

755406



755406

**DEKSTRAN HİDROJELLERİN ENZİMATİK BOZUNMA KİNETİĞİNİN
ENSTRÜMENTAL TEKNİKLERLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF ENZYMATIC DEGRADATION KINETICS OF
DEKSTRAN HYDROGELS BY INSTRUMENTAL TECHNIQUES**

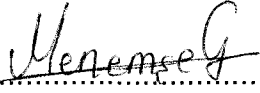
MURAT ŞİMŞEK

**Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.**

2004

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda**
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : 
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye : 
Prof. Dr. Mehlika Pulat

Üye : 
Doç. Dr. Hakan Ayhan

ONAY

Bu tez/....../..... tarihinde Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../.....2004



Prof. Dr. Ahmet R. ÖZDURAL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



Sevgili aileme

DEKSTRAN HİDROJELLERİN ENZİMATİK BOZUNMA KİNETİĞİNİN ENSTRÜMENTAL TEKNİKLERLE İNCELENMESİ

Murat Şimşek

ÖZ

Sunulan çalışmada, farklı çapraz-bağlayıcı reaktifler varlığında polisakkarit bazlı bir polimer olan dekstran ile sentezlenen hidrojellerin biyobozunurluk davranışı incelenmiş ve sonuçlar substrata-özümlü biyobozunma davranışı açısından değerlendirilmiştir.

Dekstran/çapraz-bağlayıcı karışımından dekstran hidrojellerin sentezi, dekstranın hidroksil gruplarının moleküller arası yan zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, N,N'-metilenbisakrilamid (MBAm), epiklorohidrin (ECH) çapraz-bağlayıcı reaktifleri kullanılmıştır. Reaksiyonlar, 10-40°C sıcaklık aralığında, sulu çözeltilerde, NaOH ve/veya etanol varlığında yürütülmüştür.

Disk formundaki (çap=7 mm, kalınlık=3 mm) hidrojeller, şişme çalışmaları, FTIR, TGA ve SEM ile karakterize edilmiştir. Hidrojellerin elek boyutu (ζ) ve çapraz-bağlar arası ortalama molekül ağırlığı (M_c), Floy-Rehner teorisi kullanılarak şişme değerlerinden hesaplanmıştır.

Hidrojellerin biyobozunması, plazma proteinlerinden IgG, BSA ve endodekstranaz varlığında yürütülmüştür. Jellerin bozunma hızı ağırlık kaybını ve bozunma ürünü olan oligosakkarit salımını ölçerek tayin edilmiştir. Dekstran hidrojellerin biyobozunma sırasındaki morfolojik değişimleri SEM ile incelenmiştir. Biyobozunmanın hidrojel atomik yapısındaki etkisini anlamak için FTIR spektrumları alınmıştır. Sonuçlar, dekstran hidrojellerin yığın bozunmaya uğradığını göstermiştir. Tamamen bozunma yalnızca dekstranaz varlığında gözlenmiş ve bozunma hızı dekstranaz derişiminden önemli ölçüde etkilenmiştir.

Anahtar Kelimeler: dekstran hidrojeller, biyobozunma, dekstranaz, kolona-özümlü ilaç salımı.

Danışman: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

INVESTIGATION OF ENZYMATIC DEGRADATION KINETICS OF DEXTRAN HYDROGELS BY INSTRUMENTAL TECHNIQUES

Murat Şimşek

ABSTRACT

In the presented study, biodegradation behavior of hydrogels synthesized from polysaccharide based polymer, dextran, in the presence of different crosslinking agents were investigated and the results were evaluated for substrate-specific enzymatic biodegradation.

Synthesis of dextran hydrogels from dextran/crosslinker mixtures were carried out by intermolecular side-chain reaction of dextran hydroxyl groups. Monomeric crosslinking agents have been utilized such as N,N'-methylenebisacrylamide (MBAm), epichlorohydrin (ECH) for this purpose. The reactions were carried out in aqueous solutions at 10-40°C in the presence of NaOH and/or ethanol.

Dextran hydrogels synthesized in disc form (diameter=7 mm and thickness=3 mm) were characterized by swelling studies, FTIR, TGA and SEM. Hydrogel mesh size (ζ) and average molecular weight between cross-links (M_c) were estimated from swelling data using the Flory-Rehner theory.

Biodegradation of hydrogels was accomplished in the presence of plasma proteins, BSA, IgG and endodextranase. The degradation rate of the jels was determined by measuring weight loss and the release of oligosaccharides, which are products of degradation process. Morphological changes of dextran hydrogels during the biodegradation were observed by SEM. In addition, FTIR spectra were taken in order to understand the effect of biodegradation on the atomic stucture. The result have proved that the dextran hydrogels shows bulk degradation profile. Complete degradation was observed only in the presence of dextranase and the degradation rate was strongly affected by the concentration of dextranase.

Keywords: dextran hdrogels, biodegradation, dextranase, colon-specific drug delivery.

Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe University, Chemical Engineering Department

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, gerek sabırlı, titiz ve anlayışlı yaklaşımıyla çalışmalarımı yönlendiren ve gerekse bizzat aktif olarak çalışmalarımın yer alarak bana ivme kazandıran ve bana olan her türlü emeği ve katkılarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle bu çalışmanın başlangıcında vermiş olduğu önemli katkılarından dolayı değerli arkadaşım Alper DOĞAN'a, yine çalışmalarımın çeşitli aşamalarındaki değerli katkılarından dolayı laboratuvar arkadaşlarım Ayşe Karakeçili'ye, Pelin AGİ'ye, Hilal TÜRKÖĞLU'na ve Sezin ERTAN'na teşekkürlerimi sunarım.

