticles for ocular baicalein delivery: Preparation, optimization, in vitro evaluation, in vivo pharmacokinetic study and molecular dynamics simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 156, 749–61.
- [354] **Shariatnia Z, Mazloom-Jalali A.** (2019). Chitosan nanocomposite drug delivery systems designed for the ifosfamide anticancer drug using molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids*. 273, 346–67.
- [355] **Awale M, Jin X, Reymond JL.** (2015). Stereoselective virtual screening of the ZINC database using atom pair 3D-fingerprints. *Journal of Cheminformatics*. 7, 1–15.
- [356] **Shao Y, Molnar LF, Jung Y, Kussmann J, Ochsenfeld C, Brown ST.** (2006). Advances in methods and algorithms in a modern quantum chemistry program package. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 8, 3172–91.
- [357] **DeLano W.** (2002). PyMOL. *DeLano Scientific*, San Carlos, CA. 1–15.
- [358] **William Humphrey, Andrew Dalke and KS.** (1996). VMD: Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 14, 33–8.
- [359] **Ong EES, Liow JL.** (2019). The temperature-dependent structure, hydrogen bonding and other related dynamic properties of the standard TIP3P and CHARMM-modified TIP3P water models. *Fluid Phase Equilibria*. 481, 55–65.
- [360] **Phillips JC, Braun R, Wang WEI, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E.** (2005). Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*. 26:16.

- [361] **Takari A, Ghasemi AR, Hamadani M, Sarafrazi M, Najafidoust A.** (2021). Molecular dynamics simulation and thermo-mechanical characterization for optimization of three-phase epoxy/TiO₂/SiO₂ nano-composites. *Polymer Testing*. 93:106890.
- [362] **Barth E, Kuczera K, Leimkuhler B, Skeel RD.** (1995). Algorithms for Constrained Molecular Dynamics. *Journal of Computational Chemistry*. 16, 1192–209.
- [363] **Andersen HC.** (1983). Rattle: A “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. *Journal of Computational Physics*. 52, 24–34.
- [364] **Luty BA, Davis ME, Tironi IG, Van Gunsteren WF.** (1994). A comparison of particle-particle, particle-mesh and ewald methods for calculating electrostatic interactions in periodic molecular systems. *Molecular Simulation*. 14, 11–20.
- [365] **Caffarena E, Grigera JR.** (1996). Crystal, melted and glassy states of glucose. A molecular dynamics simulation. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions*. 92, 2285–9.
- [366] **Sargsyan K, Grauffel C, Lim C.** (2017). How Molecular Size Impacts RMSD Applications in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 13, 1518–24.
- [367] **Martínez L.** (2015). Automatic identification of mobile and rigid substructures in molecular dynamics simulations and fractional structural fluctuation analysis. *PLoS ONE*. 10, 1–10.
- [368] **Mattice WL, Helfer CA, Sokolov AP.** (2003). On the Relationship between the Characteristic Ratio of a Finite Chain , C_n , and the Asymptotic Limit , C_∞ . *Macromolecules*. 9924–8.
- [369] **Tzounis PN, Anogiannakis SD, Theodorou DN.** (2017). General Methodology for Estimating the Stiffness of Polymer Chains from Their Chemical Constitution: A Single Unperturbed Chain Monte Carlo Algorithm. *Macromolecules*. 50, 4575–87.
- [370] **Flory PJ, Matheson RR.** (1984). Statistical thermodynamics of semirigid macromolecules: Chains with interconvertible rodlike and random-coil sequences in equilibrium. *Journal of Physical Chemistry*. 88, 6606–12.
- [371] **Mackie W, Perez S, Rizzo R, Taravel F, Vignon M.** (1983). Aspects of the conformation of polyguluronate in the solid state and in solution. *International Journal of Biological Macromolecules*. 5, 329–41.
- [372] **Kawabata A, Sawayama S, Nakahara H, Kamata T.** (1981). Mechanism of association of various demethylated pectins by calcium ions. *Agricultural and Biological Chemistry*. 45, 965–73.

- [373] **Zhu Y, Mehta KA, McGinity JW.** (2006). Influence of plasticizer level on the drug release from sustained release film coated and hot-melt extruded dosage forms. *Pharmaceutical Development and Technology.* 11, 285–94.
- [374] **Niaounakis M.** (2013). Degradability on Demand. *Biopolymers Reuse, Recycling, and Disposal.* Copyright Ó 2013 Elsevier Inc.
- [375] **Qussi B, Suess WG.** (2006). The influence of different plasticizers and polymers on the mechanical and thermal properties, porosity and drug permeability of free shellac films. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 32, 403–12.
- [376] **Wu C, McGinity JW.** (2001). Influence of ibuprofen as a solid-state plasticizer in Eudragit® RS 30 D on the physicochemical properties of coated beads. *AAPS PharmSciTech.* 2;4.
- [377] **Ito M, Nagai K.** (2007). Analysis of degradation mechanism of plasticized PVC under artificial aging conditions. *Polymer Degradation and Stability.* 92, 260–70.
- [378] **Sriamornsak P, Thirawong N, Weerapol Y, Nunthanid J, Sungthongjeen S.** (2007). Swelling and erosion of pektin matrix tablets and their impact on drug release behavior. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 67, 211–9.
- [379] **Matyjaszewski M, Mo"llerM.** (2012). Polymer Science: A Comprehensive Reference. Copyright ^a 2012 Elsevier.
- [380] **Slavutsky AM, Bertuzzi MA.** (2019). Formulation and characterization of hydrogel based on pektin and brea gum. *International Journal of Biological Macromolecules.* 123, 784–91.
- [381] **Ru Q, Wang Y, Lee J, Ding Y, Huang Q.** (2012). Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pektin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers.* 88, 838–46.
- [382] **Moreira HR, Munarin F, Gentilini R, Visai L, Granja PL, Tanzi MC.** (2014). Injectable pektin hydrogels produced by internal gelation: PH dependence of gelling and rheological properties. *Carbohydrate Polymers.* 103, 339–47.
- [383] **Román Y, de Oliveira Barddal HP, Iacomini M, Sassaki GL, Cipriani TR.** (2017). Anticoagulant and antithrombotic effects of chemically sulfated fucogalactan and citrus pektin. *Carbohydrate Polymers.* 174, 731–9.
- [384] **Byun H, Hong B, Sang YN, Sun YJ, Ji WR, Sang BL.** (2008). Swelling behavior and drug release of poly(vinyl alcohol) hydrogel cross-linked with poly(acrylic acid). *Macromolecular Research.* 16, 189–93.