Tüm öğrenim hayatım süresince maddi ve manevi her türlü varlıklarını ortaya koyarak her zaman yanımda olan ve bir çiçek gibi filizlenip açmamı sağlayan, sevgili aileme sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Hidrojenlerin radyasyonla sentezi sırasındaki yardımlarından ötürü Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü'nden Doç. Dr. Murat ŞEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Dekstanaz varlığındaki biyobozunma çalışmalarının yürütülmesindeki değerli katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim dalı laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım belli aşamalarındaki katkılarından dolayı Eren BEŞKARDEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yazılması aşmasındaki değerli katkılarından dolayı sevgili dostum Ahmet YAŞAR'a ve kardeşim Dilek'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | |
|--|-----------|
| ÖZ | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | iv |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | ix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xi |
| 1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI | 1 |
| 2. TEMEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Dekstran Yapısı ve Özellikleri | 3 |
| 2.2. Hidrojeller | 5 |
| 2.2. 1. Tanım ve genel özellikler | 5 |
| 2.2.2. Hidrojel türleri | 6 |
| 2.2.3. Hidrojel sentezinde yeni yaklaşımlar | 8 |
| 2.2.3.1 Kimyasal çapraz bağlama | 8 |
| 2.2.3.2. Fiziksel olarak çapraz bağlama | 18 |
| 2.3. Biyobozunma..... | 24 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 29 |
| 3.1. Kimyasal Maddeler | 29 |
| 3.2. Hidrojel Sentezi | 30 |
| 3.3. Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları | 31 |
| 3.3.1. Şişme Deneyleri | 31 |
| 3.3.2. Çapraz Bağlar Arası Molekül Ağırlığı (M_c) Tayini..... | 32 |
| 3.3.3. FTIR Analizi | 32 |
| 3.3.4. Termal Analiz | 33 |
| 3.3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Morfolojik Analizi | 33 |
| 3.4. Hidrojellerin Biyobozunma Davranışının İncelenme | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.1. BSA Stok Çözeltisinin Hazırlanması | 34 |
| 3.4.2. IgG Stok Çözeltisinin Hazırlanması | 34 |
| 3.4.3. Dekstranaz Stok Çözeltisinin Hazırlanması | 34 |
| 3.4.4. Biyobozunmanın Oligosakkarit Salımı İle İncelenmesi | 34 |
| 4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI | 36 |
| 4.1. Dekstran Bazlı Hidrojellerin Sentezi | 36 |
| 4.1.1. Çapraz bağlanma mekanizması | 37 |
| 4.1.2. Çapraz bağlayıcı reaktif tipi ve oranının hidrojel sentezine etkisi .. | 39 |
| 4.2. Dekstran Hidrojellerin Karakterizasyonu | 41 |
| 4.2.1. Hidrojellerin şişme deneyleri ile ilgili sonuçlar | 41 |
| 4.2.2. Şişme Kinetiğinin Matematiksel Analizi | 42 |
| 4.2.3. Mc tayini ile ilgili sonuçlar | 45 |
| 4.2.4. Hidrojellerin SEM ile Analizi | 47 |
| 4.2.5. FTIR Analizi | 48 |
| 4.2.5.1. Hidrojellerin FTIR spektrumları | 48 |
| 4.2.6. Termal Analiz Sonuçları | 52 |
| 4.2.7. Dekstran hidrojellerin biyobozunma davranışlarının incelenmesi ile ilgili sonuçlar .. | 54 |
| 4.2.7.1. Dekstranaz varlığında biyobozunma | 55 |
| 4.2.7.2. IgG varlığında biyobozunma | 60 |
| 4.2.7.3. BSA varlığında biyobozunma | 60 |
| 4.2.7.4. Biyobozunmanın FTIR spektrumlarıyla değerlendirilmesi | 61 |
| 4.2.7.5. Biyobozunmanın SEM analizi ile incelenmesi | 61 |
| 4.2.7.6. Biyobozunma sonuçlarının topluca değerlendirilmesi | 63 |
| 5. GENEL SONUÇLAR | 65 |
| 6. KAYNAKLAR DİZİNİ | 69 |
| 7. EKLER | 79 |
| EK 1. Şişme Parametrelerinin Hesaplanması | 79 |

| | |
|---|----|
| EK 2. Çapraz Bağlar Arası Molekül Ağırlığının (M_c) Hesaplanması | 81 |
| EK 3. Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması | 84 |
| EK 4. Hidrojellerin Biyobozunma Sonucu Ağırlık Kaybı ile İlgili Örnek Hesaplama | 87 |



SİMGELER ve KISALTMALAR

SİMGELER

| | |
|--------------|---|
| M_w | Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı |
| M_n | Sayıca ortalama molekül ağırlığı |
| M_c | Çapraz bağlar arası molekül ağırlığı |
| ζ | Elek boyutu (mesh size) |
| D_0 | Proteinin sudaki difüzyon katsayısı |
| ρ_w | Suyun yoğunluğu |
| $\rho_{p,r}$ | Hidrojinin çapraz bağlanma sonrası (relaxed durumda) sudaki yoğunluğu |
| $\rho_{p,s}$ | Hidrojinin şişme sonrası sudaki yoğunluğu |
| $\rho_{p,d}$ | Hidrojinin kuru halde yoğunluğu |
| $w_{p,r}$ | Hidrojinin relaxed durumda ağırlığı |
| $w_{p,s}$ | Hidrojinin şişmiş durumda ağırlığı |
| $w_{p,d}$ | Hidrojinin kuru ağırlığı |
| $v_{g,r}$ | Çapraz bağlanma sonrası polimer hacmi |
| $v_{g,s}$ | Şişme sonrası polimer hacmi |
| v_p | Kuru polimer hacmi |
| $v_{2,r}$ | Relaxed durumunda hacim kesri |
| $v_{2,s}$ | Şişme durumunda hacim kesri |
| t | Zaman |
| M_t | Polimerden t anında absorplanan veya desorplanan kütle |
| M_∞ | Polimerden dengede ($t=+\infty$) absorplanan veya desorplanan kütle |
| R^2 | Regresyon katsayısı |
| C | Konsantrasyon |

KISALTMALAR

| | |
|------------------|--|
| Dx | Dekstran |
| MBA _m | N,N'-Metilen-bis-akrilamid |
| ECH | Epiklorohidrin |
| GA | Glutaraldehit |
| BSA | Sığır Serum Albumin |
| IgG | Sığır Immünoglobulin G |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| EWC | Equilibrium water content (denge su içeriği) |
| S | Su içeriği |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| TGA | Termogravimetric Analyzer |
| SEM | Scanning Electron Microscope |
| ÇR | Çapraz-bağlayıcı reaktif |
| IPN | Interpenetrating network |
| UV | Ultra Violet |
| GMA | Glisidil metakrilat |
| PEG | Poli(etilen glikol) |
| LCST | Lower Critical Temperature Solution |
| PLA | Poli(laktik asit) |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Sekil</u> | | <u>Sayfa</u> |
|--------------|--|--------------|
| 2.1. | Dekstranın GMA ile reaksiyonu | 9 |
| 2.2. | Dekstran-MA (A). Dekstran-HEMA (B) ve Dekstran-Laktat-HEMA yapıları. | 12 |
| 2.3. | Dekstran-HEMA ve Dekstran-HEMA-Laktat hidrojellerin oluşum ve bozunma reaksiyonlarının şematik gösterimi | 12 |
| 2.4. | Alkol, amin ve hidrazid grupları içeren polimerlerin aldehitlerle yürütülen çapraz-bağlanma reaksiyonları | 13 |
| 2.5. | Passerini ve Ugi kondenzasyon reaksiyonları | 16 |
| 2.6. | Polirotaksen ile çapraz bağlanmış PEG hidrojellerin hazırlanması | 16 |
| 2.7. | Hibrid hidrojel ana zincirlerinin ve His-etiketlenmiş yumak-yumak protein bağlanmasının şematik gösterimi. | 23 |
| 2.8. | Yüzey ve yığın aşınmalarının şematik gösterimi | 26 |
| 3.1. | Çalışmada kullanılan polimer ve çapraz bağlayıcı reaktiflerin kimyasal yapıları | 30 |
| 3.2. | Oligosakkarit salım miktarının belirlenmesi amacıyla elde edilen glukoz kalibrasyon grafiği | 35 |
| 4.1. | Şekil 4.1. Dekstranın çapraz-bağlanma mekanizmaları | 39 |
| | (a) MBAm ile çapraz-bağlanma | |
| | (b) ECH ile çapraz-bağlanma | |
| 4.2. | Dekstran hidrojellerin şişme eğrileri | 41 |
| 4.3. | Hidrojellere ait t/S-t eğrileri (noktalar deneysel verileri, düz doğrular ise modeli ifade etmektedir). | 44 |
| 4.4. | Hidrojellere ait SEM fotoğrafları | 48 |
| | a)Dx-ECH hidrojel (Büyütme x250) | |
| | b)Dx-ECH hidrojel (Büyütme x650) | |
| | c)Dx-MBAm hidrojel (Büyütme x250) | |
| | d)Dx-MBAm hidrojel (Büyütme x650) | |
| 4.5. | Dekstran polimerine ait FTIR spektrumu | 49 |
| 4.6. | MBAm, Dx-MBAm FTIR spektrumları..... | 49 |
| 4.7. | ECH, Dx-ECH FTIR spektrumlar | 50 |
| 4.8. | Şekil 4.8. TGA analizine ait termogramlar | 53 |

| | | |
|--------|---|----|
| | a) Dekstran polimeri | |
| | b) Dx-MBAm | |
| | c) Dx-ECH | |
| 4.9. | Hidrojellere ait gravimetrik bozunma eğrileri | 56 |
| | a)Dekstran-ECH hidrojel | |
| | b)Dekstran-ECH-etanol hidrojel | |
| 4.10. | Dekstranaz derişiminin dekstran hidrojellerin başlangıç bozunma hızına etkisi | 58 |
| 4.11. | Hidrojellerin oligosakkarit salım eğrisi | 59 |
| | a) Dekstran-ECH | |
| | b) Dekstran-ECH+etanol | |
| 4.12.. | Biyobozunma sırasında dekstran-ECH hidrojellere ait SEM fotoğrafları | 63 |
| | a) Biyobozunmanın 5. saatinde hidrojel yüzeyi | |
| | b) Biyobozunmanın 25. saatinde hidrojel yüzeyi | |
| | c) Biyobozunmanın 40. saatinde hidrojel yüzeyi | |



ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 4.1. Çapraz bağlayıcı reaktif tipi (ÇR) ve miktarı | 40 |
| 4.2. Hidrojel sentezi için sıcaklık programı | 40 |
| 4.3. Dekstran hidrojeller için hesaplanan şişme parametreleri ve deneysel EWC değerleri | 44 |
| 4.4. Çalışma kapsamında hazırlanan dekstran hidrojellerin ağ yapı özellikleri | 46 |
| 4.5. N,N ¹ -metilen-bis-akrilamid (MBAm) ve Dx-MBAm hidrojeline ait FTIR spektrum verileri ve değerlendirilmesi | 50 |
| 4.6. Epiklorohidrin (ECH) ve Dx-ECH hidrojeline ait FTIR spektrum verileri ve değerlendirilmesi | 51 |
| 4.7. Dekstran hidrojeller için termal analiz sonuçları | 54 |
| 4.8. IgG varlığında biyobozunma ile ilgili sonuçlar | 60 |
| 4.9. BSA varlığında biyobozunma ile ilgili sonuçlar | 61 |

1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Bir polisakkarit olan dekstran farklı reaktiflerle çapraz bağlanarak hidrojel formuna dönüştürülebilmektedir. Doğal bir polimer olması, istenilen molekül ağırlığında ve dağılımında elde edilebilmesi ve bozunma ürünlerinin toksik olmaması nedeniyle bir mühendislik polimeri olarak geniş uygulama alanına sahiptir (Hennink ve ark., 1997, Brøndsted ve ark., 1998, De Jong ve ark., 2001). Çeşitli araştırma grupları tarafından yürütülen çalışmalarda, dekstran hidrojellerin, fonksiyonel grup içeren çapraz bağlayıcı reaktiflerle çapraz bağlanması sonucu sentezlenebileceği görülmüştür. Hovgaard ve Brøndsted (1995) dekstranı dimetisulfoksit varlığında 1,6-hekzandiizosiyanat ile çapraz bağlayarak hidrojel yapıları elde etmişlerdir. Bazı araştırmacılar da, dekstranı doğrudan çapraz bağlamak yerine glisidil metakrilat (Van Dijk-Wolthuis ve ark., 1995) ve metakrilat türevli (Franssen ve ark., 1997) ya da vinil grubu taşıyan (Kim ve ark., 1999) dekstranları sentezlemişlerdir. Bir diğer grup araştırmacı ise dekstran türevli yapıların başlatıcı ve çapraz bağlayıcı ajan varlığında serbest radikal polimerizasyonu veya γ -radyasyon polimerizasyonu ile dekstran hidrojelleri sentezlemişlerdir. Son yıllarda, dekstranın doğrudan çapraz bağlanması ile hidrojel sentezi yöntemi pek çok araştırmacı tarafından en sık başvurulan yöntem olmuştur. Güner ve ark. (2001), farklı fonksiyonel grup içeren çapraz-bağlayıcı reaktiflerle dekstranı doğrudan çapraz bağlayarak hidrojelleri sentezlemişlerdir.