- [385] **Biswas J, Kim H, Choe S, Kundu PP, Park YH, Lee DS.** (2003). Linear Low Density Polyethylene (LLDPE)/Zeolite Microporous Composite Film. *Macromolecular Research*. 11, 357–67.
- [386] **Faruk O, Bledzki AK, Fink HP, Sain M.** (2012). Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000-2010. *Progress in Polymer Science*. 37, 1552–96.
- [387] **Khademhosseini, A. Memic, Alhadrami HA, Hussain A, Aldhahri M, AlNowaiser F.** (2016). Hydrogels 2.0: improved properties with nanomaterial composites for biomedical applications. *Biomedical Materials*. 11, 2–38.
- [388] **Motealleh A, Kehr NS.** (2017). Janus nanocomposite hydrogels for chirality-dependent cell adhesion and migration. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 9, 33674–82.
- [389] **Gaharwar AK, Peppas NA, Khademhosseini A.** (2014). Nanocomposite hydrogels for biomedical applications. *Biotechnology and Bioengineering*. 111, 441–53.
- [390] **Liu Y, Nguyen A, Allen A, Zoldan J, Huang Y, Chen JY.** (2017). Regenerated cellulose micro-nano fiber matrices for transdermal drug release. *Materials Science and Engineering C*. 74, 485–92.
- [391] **Chang G, Li S, Huang F, Zhang X, Shen Y, Xie A.** (2016). Multifunctional Reduced Graphene Oxide Hydrogel as Drug Carrier for Localized and Synergic Photothermal/Photodynamics/Chemo Therapy. *Journal of Materials Science and Technology*. 32, 753–62.
- [392] **Pan Y, Shen Q, Pan C, Wang J.** (2013). Compressive Mechanical Characteristics of Multi-layered Gradient Hydroxyapatite Reinforced Poly (Vinyl Alcohol) Gel Biomaterial. *Journal of Materials Science and Technology*. 29, 551–6.
- [393] **Meena AK, Mishra GK, Rai PK, Rajagopal C, Nagar PN.** (2005). Removal of heavy metal ions from aqueous solutions using carbon aerogel as an adsorbent. *Journal of Hazardous Materials*. 122, 161–70.
- [394] **Liu B, Hu R, Deng J.** (1997). Characterization of Immobilization of an Enzyme in a Modified Y Zeolite Matrix and Its Application to an Amperometric. *Glucose Biosensor*. 69, 2343–8.
- [395] **Hovhannisyan V, Siposova K, Musatov A, Chen SJ.** (2021). Development of multifunctional nanocomposites for controlled drug delivery and hyperthermia. *Scientific Reports* Nature Publishing Group UK; 1–10.
- [396] **Ninan N, Muthiah M, Nur NA, Park IK, Elain A, Wong TW.** (2014). Antibacterial and wound healing analysis of gelatin/zeolite scaffolds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 115, 244–52.

- [397] **Azarfam MY, Nasirinezhad M, Naeim H, Zarrintaj P. A.** (2021). Green Composite Based on Gelatin / Agarose / Zeolite as a Potential Scaffold for Tissue Engineering Applications. *J. Compos. Sci.* 5; 125.
- [398] **Ansari Z, Sepideh A, Pour D, Esmaeil M.** (2021). Zeolitic imidazolate frameworks / polyacrylonitrile composites for oil sorption and antibacterial applications. *Applied Nanoscience*.
- [399] **Yazdi MK, Zarrintaj P, Hosseiniamoli H, Mashhadzadeh AH, Saeb MR, Ramsey JD.** (2020). Zeolites for theranostic applications. *Journal of Materials Chemistry B. Royal Society of Chemistry*;
- [400] **Ndiege N, Raidoo R, Schultz MK, Larsen S.** (2011). Preparation of a versatile bifunctional zeolite for targeted imaging applications. *Langmuir*. 27, 2904–9.
- [401] **BSI. BS EN 13726-2:2001.** (1998). Test methods for primary wound dressings. British Standard Institute. 363–86.
- [402] **Servatan M, Zarrintaj P, Mahmodi G, Kim SJ, Ganjali MR, Saeb MR.** (2020). Zeolites in drug delivery: Progress, challenges and opportunities. *Drug Discovery Today*. 25, 642–56.
- [403] **Barbosa GP, Debone HS, Severino P, Souto EB, Da Silva CF.** (2016). Design and characterization of chitosan/zeolite composite films - Effect of zeolite type and zeolite dose on the film properties. *Materials Science and Engineering C*. 60, 246–54.
- [404] **Ninan N, Muthiah M, Park IK, Elain A, Wong TW, Thomas S.** (2013). Faujasites Incorporated Tissue Engineering Scaffolds for Wound Healing: In Vitro and In Vivo Analysis. *ACS Appl Mater Interfaces*. 5, 11194–206.
- [405] **Zarrintaj P, Mahmodi G, Manouchehri S, Mashhadzadeh AH, Khodadadi M, Servatan M.** (2020). Zeolite in tissue engineering: Opportunities and challenges. *MedComm*. 1, 5–34.
- [406] **Chen G, Beving DE, Bedi RS, Yan YS, Walker SL.** (2009). Initial bacterial deposition on bare and zeolite-coated aluminum alloy and stainless steel. *Langmuir*. 25, 1620–6.
- [407] **Bacakova L, Vandrovcova M, Kopova I, Jirka I.** (2018). Applications of zeolites in biotechnology and medicine-a review. *Biomaterials Science*. 6, 974–89.
- [408] **Pourshahrestani S, Zeimaran E, Djordjevic I, Kadri NA, Towler MR.** (2016). Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances. *Materials Science and Engineering C*. 58, 1255–68.

- [409] **Mortazavi SM, Atefi A, Roshan-Shomal P, Raadpey N, Mortazavi G.** (2009). Development of a novel mineral based haemostatic agent consisting of a combination of bentonite and zeolite minerals. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC.* 21, 3–7.
- [410] **DaShawn A Hickman, Christa L Pawlowski, Ujjal D S Sekhon, Joyann Marks A, Gupta A Sen.** (2018). Biomaterials and Advanced Technologies for Hemostatic Management of Bleeding. *Adv Mater.* 30, 947–65.
- [411] **Li J, Cao W, Lv XX, Jiang L, Li YJ, Li WZ.** (2013). Zeolite-based hemostat QuikClot releases calcium into blood and promotes blood coagulation in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica Nature.* 34, 367–72.
- [412] **Li Y, Li H, Xiao L, Zhou L, Shentu J, Zhang X.** (2012). Hemostatic efficiency and wound healing properties of natural zeolite granules in a lethal rabbit model of complex groin injury. *Materials.* 5, 2586–96.
- [413] **Alam HB, Chen Z, Jaskille A, Querol RILC, Koustova E, Inocencio R.** (2004). Application of a zeolite hemostatic agent achieves 100% survival in a lethal model of complex groin injury in swine. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care.* 56, 974–83.
- [414] **Yu L, Shang X, Chen H, Xiao L, Zhu Y, Fan J.** (2019). A tightly-bonded and flexible mesoporous zeolite-cotton hybrid hemostat. *Nature Communications* 10, 1–9.
- [415] **Amorim R, Vilaça N, Martinho O, Reis RM, Sardo M, Rocha J.** (2012). Zeolite structures loading with an anticancer compound as drug delivery systems. *Journal of Physical Chemistry C.* 116, 25642–50.
- [416] **Seifu DG, Isimjan TT, Mequanint K.** (2011). Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors. *Acta Biomaterialia.* 7, 3670–8.
- [417] **Igarashi M, Nakano T, Thi PT, Nozue Y, Goto A, Hashi K.** (2013). NMR study of thermally activated paramagnetism in metallic low-silica X zeolite filled with sodium atoms. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics.* 87.
- [418] **Sze A, Erickson D, Ren L, Li D.** (2003). Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *Journal of Colloid and Interface Science.* 261, 402–10.
- [419] **Zahedi P, Rezaeian I, Ranaei-Siadat SO, Jafari SH, Supaphol P.** (2010). A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polymers for Advanced Technologies.* 21, 77–95.