Dekstran hidrojelleri özellikle kolona-özgü ilaç salımında çeşitli proteinlerin jel yapı içerisine immobilizasyonu ve biyobozunma sonucu salımında kullanılmaktadır (Hennink ve ark., 1997, Franssen ve ark., 1997). İmren (2003) tarafından yapılan çalışmada N,N'-metilenbisakrilamid (MBA), epiklorohidrin (ECH) ve glutaraldehit (GA) çapraz bağlayıcı reaktiflerinin değişik oranlarıyla 70.000 Dalton molekül ağırlığına sahip "klinik dekstran" çapraz bağlanmış ve hazırlanan hidrojellerden BSA ve IgG'nin kolona-özgü salımları incelenmiştir. Sunulan bu tez çalışmasında, yukarıda açıklanan çalışmanın devamı olarak, kolona-özgü protein salım sistemlerinde kullanılması uygun bulunan dekstran hidrojellerin biyobozunma kinetiğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Biyobozunma, malzemenin basit hidroliz veya biyolojik ortamda, mevcut olan enzim veya organizmalar ile son ürünlere dönüştürülmesi olarak tanımlanmaktadır. Biyobozunma hidrolizle başlayabilir, fakat enzimle etkileşebilecek yüzey alanı arttıkça enzimatik bozunma daha baskın hale gelir (Vercauteren ve ark., 1990). Vücutta mevcut bazı enzimler bir kısım protein ve polisakkaritlerin bozunması için kullanılıyorsa bu enzimatik bozunma, "substrata-özgü" bozunma olarak tanımlanır ve özellikle kolona özgü ilaç salım sistemlerinde kullanılacak taşıyıcı matrisin geliştirilmesine çok önemli bir etkidir (Schacht ve ark., 1988). Dekstran hidrojeller için, kolonda mevcut genus *Bacteroides*'ler tarafından üretilen dekstranaz enzimi tarafından "substrata-özgü" bozunma gerçekleşmektedir.

Bu tez kapsamında, dekstran hidrojellerin biyobozunma davranışı, dekstranaz enzimine paralel olarak, plazma proteinlerinden BSA ve IgG varlığında da gerçekleştirilmiştir. Bozunma kinetiği, dekstranın enzimatik bozunması süresince oluşan oligosakkarit salımının spektrofotometrik tayini, gravimetik olarak kütle kaybının tayini, FTIR ile atomik yapıdaki değişimin belirlenmesi ve SEM ile morfolojik yapı değişimlerinin incelenmesi şeklinde yürütülmüştür. Hidrojel türü ve dekstranaz enzim derişimi; çalışmada incelenen parametrelerdir.

Çalışmanın sonuçları, dekstran hidrojellerin biyobozunmasının ana zincir üzerinden gerçekleştiğini ve dekstranaz varlığında en etkin olduğunu göstermiştir.

2. TEMEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan çalışmanın temelini oluşturan konulara ilgili literatür bilgisi üç ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde, dekstran yapısı ve özellikleri hakkında bilgi verilmiştir. İkinci bölümde, genel anlamda hidrojellerin tanımı ve özelliklerine değinilmiş, türleri ve çapraz bağlanma mekanizmaları açıklanmıştır. Son bölümde ise biyobozunmayla ilgili literatür bilgisine yer verilmiştir.

2.1 Dekstran Yapısı ve Özellikleri

Dekstran, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 bakterisi tarafından üretilen bir polisakkarittir. Dekstranlar değişik oranlarda 1-2- α , 1-3- α veya 1-4- α bağlarını içeren mikrobiyal 1-6- α -D glukozların bir ailesi olup üç sınıfa ayrılırlar. 1. sınıf dekstranlar en büyük grubu oluştururlar ve C-2 ve C-3 veya C-4 pozisyonunda dallanmalar olan 1-6- α - bağlı ana zincir yapısı belirleyici özellikleridir. 2. sınıf dekstranlarda buna ek olarak ana zincir üzerinde 1-3- α - bağları rastgele dağılmıştır ve 1-3- α bağlı dallanmalar belirleyici özellikleridir. 3. sınıf dekstranlar ise, 1-3- α - bağlı ana zincir yapısına sahiptirler ve 1-6- α - bağlı dallanmalar vardır. Ham dekstran yüksek ortalama molekül ağırlığına sahiptir ($M_w=3.5-5.10^7$ dalton). Klinik uygulamalarda dekstran asidik koşullarda hidrolize uğratılarak ortalama molekül ağırlığı 100.000 dalton'un altına düşürülür. Klinik dekstran yaklaşık olarak %95 α -1,6 ve %5 α -1,3 bağlarını içerir. α -1,6 bağının bu yüksek oranı dekstranı lineer bir molekül yapar (Walker, 1978).

Dekstran 1943'den beri klinik amaçlar için kullanılmaktadır. Çözünür yapıdaki dekstran, epiklorohidrin ile çapraz bağlandıktan sonra; ayırma, saflaştırma ve proteinlerin molekül ağırlığının düzenlenmesi gibi pek çok kromatografik uygulamada kullanılmaktadır (Klotz ve Kromer, 1987).

Dekstran çözeltileri (ağırlıkça %0.6-1) dolaşan kan hacminin azalması (hypovolemia) durumunda plazma genişletici olarak kullanılmaktadır. Kolloidal ozmotik basıncı koruyarak, kan hacmini artırır, kardiyak çıkışı artırarak da, periferik kan çıkışı artırır ve organ canlılığını korur. Son dönemlerde, dekstran, toplardamar trombozu ve pulmoner pıhtıyı (akciğerle ilgili) önlemek amacıyla antitrombotik ajan olarak da kullanılmaktadır.

Dekstranın biyolojik özellikleri molekül ağırlığının bir fonksiyonudur ve dekstran molekül ağırlığına bağlı olarak vücuttan atılır. 15.000 daltondan düşük molekül ağırlıklı dekstranın yarı ömrü iki saattir ve çok kısa bir zamanda böbreklerden filtre edilir. Yüksek molekül ağırlıklı dekstran (40.000-60.000 dalton) böbrelerden daha yavaş filtre edilir ve yarılanma ömrü 10-42 saattir. Bu yüksek molekül ağırlıklı dekstranlar intravenöz uygulamadan sonra vücutta birikir, yalnızca %50-70'i 48 saat içinde üre ile atılır. %2-10'luk kısmı ise dışkı yoluyla atılır.

Dekstranın klinik uygulamalarda tercih edilmesi, geniş molekül ağırlığı dağılımı, toksik olmayışı, vücuttan kolaylıkla atılması, polar organik çözücülerde çözünebilmesi, kimyasal modifikasyona olanak tanınması ve biyoyumlu olması gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Özellikle 40.000-70.000 dalton molekül ağırlığındaki dekstranlar 'klinik dekstran' olarak tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır.