- [420] **Uzun M, Anand SC, Shah T.** (2013). *In Vitro* Characterisation and Evaluation of Different Types of Wound Dressing Materials. *Journal of Biomedical Engineering and Technology*. 1, 1–7.
- [421] **Demirci S, Ustaoglu Z, Yilmazer GA, Sahin F, Baç N.** (2014). Antimicrobial properties of zeolite-X and zeolite-A ion-exchanged with silver, copper, and zinc against a broad range of microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 172, 1652–62.
- [422] **ASTM D2240-97.** (2021). Standard test method for rubber property - durometer hardness. ASTM D2240-97.
- [423] **ASTM-D522-93a.** (2021). Standard test methods for mandrel bend test of attached organic coatings. 19.
- [424] **BSI. BS EN 13726-1:2002.** (2002). Test methods for primary wound dressings. Aspect of absorbency. Available from: British Standard Institute
- [425] **Parsons D, Bowler P.** (2005). Silver antimicrobial dressings in wound management: a comparison of antibacterial, physical, and chemical characteristics Wounds-a p. 222–232.
- [426] **BSI.BS EN 12127:1998.** (2001). Textiles Fabrics Determination of mass per unit area using small samples. Available from: British Standard Institute
- [427] **Crank J.** (1975). the Mathematics of Diffusion. *Clarendon Press Oxford*.
- [428] **Park TG, Cohen S, Langer R.** (1992). Controlled Protein Release from Polyethyleneimine-Coated Poly(L-lactic Acid)/Pluronic Blend Matrices. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*. p. 37–9.
- [429] **Asare-Addo K, Levina M, Rajabi-Siahboomi AR, Nokhodchi A.** (2010). Study of dissolution hydrodynamic conditions versus drug release from hypromellose matrices: The influence of agitation sequence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 81, 452–60.
- [430] **Nurjaya S, Wong TW.** (2005). Effects of microwave on drug release properties of matrices of pectin. *Carbohydrate Polymers*. 62, 245–57.
- [431] **Nafisi S, Monajemi M, Ebrahimi S.** (2004). The effects of mono- and divalent metal cations on the solution structure of caffeine and theophylline. *Journal of Molecular Structure*. 705, 35–9.
- [432] **Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z.** (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60, 1650–62.
- [433] **Honary S, Zahir F.** (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 12, 255–64.

- [434] **Yu F, Chen Y, Liang X, Xu J, Lee C, Liang Q.** (2017). Dispersion stability of thermal nanofluids. *Progress in Natural Science: Materials International*. 27, 531–42.
- [435] **Singh S, Young A, McNaught CE.** (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (United Kingdom)*. 35, 473–7.
- [436] **Colombo P, Bettini R, Santi P, Peppas NA.** (2000). Swellable matrices for controlled drug delivery: Gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharmaceutical Science and Technology Today*. 3, 198–204.
- [437] **Fu JT, Rao MA.** (2001). Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: The effect of sucrose. *Food Hydrocolloids*. 15, 93–100.
- [438] **Ketelson HA, Meadows DL, Stone RP.** (2005). Dynamic wettability properties of a soft contact lens hydrogel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 40, 1–9.
- [439] **Jachimska B, Pajor A.** (2012). Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry*. 87, 138–46.
- [440] **Sriamornsak P.** (1999). Effect of calcium concentration, hardening agent and drying condition on release characteristics of oral proteins from calcium pectinate gel beads. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 8, 221–7.
- [441] **Tandara AA, Mustoe TA.** (2004). Oxygen in Wound Healing - More than a Nutrient. *World Journal of Surgery*. 28, 294–300.
- [442] **Ninan N, Muthiah M, Park IK, Elain A, Thomas S, Grohens Y.** (2013). Pektin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. 98, 877–85.
- [443] **El-Gibaly.** (2002). I. Oral delayed-release system based on Zn-pektinate gel (ZPG) microparticles as an alternative carrier to calcium pectinate beads for colonic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 232, 199–211.
- [444] **Sriamornsak P, Nunthanid J.** (1999). Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: II. Effect of formulation and processing variables on drug release. *Journal of Microencapsulation*. 16, 303–13.
- [445] **Huynh UTD, Lerbret A, Neiers F, Chambin O, Assifaoui A.** (2016). Binding of Divalent Cations to Polygalacturonate: A Mechanism Driven by the Hydration Water. *Journal of Physical Chemistry B*. 120, 1021–32.
- [446] **Zimmermann GR, Wick CL, Shields TP, Jenison RD, Pardi A.** (2000). Molecular interactions and metal binding in the theophylline-binding core of an RNA aptamer. *RNA*. 6:659.

- [447] **Fassihi AR, Munday DL.** (1989). Dissolution of Theophylline from Film-coated Slow Release Mini-tablets in Various Dissolution Media. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 41, 369–72.
- [448] **Díez-Pascual AM, Díez-Vicente AL.** (2015). Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. *Biomacromolecules*. 16, 2631–44.
- [449] **Queen D, Gaylor JD, Evans JH, Courtney JM, Reid WH.** (1987). The preclinical evaluation of the water vapour transmission rate through burn wound dressings. *Biomaterials*. 8, 367–71.
- [450] **F-L. M, Shyu S-S, Wu Y-B, Lee S-T, Shyong J-Y HR-N.** (2000). Fabrication and characterization of a sponge like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*. 22, 165–73.
- [451] **Eghbalifam N, Shojaosadati SA, Hashemi-Najafabadi S, Khorasani AC.** (2020). Synthesis and characterization of antimicrobial wound dressing material based on silver nanoparticles loaded gum Arabic nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 155, 119–30.
- [452] **Milenkovic J, Hrenovic J, Matijasevic D, Niksic M, Rajic N.** (2017). Bactericidal activity of Cu-, Zn-, and Ag-containing zeolites toward *Escherichia coli* isolates. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 20273–81.
- [453] **Alswat AA, Ahmad M Bin, Saleh TA.** (2017). Preparation and Characterization of Zeolite/Zinc Oxide-Copper Oxide Nanocomposite: Antibacterial Activities. *Colloids and Interface Science Communications*. 16, 19–24.
- [454] **Lansdown ABG, Mirastschijski U, Stubbs N, Scanlon E, Ågren MS.** (2007). Zinc in wound healing: Theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound Repair and Regeneration*. 15, 2–16.
- [455] **Top A, Ülkü S.** (2004). Silver, zinc, and copper exchange in a Na-clinoptilolite and resulting effect on antibacterial activity. *Applied Clay Science*. 27, 13–9.
- [456] **Akirov A, Masri-iraqi H, Atamna A, Shimon I.** (2017). Low Albumin Levels Are Associated with Mortality Risk in Hospitalized Patients. *The American Journal of Medicine*. 130:1465.
- [457] **Plakht Y, Gilutz H, Shiyovich A.** (2016). Decreased admission serum albumin level is an independent predictor of long-term mortality in hospital survivors of acute myocardial infarction. Soroka Acute Myocardial Infarction II (SAMI-II) project. *International Journal of Cardiology*. 219, 20–4.