Dekstran, kolonda bulunan dekstranaz enziminden dolayı kolona-özgü salımda kullanılmaktadır. Kolona-özgü ilaç salım sistemlerinde dekstran kullanımına ilişkin ilk makale Völker (1962) tarafından yazılmıştır. Bu çalışmada, dekstran konjugatı sentezlenmiş ve uzun süreli salımın sağlanabileceği gösterilmiştir. Dekstran konjugatların kolona-özgü ilaç salımında kullanımı ile ilgili benzer bir çalışma da Harboe ve ark. (1989a) tarafından yapılmıştır. Dekstran-naproksen konjugatları bu amaçla sentezlenmiş ve ilaç salımı tavşanlarda incelenmiştir. Larsen ve ark. (1989) tarafından dekstranaz ve estereaz enzimleriyle kolonda parçalandıktan sonra ilacı salan dekstran ön-ilaç sentezlenmiş ve *in vitro* salımı incelenmiştir. Salımın, çekum ve kolon ortamında, pH 7.4 tamponuna ve ince barsak ortamına göre 15-17 kat daha hızlı olduğu görülmüştür. Domuzlarda yapılan *in vivo* salım deneylerinde; naproksenin sulu çözeltisi ile dekstran-naproksen ester ön-ilaçlarının oral kullanımdan sonraki biyoyararlanımları tayin edilmiştir. Sulu çözelti ile kıyaslandığında ön-ilaçların biyoyararlanımının %100'e yakın olduğu görülmüştür. Ancak ön-ilaç olarak uygulanan formülasyonda kan seviyesinde 2-3 saatlik bir gecikme süresi olmuştur. Larsen ve Johansen (1985) tarafından yapılan bir çalışmada ise metronidazol dekstran ön-ilacı hazırlanmış ve metronidazolmonosüksinat-dekstran konjugatının bozunmasına paralel olarak metronidazol salımı incelenmiştir.

Hidrofilik polimerlerin, iyonik etkileşimlere dayalı olarak (Rowley ve ark., 1999) ve fiziksel çapraz bağlayıcı gibi davranan kristalitlerin oluşumu (Guzman ve ark., 1992) gibi fiziksel yollarla çapraz bağlanabileceği önerilmiştir. Stenekes ve ark., (2001), (L)- ve (D)-laktik asit oligomerlerini dekstrana aşılıyarak kristalizasyon/çöktürme ile mikroküre formunda dekstran hidrojelleri sentezlemiştir. Düşük molekül ağırlıklı dekstran ($M_w = 6\ 000\ \text{g/gmol}$) kullanılarak yapılan sentez çalışmasında, çökme hızının klinik dekstrana ($M_w = 40\ 000$ ve $M_w = 70\ 000\ \text{g/gmol}$) oranla daha hızlı olduğu görülmüş ve bu yöntemle göre dekstran hidrojellerin sentezlenmesi amacıyla düşük molekül ağırlıklı dekstranın tercih edilmesi gerektiği önerilmiştir.

2.2. Hidrojeller

Çalışmanın bu kısmında genel olarak hidrojellerin tanımı ve özellikleri, hidrojel türleri ve hidrojellerde çapraz bağlanma mekanizmalarına değinilmiştir.

2.2. 1. Tanım ve genel özellikler

Hidrojeller üç-boyutlu, hidrofilik, çok miktarda su veya biyolojik sıvı absorblayabilen polimerik ağ yapılarıdır. Bir ya da daha çok monomerin polimerizasyonu ile hazırlanırlar ve ana zincirler arasında kimyasal veya çapraz bağların varlığından dolayı çözünmezdirler. Hidrojeller sahip oldukları üstün özellikler sayesinde son 30 yıldır ilgi odağı olmuşlardır (Peppas ve Mongia, 1997).

Hidrojeller özellikle tıp ve eczacılık alanında olmak üzere geniş uygulama alanına sahiptirler (Peppas ve Langer, 1994). Diğer sentetik yapılara göre canlı dokulara daha çok benzemektedirler. Bu özelliği hidrojellerin yüksek su içeriğinden, yumuşak ve elastik yapısından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, yüksek su içeriği hidrojellerin biyoyumluluğunu arttırmaktadır. Bu nedenle hidrojeller biyosensörler için membran, kontak lensler, yapay deri materyali, yapay kalpler için astar, ilaç salım sistemleri, implantlar, enzimlerin immobilizasyonu, gıda işleme teknolojisi, elektroforez, protein ayırma ve saflaştırma, yara örtü materyali ve süper absorbentler gibi alanlarda kullanılmaktadırlar.

2.2.2. Hidrojel türleri

Hidrojeller yan grupların doğasına bağlı olarak, mekanik ve yapısal özelliklerine göre veya hazırlama yöntemlerine göre sınıflandırılabilirler. Hazırlama yöntemlerine göre homopolimer, kopolimer, çoklu polimerler ve IPN (İnterpenetrating network≡birbiri içine girmiş ağ yapılar) hidrojeller olmak üzere dört tür hidrojel mevcuttur. Homopolimer hidrojeller tek hidrofilik monomerin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Kopolimer hidrojeller ise iki monomerin çapraz bağlanmasıyla hazırlanırlar, ancak monomerlerden biri hidrofilik yapıda olmalıdır. Çoklu polimer hidrojeller, iki yada daha fazla komonomerin reaksiyonuyla oluşur. IPN hidrojeller ise çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak birleşmesiyle hazırlanmaktadır.

Hidrojeller iyonik yapılarına bağlı olarak, nötral (yüksüz), anyonik (negatif yüklü), katyonik (pozitif yüklü) ve amfolitik hidrojeller olarak, yapısal ve mekanik özelliklerine göre amorf, yarı kristalin, hidrojen bağlı yapılar, süpermoleküler yapılar ve hidrokolloidal yapılar olarak sınıflandırılabilirler.

Hidrojeller fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki farklı şekilde hazırlanabilirler. Her iki yöntemde de monomerlerin çapraz bağlanmasıyla hidrojel ağı meydana getirilir. Kimyasal yöntemle çapraz bağlamada kovalent bağlar etkili olabileceği gibi, fiziksel çapraz bağlamada hidrojen bağları, elektrostatik güçler gibi faktörler etkilidirler. Fiziksel çapraz bağlı jeller kalıcı değildir. Yani ısıtma yoluyla polimer çözeltilerine dönüştürülebilirler. Tam tersine kimyasal çapraz bağlı jeller ise kalıcı özelliğe sahiptirler.