- [458] **Arques S, Roux E, Sbragia P, Gelisse R, Pieri B, Ambrosi P.** (2008). Usefulness of serum albumin concentration for in-hospital risk stratification in frail, elderly patients with acute heart failure. Insights from a prospective, monocenter study. *International Journal of Cardiology*. 125, 265–7.
- [459] **Boonpipattanapong T, Chewatanakornkul S.** (2006). Preoperative carcinoembryonic antigen and albumin in predicting survival in patients with colon and rectal carcinomas. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 40, 592–5.
- [460] **Lecleire S, Di Fiore F, Antonietti M, Ben Soussan E, Hellot MF, Grigioni S.** (2006). Undernutrition is predictive of early mortality after palliative self-expanding metal stent insertion in patients with inoperable or recurrent esophageal cancer. *Gastrointestinal Endoscopy*. 64, 479–84.
- [461] **Alves FC, Sun J, Qureshi AR, Dai L, Snaedal S, Bárány P.** (2018). The higher mortality associated with low serum albumin is dependent on systemic inflammation in end-stage kidney disease. *PLOS ONE*. 13, 1–15.
- [462] **Aringer M.** (2020). Inflammatory markers in systemic lupus erythematosus. *Journal of Autoimmunity*. 110:102374.
- [463] **Huang J, Cheng A, Kumar R, Fang Y, Chen G, Zhu Y.** (2020). Hypoalbuminemia predicts the outcome of COVID-19 independent of age and co-morbidity. *Journal of Medical Virology*. 92, 2152–8.
- [464] **Aziz M, Fatima R, Lee-Smith W, Assaly R.** (2020). The association of low serum albumin level with severe COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care*. 24, 1–4.
- [465] **Huang W, Li C, Wang Z, Wang H, Zhou N, Jiang J.** (2020). Decreased serum albumin level indicates poor prognosis of COVID-19 patients: hepatic injury analysis from 2,623 hospitalized cases. *Science China Life Sciences*. 63, 1678–87.
- [466] **Chen S, Zhang D, Zheng T, Yu Y, Jiang J.** (2021). DVT incidence and risk factors in critically ill patients with COVID-19. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 51, 33–9.
- [467] **Rezasoltani S, Hatami B, Yadegar A, Asadzadeh Aghdaei H, Zali MR.** (2020). How Patients With Chronic Liver Diseases Succeed to Deal With COVID-19? *Frontiers in Medicine*. 7, 1–9.
- [468] **Sindgikar V, Narasanagi B, Ragate A, Ahmed Patel F.** (2017). Effect of serum albumin in wound healing and its related complications in surgical patients. *Al Ameen J Med Sci*. 10, 132–5.

- [469] **Utariani A, Rahardjo E, Perdanakusuma DS.** (2020). Effects of Albumin Infusion on Serum Levels of Albumin, Proinflammatory Cytokines (TNF- α , IL-1, and IL-6), CRP, and MMP-8; Tissue Expression of EGRF, ERK1, ERK2, TGF- β , Collagen, and MMP-8; and Wound Healing in Sprague Dawley Rats. *International Journal of Inflammation*.
- [470] **Nathasia, Sukmawati Tansil T.** (2020). Albumin, Important Therapy & When to Use It in Ten Patients (Adult & Child): Case Report. *Journal of Dermatology Research and Therapy*. 6, 3–7.
- [471] **Aguayo-becerra OA, Torres-garibay IC, Michel II, Maci D, Cha MDG, Ana I V.** (2013). Serum albumin level as a risk factor for mortality in burn patients. *CLINICS*. 68(7):940-945.
- [472] **Sullivan SA, Van Le L, Liberty AL, Soper JT, Barber EL.** (2016). Association between hypoalbuminemia and surgical site infection in vulvar cancers. *Gynecologic Oncology*. 142, 435–9.
- [473] **Mendez CM, McClain CJ, Marsano LS.** (2005). Albumin therapy in clinical practice. *Nutrition in Clinical Practice*. 20, 314–20.
- [474] **Cutting KF.** (2003). Wound exudate: composition and functions. *British Journal of Community Nursing*. 8, S4–9.
- [475] **Cutting KF.** (2014). Wound exudate: composition and functions. *British Journal of Community Nursing*. 8, S12–21.
- [476] **Cavassan NRV, Camargo CC, de Pontes LG, Barraviera B, Ferreira RS, Miot HA.** (2019). Correlation between chronic venous ulcer exudate proteins and clinical profile: A cross-sectional study. *Journal of Proteomics* 192, 280–90.
- [477] **Chen K, Chen X, Han X, Fu Y.** (2020). A comparison study on the release kinetics and mechanism of bovine serum albumin and nanoencapsulated albumin from hydrogel networks. *International Journal of Biological Macromolecules*. 163, 1291–300.
- [478] **Kim TH, Park YH, Kim KJ, Cho CS.** (2003). Release of albumin from chitosan-coated pectin beads in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 250, 371–83.
- [479] **Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ.** (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*. 52, 174–82.
480. **Norde W.** (2008). My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 61, 1–9.
- [481] **Romanini D, Braia MJ, Porfiri MC.** (2013). Applications of calorimetric techniques in the formation of protein-polyelectrolytes complexes.

- [482] **Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA.** (2004). PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*. 32, 665–7.
- [483] **Kubiak-Ossowska K, Tokarczyk K, Jachimska B, Mulheran PA. Bovine.** (2017). Serum Albumin Adsorption at a Silica Surface Explored by Simulation and Experiment. *Journal of Physical Chemistry B*. 121, 3975–86.
- [484] **Wang HD, Niu CH, Yang Q, Badea.** (2011). I. Study on protein conformation and adsorption behaviors in nanodiamond particle-protein complexes. *Nanotechnology*. 22.
- [485] **Sahoo BK, Ghosh KS, Dasgupta S.** (2009). Molecular interactions of isoxazolcurcumin with human serum albumin: Spectroscopic and molecular modeling studies. *Biopolymers*. 91, 108–19.
- [486] **Zhao X, Liu R, Chi Z, Teng Y, Qin P.** (2010). New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. *Journal of Physical Chemistry B*. 114, 5625–31.
- [487] **Bertrand ME, Turgeon SL.** (2007). Improved gelling properties of whey protein isolate by addition of xanthan gum. *Food Hydrocolloids*. 21, 159–66.
- [488] **Rocha C, Teixeira JA, Hilliou L, Sampaio P, Gonçalves MP.** (2009). Rheological and structural characterization of gels from whey protein hydrolysates/locust bean gum mixed systems. *Food Hydrocolloids*. 23, 1734–45.
- [489] **Langton M, Hermansson AM.** (1992). Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Topics in Catalysis*. 5, 523–39.
- [490] **Wang CS, Natale G, Virgilio N, Heuzey MC.** (2016). Synergistic gelation of gelatin B with xanthan gum. *Food Hydrocolloids*. 60, 374–83.
- [491] **Behrouzain F, Razavi SMA, Joyner H.** (2020). Mechanisms of whey protein isolate interaction with basil seed gum : In fl uence of pH and protein-polysaccharide ratio. *Carbohydrate Polymers*. 232, 115775.
- [492] **Laos K, Brownsey GJ, Ring SG.** (2007). Interactions between furcellaran and the globular proteins bovine serum albumin and β -lactoglobulin. *Carbohydrate Polymers*. 67, 116–23.
- [493] **Yu H, Mizaikoff B.** (2015). Probing the secondary structure of bovine serum albumin during heat-induced denaturation using mid-infrared fiberoptic sensors. *Royal Society of Chemistry*. 140.
- [494] **Decher G. Fuzzy.** (1997). Nanoassemblies : Toward Layered Polymeric Multicomposites. Published by : *American Association for the Advancement of Science*. 277, 1232–7.

- [495] **Martins JG, Camargo SEA, Bishop TT, Popat KC, Kipper MJ, Martins AF.** (2018). Pektin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. *Carbohydrate Polymers*. 197, 47–56.
- [496] **Cavallaro G, Lazzara G, Milioto S.** (2013). Sustainable nanocomposites based on halloysite nanotubes and pektin/polyethylene glycol blend. *Polymer Degradation and Stability*. 98, 2529–36.
- [497] **Jachimska B, Pajor A.** (2012). Physico-chemical characterization of bovine serum albumin in solution and as deposited on surfaces. *Bioelectrochemistry*. 87, 138–46.
- [498] **Dougherty DA.** (1996). Cation- π interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*. 271, 163–8.
- [499] **Lu Q, Oh DX, Lee Y, Jho Y, Hwang DS, Zeng H.** (2013). Nanomechanics of cation- π interactions in aqueous solution. *Angewandte Chemie - International Edition*. 52, 3944–8.
- [500] **Doublier JL, Garnier C, Renard D, Sanchez C.** (2000). Protein-polysaccharide interactions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 5, 202–214.
- [501] **Kirdeciler SK, Ozen C, Akata B.** (2014). Fabrication of nano- to micron-sized patterns using zeolites: Its application in BSA adsorption. *Microporous and Mesoporous Materials*. 191, 59–66.
- [502] **Samari F, Hemmateenejad B, Shamsipur M, Rashidi M, Samouei H.** (2012). Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt(II) complexes to human and bovine serum albumins: A spectroscopic approach. *Inorganic Chemistry*. 51, 3454–64.
- [503] **Topală T, Bodoki A, Oprean L, Oprean R.** (2014). Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Medicine and Pharmacy Reports*. 87, 215–9.
- [504] **Belščak-Cvitanović, Dordević V, Karlović S, Pavlović V, Komes D, Ježek D.** (2015). Protein-reinforced and chitosan-pektin coated alginate microparticles for delivery of flavan-3-ol antioxidants and caffeine from green tea extract. *Food Hydrocolloids*. 51, 361–74.
- [505] **Javier F, Nada C a, Asensio JL, A a N a a RD.** (2013). Carbohydrate-Aromatic Interactions. *Accounts of chemical research*. 46, 946–954 .
- [506] **J. Weilkamp. H.G. Karge, H. Pfeifer and W. Holderich.** (1994). Examination of the “decomposition behavior” of zeolite A in freshwater, particularly taking into consideration environmentally relevant conditions. *Zeolites and Related Microporous Materials*. 84, 2303–10.



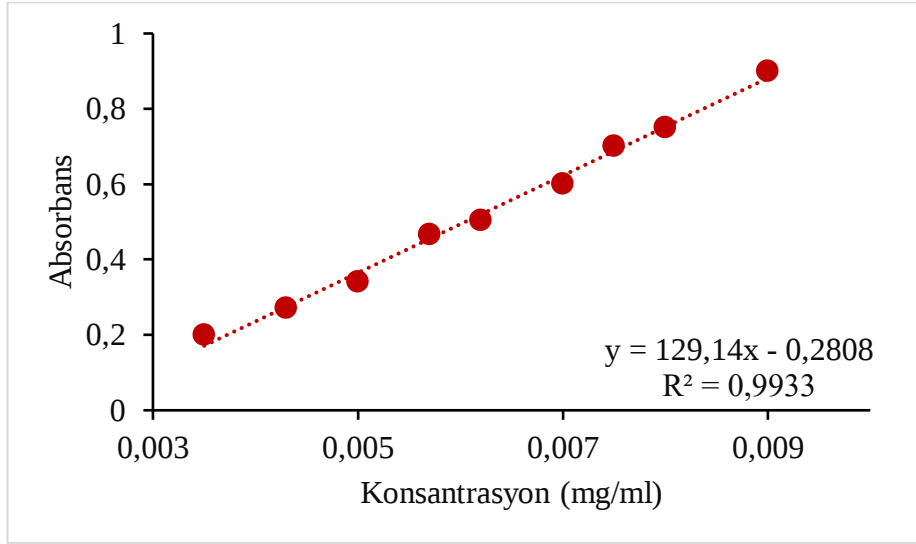


EKLER

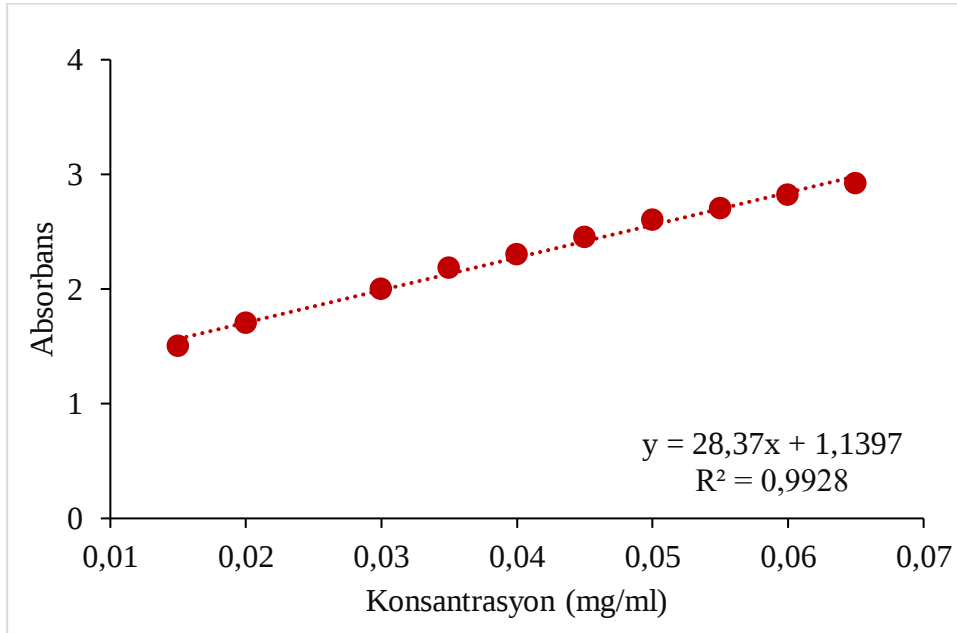
EK A : Teofilin, prokain ve BSA molekülleri kalibrasyon eğrileri.



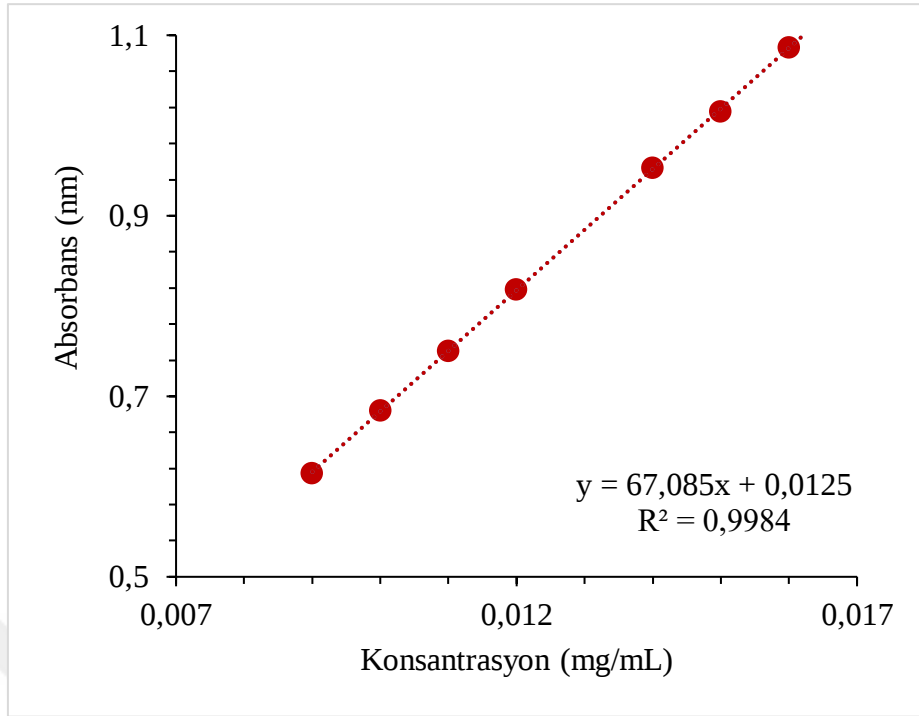
EK A : Teofilin, prokain ve BSA molekülleri kalibrasyon eğrileri