Hidrojeller dış ortam koşullarına bağlı olarak da değişen şişme davranışları gösterebilirler. Bu polimerler, fizyolojik duyarlı hidrojeller (akıllı biyomalzemeler) olarak adlandırılırlar (Parker ve ark., 1988). Hidrojellerin şişmelerine sıcaklık, pH, iyonik güç, elektromanyetik radyasyon, elektriksel alan, çözelti konsantrasyonu, ışık ve ses gibi faktörler etki edebilirler. Çevreye duyarlı hidrojeller içlerinde buldukları dış ortama cevap verme yeteneğine sahiptirler. Şişme davranışlarında, ağ yapılarında, geçirgenlik veya mekanik dayanıklılıklarında, etraflarındaki sıvının iyonik gücüne, pH'ına ve sıcaklığa bağlı olarak değişimler meydana gelir (Peppas, 1991).

Çevresel uyarılara verilecek cevaplar ise faz, şekil, optik özellikler, mekanik özellikler, elektriksel alan, yüzey enerjileri, reaksiyon hızları, geçirgenlik hızları gibi değişimler şeklinde olabilir. Uyarıya karşı keskin cevaplar oluştuğunda polimer sistemlerinin pek çok özelliği değişir. Bir hidrojel uyarılarak büzüştüğünde, gözeneklerindeki suyu atacak, opaklaşacak, daha sıkı bir yapıya kavuşacaktır ve boyutu küçülecektir. Hidrojeller üzerinde en çok çalışılan uyarı-cevap polimerleridir ve son 20 yıldır bu uygulamalar üzerinde çalışılmaktadır (Dagani, 1997).

pH-duyarlı hidrojeller, pH değişimine bağlı olarak jel özelliklerinin değiştiği ve pH'a bağlı şişme davranışı gösteren iyonik yapılardır. Bu iyonik yapılar asidik veya bazik asılı gruplar içerirler (Barannon ve Peppas, 1990). Uygun pH ve iyonik güce sahip sulu ortamda asılı gruplar iyonlaşabilir ve jelde sabit elektrik alan oluştururlar. Elektrostatik itme kuvvetlerinin sonucu olarak ağ yapıya çözücü girişi artar (Yu ve ark., 1997). pH-duyarlı hidrojeller, monomer yapının uygun çapraz bağlayıcı ajan varlığında çapraz bağlanma reaksiyonu ile veya başlatıcı eklenerek (genelde serbest radikal başlatıcı) ve UV ışık uygulanmasıyla sağlanan başlatıcı bozunma reaksiyonuyla (Selby, 2000) ve reaktif gruplar içeren doğrusal polimerlerin bifonksiyonel çapraz bağlama ajanı ile kimyasal çapraz bağlanmasıyla (Rothstein, 2000) sentezlenirler. Ayrıca; pH-duyarlı hidrojeller, birbirleriyle fiziksel olarak karışmış iki çapraz bağlı ağdan oluşan IPN yapıda (Klotz, 1985), iyonik kuvvetlerin bir arada tuttuğu anyonik ve katyonik polimerlerin fiziksel çapraz bağlanmasıyla ve nötral hidrojellerin hidroliziyle de sentezlenebilirler.

İyonik hidrojeller, yüzey pH'ının değişimi sonucu olarak denge ve şişme davranışlarında ani veya aşama aşama değişiklikler gösteren, karboksilik asit veya sülfonik asit gibi asılı gruplara sahip polimerik ağlar içerirler. Araştırılan ilk iyonik hidrojeller arasında akrilik asit bazlı veya metakrilik asit bazlı jeller vardır. Bu jellerin denge şişme derecesinin pH değişimine duyarlı olduğu gözlenmiş ve genellikle çözeltinin pH'ı yükseltildiğinde jellerin şişmesinin arttığı gözlenmiştir. Bu özellikleri dolayısıyla pH-duyarlı hidrojeller biyotıp alanında, örneğin diş yapıştırıcılar, proilaçlar, kontrollü salım sistemleri ve biyouyumlu malzemeler gibi geniş uygulama alanına sahiptirler (Oppermann, 1992).

Sıcaklığa-duyarlı hidrojeller içlerinde buldukları sıvı ortamdaki sıcaklığın değişimiyle şişme veya büzüşme yeteneği gösteren yapılardır. Sıcaklığa-duyarlı hidrojeller, pozitif veya negatif duyarlı sistemler olarak sınıflandırılabilirler. Pozitif sıcaklık duyarlı bir hidrojel üst kritik çözelti sıcaklığına (UCST) sahiptir. Bu tür hidrojeller UCST'nin altındaki sıcaklıklarda kasılırlar. Negatif sıcaklık duyarlı hidrojeller ise alt kritik çözelti sıcaklığına (LCST) sahiptirler. Bu hidrojeller ise LCST'nin üzerindeki sıcaklıklarda kasılırlar.

Sıcaklığa-duyarlı hidrojellerle ilgili ilk araştırma Tanaka ve grubu (1978) tarafından yapılmıştır. Negatif duyarlı hidrojel için en iyi örnek PNIPAAm'dır. Hirotsu ve arkadaşları (1987) çapraz bağlı PNIPAAm ile çalışmışlar ve 34.3°C'de LCST'li PNIPAAm sentezlemişlerdir. Ayrıca jel içine az miktarda kopolimer katarak LCST değerini arttırmışlardır.

2.2.3. Hidrojel sentezinde yeni yaklaşımlar

Bu bölümde özellikle biyolojik ortamlarda kullanılacak hidrojellerin sentezi için geliştirilen yeni çapraz-bağlama tekniklerine yer verilmiştir. Bu teknikler açıklanırken çalışma kapsamında hazırlanan hidrojel olması nedeniyle dekstran hidrojellere ağırlıklı olarak değinilmiştir.