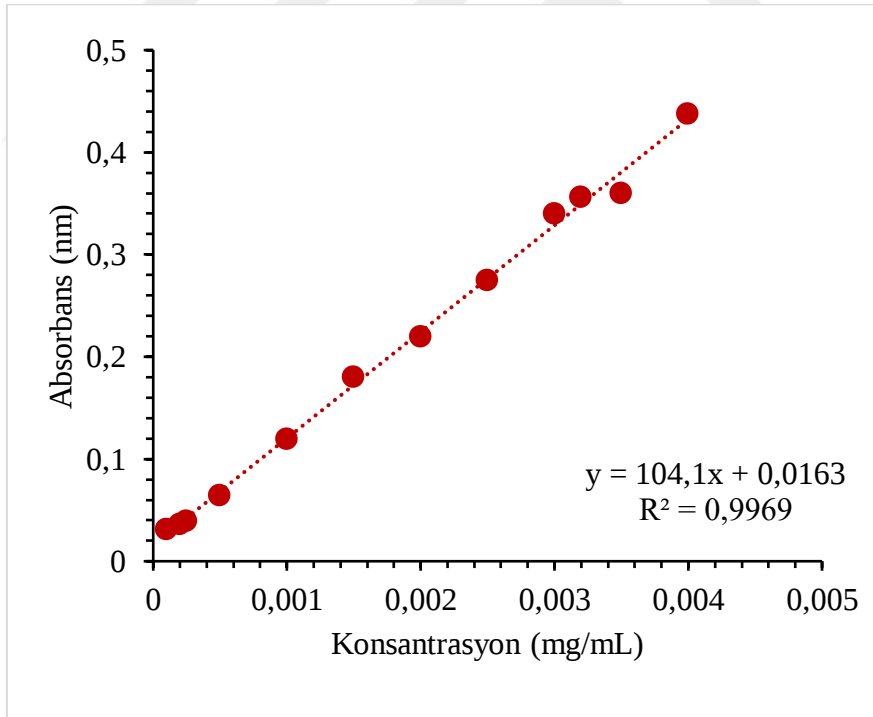
Şekil A.1 : pH 6,4 ortamı teofilin molekülü kalibrasyon eğrisi (düşük konsantrasyon).



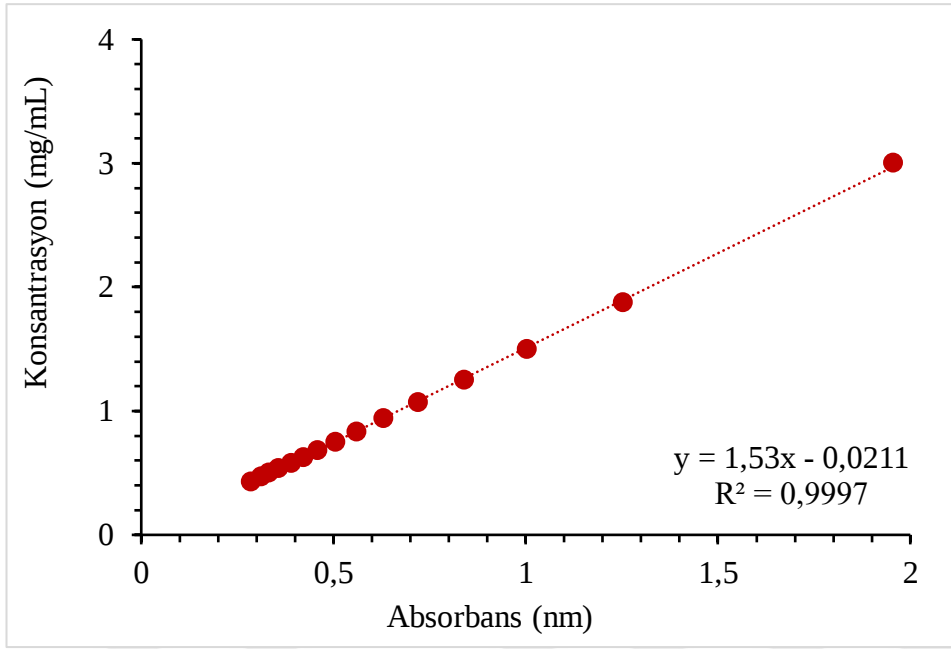
Şekil A.2 : pH 6,4 ortamı teofilin molekülü kalibrasyon eğrisi (yüksek konsantrasyon).

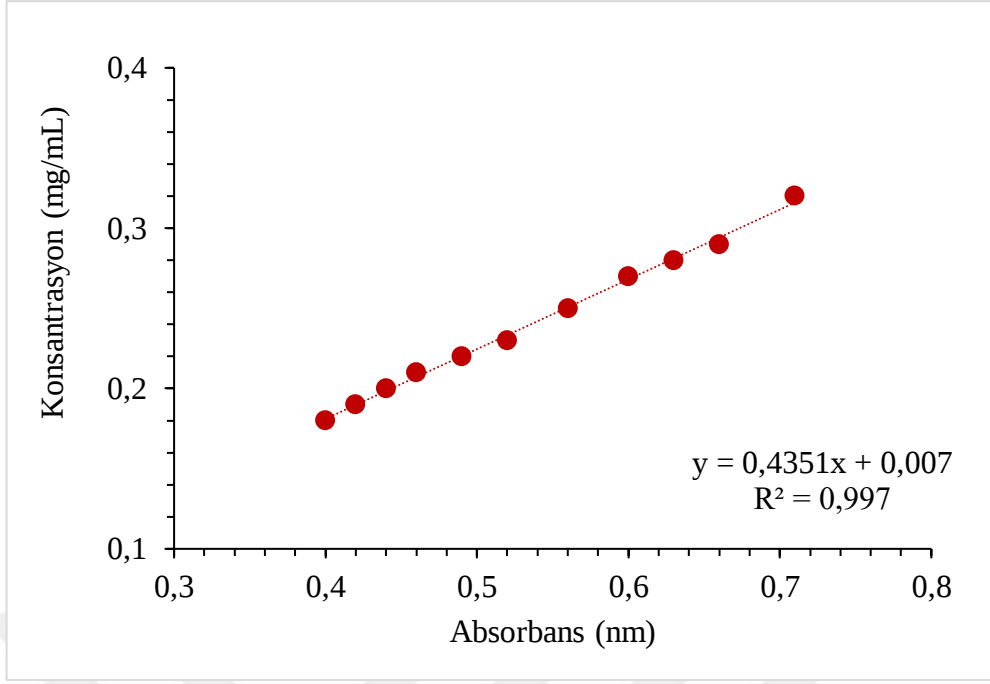


Şekil A.3 : pH 6,4 ortamı prokain molekülü yüksek absorbans değerleri için kalibrasyon eğrisi.



Şekil A.4 : pH 6,4 ortamı prokain molekülü düşük absorbans değerleri için kalibrasyon eğrisi.





Şekil A.7 : pH 4,3 ortamı BSA molekülü kalibrasyon eğrisi.



ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı: Banu KOCAAĞA

MESLEKİ DENEYİM

- 2017-2019 yılları arasında Beykent Üniversitesi'nde Öğretim Görevlisi olarak çalıştı. Bu süre içinde Akışkanlar Mekaniği ve Termodinamik dersleri verdi.

ÇALIŞTIĞI PROJELER

- **TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı 115M439–**

Kronik İnflamatuvar Deri Hastalıklarının Topikal Tedavisinde Kullanılacak Kontrollü İlaç Salım Sistemi Tasarımı: Steroid Yüklü MOF/Pektin İçeren Yara Örtüsü.

- **İTÜ BAP Projesi-**

Kontrollü İlaç Salımı için Zeolit-Pektin Kompozitlerin Hesaplamalı ve Deneysel Yöntemlerle Geliştirilmesi.

- **TÜBİTAK 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı 219S334–**

Papaverin ve/veya Lidokain Salımı Yapabilen Pektin Bazlı Üç Boyutlu Matris Jel Ortamında Mikro ve Super-Mikrovasküler Anastomozlar.

- **TÜBİTAK 1002 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı 120M370**

Kontrollü prokain salımı yapan zeolit/tiyobarbitürik asit katkılı pektin temelli yara örtüleri için *in vivo* yara iyileşmesi çalışması (Yürütücü).

ENSTRÜMENTAL ANALİZ CİHAZLARI DENEYİMLERİ

- Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC),
- Termal Gravimetrik Analiz (TGA),
- Dinamik Mekanik Analiz (DMA),
- Fourier Transform Infrared Spektrometre (FTIR),
- UV - VIS Spektrofotometre,
- UV-CD Spektrofotometre,
- Zeta Potansiyel,
- Temas Açısı,
- Reometre,
- Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).

BİLGİSAYAR/MOLEKÜLER SİMÜLASYON PROGRAMLARI

Fortran, Matlab, Materials Studio, NAMD, Pymol, VMD, AMBER.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR

- **Kocaaga B**, Kurkcuoglu O, Tatlier M, Batirel S, Guner FS. Low-methoxyl pectin–zeolite hydrogels controlling drug release promote in vitro wound healing, Journal of Applied Polymer Science, 2019, 136, 24, 47640. DOI: 10.1002/APP.47640.
- Güner OZ, Cam C, **Arabacioglu-Kocaaga B**, Batirel S, Güner FS, Theophylline-Loaded Pektin-Based Hydrogels: 1. Effect of Medium pH and Preparation Conditions on Drug Release Profile, Journal of Applied Polymer Science, 2018, 135(38) 46731. DOI: 10.1002/APP.46731.
- Sarioglu E, **Arabacioglu Kocaaga B**, Turan D, Batirel S, Guner FS. Theophylline-loaded pektin-based hydrogels. II. Effect of concentration of initial pektin solution, crosslinker type and cation concentration of external solution on drug release profile, Journal of Applied Polymer Science, 2019. DOI: 10.1002/app.48155.
- Guner, OZ, **Kocaagaa, B**, Batirel, S, Kurkcuoglu, O, Guner, FS. 2-Thiobarbituric Acid Addition Improves Structural Integrity and Controlled Drug Delivery of Biocompatible Pektin Hydrogels,

- Rodoplu, S, Celik, EB, **Kocaaga, B**, Ozturk, C, Batirel, S, Turan, D, Güner, FS. Dual effect of procaine loaded pektin hydrogels: Pain management and in vitro wound healing, Polym Bull, 2020. DOI: 10.1007/s00289-020-03210-7.
- Gulmez, F., Yercan, A., **Kocaaga, B.**, & Guner, F. S. (2020). pH-Sensitive Castor Oil/PEG-Based Polyurethane Films for Drug Delivery. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 102160. doi:10.1016/j.jddst.2020.102160
- Elif Yüce Erarslan, Rumeysa Tutar, Burçin İzbudak, Emine Alarçin, **Banu Kocaaga**, F.Seniha Guner, Serkan Emik, Ayça Bal Öztürk. Photo-curable Chitosan and Gelatine based Nanohybrid Bioinks for Extrusion-based 3D-bioprinting. Submit edildi.
- Gamze Bağımsız, **Banu Kocağa**, Mehran Aliari Miavaghi, Saime Batirel, F. Seniha Güner. Contribution of Metal Organic Frameworks (MOFs) on Pektin-based Drug Delivery Systems Prepared as Wound Dressing. The Royal Society of Chemistry. Yayına hazırlandı.
- **Kocaaga B**, Kurkcuoglu OL, Güner FS. ‘Molecular Dynamics Simulations Can Predict the Maximum Drug Concentration in Pektin Hydrogels to Maintain Controlled Release’. Yayına hazırlandı.
- **Kocaaga B**, Kurkcuoglu OL, Tatlıer M, Batirel S, Güner FS. ‘Protein Loaded Pektin-Zeolite Wound Dressing Materials: Preperation, Characterization and Structural Analysis’. Yayına hazırlanıyor.
- Aybüke Tavaslı, **Banu Kocağa**, F.Seniha Güner. “ Transdermal Diffusion of Procaine’. Yayına hazırlanıyor.
- Kurçin C, Birgili B, **Kocağa B**, Kürkçüoğlu O., Güner FS. Low methoxy pektin-borax hydrogels crosslinked with calcium for controlled drug release. Yayına hazırlanıyor.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN SUNUMLAR

- **Banu Kocağa**, Özge Kürkçüoğlu Levitas, Melkon Tatlıer, F. Seniha Güner, ‘ Effect of Loading Systems, Calcium and Zeolit Concentration on Release Charesteristics of Drug from PektinZeolit Matrice’, Poster Presentation, 46th IUPAC World Polymer Congress Istanbul, 17-21 July 2016.
- **Banu Kocağa**, Özge Kürkçüoğlu Levitas, Melkon Tatlıer, F. Seniha Güner, ‘ Çok katmanlı ilaç yüklü pektin-zeolit yara örtüsü tasarlanması’, Sözlü Sunum, 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi İzmir, 2016.
- **Banu Kocağa**, Özge Kürkçüoğlu Levitas, Melkon Tatlıer, F. Seniha Güner ‘Pektin-Zeolite Based Drug Delivery Systems as Wound Dressing’, Poster sunum, BAU International Drug Design Congress, Istanbul, October 2016.
- Özde Zeynep Güner, **Banu Arabacıoğlu-Kocağa**, F. Seniha Güner,” Synthesis and Characterization of Pektin Based Hydrogel Films: Effect of pH and Drug Loading Method on Drug Release Kinetics”, Poster Presentation, 46th IUPAC World Polymer Congress Istanbul, 17-21 July 2016.
- Cansu Cam, **Banu Kocağa**, F. Seniha Güner,” Drug-Loaded Pektin Based Wound Dressing Hydrogels: Effect of Crosslinker Ratio and Drug Amount on Release Profile “, Poster presentation, 46th IUPAC World Polymer Congress Istanbul, 17-21 July 2016.
- Özde Zeynep Güner, **Banu Kocağa**, F. Seniha Güner,”Pektin Temelli Hidrojel Filmlerde Sentez Yönteminin ve pH’ın İlaç Salım Kinetiğine Etkisi”, Poster Sunum, 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi İzmir, 2016.
- Cansu Çam, **Banu Arabacıoğlu-Kocağa**, F. Seniha Güner,” Pektin Bazlı ve İlaç Yüklü Yara Örtülerinde Kurutma Metodunun İlaç Salım Profiline Etkisi”, Poster Sunum, 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi İzmir, 2016.
- Ebru Sarıoğlu, **Banu Arabacıoğlu-Kocağa**, F. Seniha Güner ‘The Effect of Flow Properties on Drug Release Profile of Pektin-Based Hydrogels’ Poster Presentation, BAU International Drug Design Congress, Istanbul, October 2016.
- **Banu Kocağa**, Ozge Kurkcuoglu, Melkon Tatlier, F. Seniha Güner, ‘Exploring Molecular Interactions in Drug Loaded Pektin-Zeolite Based Hydrogels for Controlled Drug Delivery’, APME Conference ,Poster Presentation, Ghent, Belgium, May 2017.
- Zeynep Güner, **Banu Arabacıoğlu-Kocağa**, F. Seniha Güner, ‘Development of Sulfide Bridged Pektin Based Drug Carrier Hydrogels: Crosslinker Effect’, APME Conference, Poster Presentation, Ghent, Belgium, May 2017.
- Ebru Sarıoğlu , **Banu Arabacıoğlu-Kocağa**, F. Seniha Güner,’ Ionic Strength Effect on Drug Release for Pektin Based Hydrogels’, APME Conference ,Poster Presentation, Ghent, Belgium, May 2017.
- Nihal Olcay Dogan, Harun Kulak, **Banu Kocağa**, F.Seniha Güner, ‘Pektin-based wound dressing gels with controlled protein release’, APME Conference, Poster Presentation, Ghent, Belgium, May 2017.