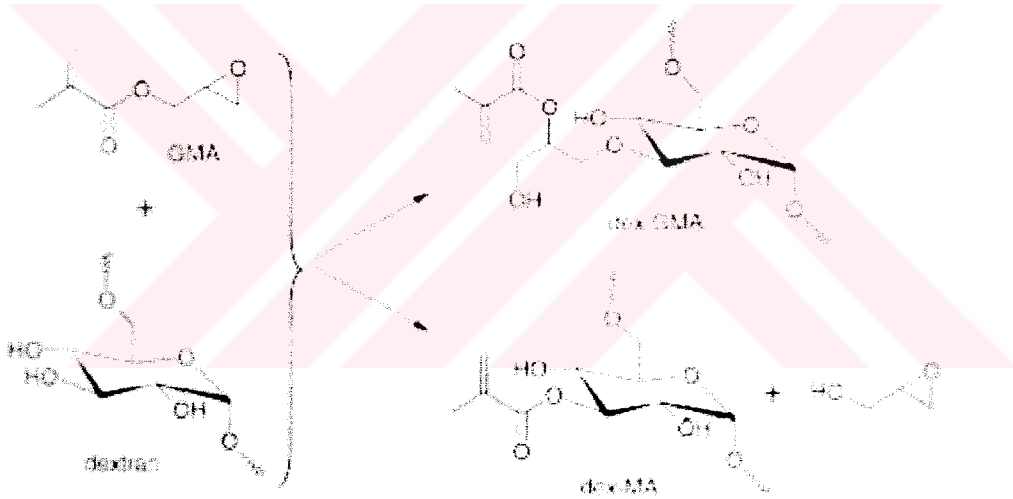
2.2.3.1 Kimyasal çapraz bağlama

Kimyasal yolla çapraz-bağlanmış hidrojellerde polimer zincirleri arasında kovalent bağlar mevcuttur. Bu bağların oluşumu aşağıda açıklanan farklı mekanizmalarla gerçekleşir.

i. Radikal polimerizasyonu ile çapraz bağlama

Kimyasal çapraz-bağlı jeller düşük molekül ağırlıklı monomerlerin çapraz bağlayıcı ajan varlığında gerçekleştirilen radikal polimerizasyonu ile elde edilirler. İyi bilinen ve sıklıkla çalışılan hidrojellerden biri pHEMA (poli 2-hidroksimetakrilat)'dır. Bu hidrojel ilk olarak Wichterle ve Lim (1960) tarafından etilen glikol dimetilakrilat çapraz bağlayıcısı varlığında HEMA'nın polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Benzer yöntem kullanılarak hidrojellerin özellikleri değiştirilebilir. Örneğin metakrilik asit eklenerek pH-duyarlı hidrojeller veya N-izopropilakrilamid

eklenerek sıcaklığa duyarlı hidrojelere elde edilebilir. Vinil-monomer karışımlarına ilaveten, polimerleştirilebilir gruplarla türevlendirilmiş (OH; COOH, NH₂) suda çözünür polimerlerin radikal polimerizasyonu ile kimyasal çapraz bağlı jeller sentezlenebilir. Bu amaçla, farklı suda çözünür polimerler kullanılarak (sentetik, yarı sentetik ve doğal) hidrojelere elde edilebilir. Özellikle dekstran, bozunabilir hidrojel sistemi oluşturmada kullanılmaktadır. Dekstran bazlı hidrojelere kolonda bulunan dekstranaz enziminden dolayı kolona-özgü salım sistemlerinde kullanılmaktadır. Polimerleştirilebilir dekstranla ilgili ilk araştırmaya Edman ve ark. (1980) ön ayak olmuşlardır. Bu çalışmada dekstranın sulu çözeltisi glisidilmetakrilat (GMA) ile reaksiyona sokulmuştur. N,N-dimetilakrilamid içeren akril dekstran çözeltisine N,N,N',N'-tetrametilen-diamin ve amonyum peroksidisülfat'tan oluşan bir başlatıcı sistemin eklenmesiyle hidrojel yapı elde edilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Dekstranın GMA ile reaksiyonu.

Dekstran dışında albumin, (hidroksietil) nişasta, poli-aspartamid, poli(vinil alkol) ve hyaluronik asit gibi suda çözünür polimerler de Edman ve ark. tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak metakrilik gruplarla türevlendirilmiştir. Reaksiyonlar sulu ortamda gerçekleştiği için süstitüsyon çok düşüktür ve GMA'nın suda çözünür polimerle reaksiyonu öncesi ve sonrası hidrolizi nedeniyle süstitüsyon derecesini kontrol etmek de zordur. Bu problemlerin aşılabilmesi için Hennink ve grubu tarafından alternatif bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda dekstran uygun bir çözücüde (DMSO) çözülmüştür. GMA ile türevlendirme bu çözeltinin 4-

(N,N-dimetilamino) pridin tarafından katalizlendiği reaksiyon sonucu gerçekleşmiştir. Enzimatik bozunma sonrasında elde edilen örneklerin NMR ve kütle spektroskopisi ile yürütülen detaylı analizleri GMA ve dekstran arasındaki reaksiyonun belli koşullarda bir transesterleşme reaksiyonu olduğunu ve metakrilat gruplarının doğrudan dekstran zincirine bağlandığını göstermiştir (Van Dijk-Wolthuis ve ark., 1997). Dekstrana metakrilat gruplar, metakrilol klorür (Marsano ve ark., 2000), metakrilik anhidrit (Kim ve Chu, 2000) kullanılmasıyla ve dekstranın bromasetil bromür ve sodyum akrilatla reaksiyonu ile de takılabilir (Kim ve Won, 1999a). Ayrıca enzimlerin katalizör olarak kullanılmasıyla da metakrilik gruplar mono ve disakkaritlere eklenerek hidrojel yapı elde edilebilir (Patil ve ark., 1996). Sentez susuz piridinde gerçekleşmekte ve %75 oranında verimle hidrojel elde edilebilmektedir.