- **Banu Kocaaga**, Ozge Kurkcuoglu Levitas, Melkon Tatlier, Saime Batirel, Seniha Güner ‘Pektin-Zeolite Based Wound Dressing Materials for Chronic Inflammatory Skin Diseases’. PPM Conference, Oral Presentation, İzmir, August 2017.
- **Banu Kocaaga**, Özge Kürkçüoğlu Levitas, Melkon Tatlier, F. Seniha Güner. “Protein Loaded Pektin-Zeolite Wound Dressing Materials: Preperation, Characterization and Structural Analysis ” Oral Presentation, EurosiaBbiochem, Ankara, April 2018.
- Özde Zeynep Güner, **Banu Arabacioğlu-Kocaaga**, Özge Kürkçüoğlu-Levitas, F. Seniha Güner “2-Thiobarbitürik Asit ile Tiollendirilmiş Pektin Temelli İlaç Taşıyıcı Hidrojellerin Sentezi.” Poster Presentation. EurosianBiochem, Ankara, April 2018.
- Bengi Ezgi Çelik, **Banu Kocaaga**, Fatma Seniha Güner. “Prokain Yüklendi Pektin Temelli Hidrojellerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu: Kurutma Sıcaklığı, İlaç Miktarı ve pH Parametrelerinin İncelenmesi”. Poster Presentation. EurosianBiochem, Ankara, April 2018.
- Şeniz Rodoplu, Cenk Öztürk, **Banu Kocaaga**, F. Seniha Güner. “Drug-Loaded Pektin Based Wound Dressing Hydrogels: Effect of Loading pH, Drug Amount and Drying Temperature on Release Profile”. Poster Presentation. EurosianBiochem, Ankara, April 2018.
- Ebru Sarıoğlu, **Banu Arabacioğlu Kocaaga**, F. Seniha Güner.” İlaç Yüklü Pektin Temelli Hidrojellerin Farklı Çapraz Bağlayıcı ve İyonik Kuvvet Etkisiyle İlaç Salım Davranışının Belirlenmesi ve Karakterizasyonu”. Poster Presentation. EurosianBiochem, Ankara, April 2018.
- **Banu Kocaaga**, Özge Levitas, Melkon Tatlier, Seniha Güner. ‘Protein Yüklü Pektin-Zeolit Hidrojel Yara Örtüsü Tasarımı ve Karakterizasyonu’. Sözlü sunum. UKMK-2018
- **Banu Kocaaga**, Özge Kürkçüoğlu, Seniha Güner. ‘Plastikleştirici malzemelerin pektin filmlerin kontrollü ilaç salımına etkisi’. Poster sunum. UKMK-2018.
- Şeniz Rodoplu, **Banu Kocaaga**, Cenk Rodoplu. ‘ Prokain yüklü pektin hidrojel yara örtüsü tasarımı. Yükleme pH’ ı, ilaç miktarı ve kurutma sıcaklığının salım profiline etkisinin incelenmesi.’ Poster sunum. UKMK-2018.
- Gamze Bağımsız, **Banu Kocaaga**, Mehran Aliari Miavaghi, Ahmet Sirkecioğlu, F. Seniha Güner. ‘Pektin-MOF hidrojel yara örtüsü tasarımı ve karakterizasyonu’. Poster sunum. UKMK-2018.
- **Banu Kocaaga**, F.Seniha Güner. Biyomalzemeler.. Namık Kemal Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği 8. Öğrenci Sempozyumu. Sözlü Sunum Mart, 2019.
- **Banu Kocaaga**, Özge Levitas, Melkon Tatlier, Seniha Güner. ‘İlaç - Protein Yüklü Pektin - Zeolit Hidrojel Yara Örtüsü Tasarımı ve Karakterizasyonu ‘. Sözlü Sunum. İTÜ Lisansüstü Sempozyumu. Nisan-2019.
- Aybüke Tavaslı, **Banu Kocaaga**, F.Seniha Güner. “ Transdermal Diffusion of Procaine”, İTÜ 1. Lisansüstü Sempozyumu, Nisan 2019.

- Fulya Gülmez, **Banu Kocaağa**, F.Seniha Güner. “ Controlled drug delivery from procaine loaded polyurethane film”. İTU 1. Lisansüstü Sempozyumu, Nisan 2019.
- **Banu Kocaağa**, Özge LEVİTAS, Melkon TATLIER, F. Seniha GÜNER. Developing pektin-based hydrogels for controlled drug delivery: A computational and experimental study. Oral presentation. EuroasianBiochem, Ankara, March 2020.
- Selen Canpolat, Ece Nur Özgü, Selin Serbest , **Banu Kocaağa**, F. Seniha Güner. İmmobilizing of procaine hydrochloride to ZSM-5 zeolite particles in different conditions. Poster Presentation. EuroasianBiochem, Ankara, March 2020.
- Buğra Birgili, Huriye Ceren Kurçin, **Banu Kocaağa**, F. Seniha Güner. Low methoxy pektin-borax hydrogels crosslinked with calcium for controlled drug release. Poster Presentation. EuroasianBiochem, Ankara, March 2020.
- Nergishan İyisan, Bora İrem Yıldırım, **Banu Kocaağa**, F. Seniha Güner. Pektin ve bor bileşikleri içeren hidrojel yara örtüsü tasarımı ve prokain salımı. Poster Presentation. EuroasianBiochem, Ankara, March 2020.
- Sima Yakupoğlu, Hakan Ulusoy, Pınar Demir, **Banu Kocaağa**, Güner FS. Natural Essential Oils As a Penetration Enhancer for Transdermal Drug Delivery. Poster Presentation. EuroasianBiochem, Ankara, March 2020
- **Banu Kocaağa**, F. Seniha Güner, Özge Kürkçüoğlu Levitas. Pektin Hidrojellerden Kontrollü Salım İçin Optimum İlaç Konsantrasyonunun Moleküler Dinamik Simülasyonlarıyla Tahmin Edilmesi. Sözlü Sunum. UKMK, Konya, Haziran 2021.
- Huriye Ceren Kurçin, Buğra Birgili, **Banu Kocaağa**, Hale Gürbüz, Saime Batirel, Burak Aksu, Özge Kürkçüoğlu Levitas, Fatma Seniha Güner. Boraks Katkılı Pektin Temelli Kontrollü İlaç Salımı Yapan Hidrojellerin Sentezi Ve Karakterizasyonu. Sözlü Sunum. UKMK, Konya, Haziran 2021.
- Nergishan İyisan, **Banu Kocaağa**, F. Seniha Güner. Kendini Yenileyen Selüloz Katkılı Pektin Temelli Hidrojel Yara Örtüleri. Sözlü Sunum UKMK, Konya, Haziran 2021.