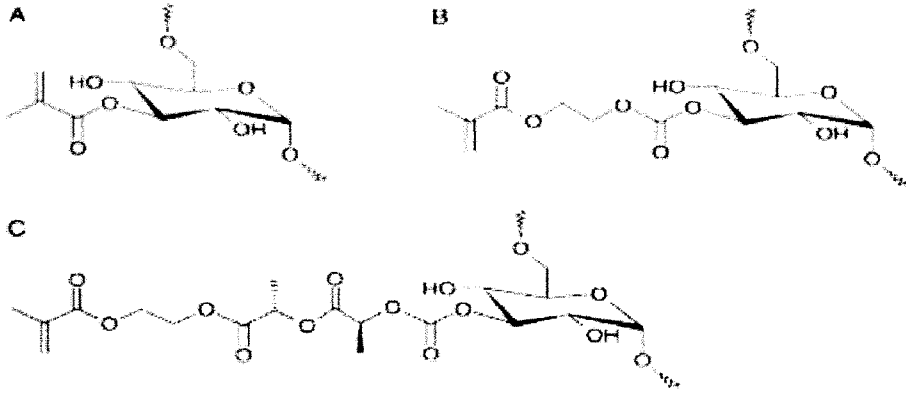
Kim ve Won (1999b) tarafından polimerleştirilebilir bir dekstran türevi, maleik anhidrit ve dekstranın reaksiyonuyla elde edilmiştir. Bu dekstran türevleri vinil gruplarının UV varlığında polimerizasyonu ile hidrojele dönüştürülebilirler. Elde edilen jeller fizyolojik ortamda bozunabilir değildir. Bununla birlikte, yapılarında bulunan karboksilik asit gruplarından dolayı pH'a bağlı güçlü şişme davranışları sergilemişlerdir. Suda-çözünür polimerlere bağlanan metakrilat grupları fizyolojik koşullardaki hidrolize karşı duyarlıdır ancak polimerizasyon sonrasında metakrilat esterlerin hidrolize karşı son derece dirençli oldukları görülmüştür (Hennink ve ark., 1996). Bu durum, polimer ana zincirlerinin enzim tarafından hidrolizlenmesiyle jellerin yalnızca fizyolojik koşullarda bozunabileceğini göstermektedir. Aynı davranış, albumin, nişasta ve dekstrana dayalı jellerde de gözlenmiştir. Metakrilatlanmış dekstran, dekstranaz varlığında bozunur olmasına rağmen, tamamiyle bozunma, yalnızca süstitüsyon derecesinin çok düşük olduğu jellerde (<4) gözlenmiştir. Süstitüsyon derecesi (SD) 100 glikoz birimi başına düşen metakrilat gruplarının sayısı olarak verilir. SD 4-7 arasında olduğunda kısmi bozunma gözlenmiş, SD>7 olduğunda ise bozunmanın çok zor biçimde gerçekleştiği görülmüştür (Franssen ve ark., 1999).

Enzimatik olarak bozulan hidrojelere alternatif olarak, kimyasal olarak bozulan hidrojel de tasarlanmıştır. Bu jeller suda çözünür polimerlerin ve polimerleştirilebilir grupların hidrolize duyarlı gruplar üzerinden bağlanmasıyla

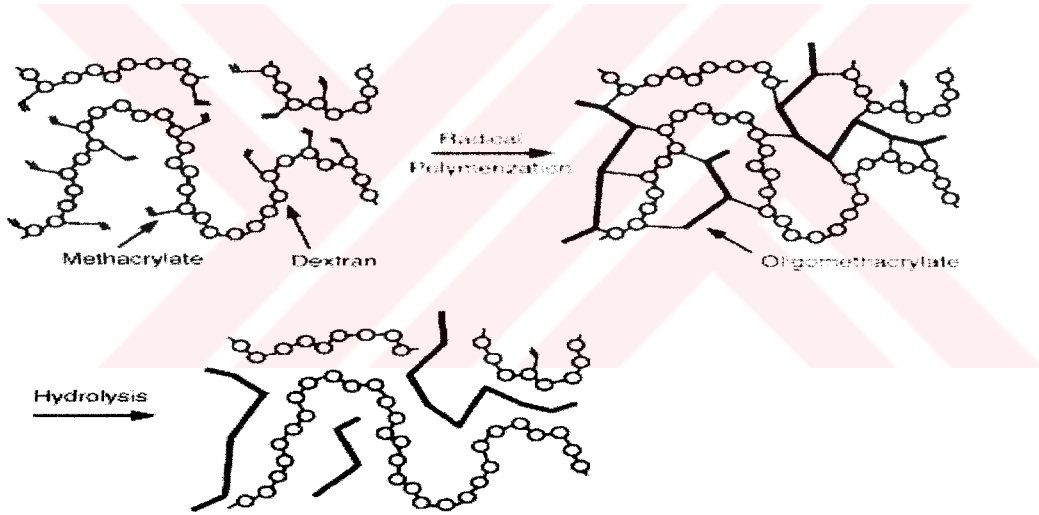
elde edilebilirler. Hennink ve ark., (1997) polimerleşebilir grupları hidrolitik olarak duyarlı gruplar üzerinden dekstran ana zincirine bağlamış ve metakrilatlı dekstran türevini sentezlemişlerdir. Hidroliz olabilir gruplar, dekstran-HEMA'daki karbonat esteri veya dekstran-laktat-HEMA'daki laktik asit grupları ve karbonat esterin bileşimi olabilir (Şekil 2.2). Bu türevlerin polimerizasyonundan sonra jeller çapraz bağlardaki (karbonat) ester gruplarından dolayı fizyolojik koşullarda bozunmuşlardır. Bozunma ürünleri dekstran, laktik asit ve kısa pHEMA zincirleri olup reaksiyon Şekil 2.3'de gösterilmiştir. Bozunma süresi ester gruplarının türüne, jelin çapraz-bağlanma derecesine ve laktik asit zincirlerinin uzunluğuna bağlı olarak 1 günden 3 aya kadar kontrollü biçimde değiştirilmiştir. Yüksek biyoyumluluğa sahip bu jeller farelerin deri altına mikroküre formunda enjekte edilmiş ve in-vivo ortamdaki bozunmanın da in-vitro'dakine benzer biçimde gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu da in-vivo bozunmanın da kimyasal hidrolizle olduğunu kanıtlanmaktadır. Bu biyobozunur hidrojeller farmasötik proteinlerin kontrollü salımı için uygun sistemlerdir. Hidrojelin gözeneklerinde hapsedilen protein ilaç, hidrojel matrisin bozunmasına bağlı olarak dış ortama salınır. Diğer bir dekstran-bazlı hidrojel sentezi Zhang ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar dekstranı akrilol klorür veya alil izosiyanat'tan oluşan polimerleştirilebilir guruplarla modifiye etmişlerdir. Bu dekstran türevleri poli(D,L- laktik asit) diakrilat makromer ile birlikte DMF içinde çözülmüştür ve ağ yapı UV-altında polimerizasyonla elde edilmiştir. Bu hidrojeller biyobozunur olmalarına rağmen, tamamiyle bozunmadıkları görülmüştür.

Vinil türevli suda çözünür polimerlerin çapraz-bağlanma reaksiyonu peroksidisülfat ve N,N,N',N'-tetrametilen-diamin (TEMED)'den oluşan başlatıcı sistemle gerçekleştirilebilir. Bu, jel oluşumunun oda sıcaklığında ve pH=7'de bile gerçekleşebildiği, hızlı bir jel oluşumunun gözlendiği etkili bir sistemdir. Fakat reaksiyona girmemiş peroksidisülfat, TEMED ve aynı zamanda bunların bozunma ürünleri in vivo uygulamalarda kullanılmadan önce jelden uzaklaştırılmak zorundadır. Dahası, bu başlatıcı sistem jel hazırlanma aşamasında mevcut proteinlere zarar verebilir. Özellikle proteinlerin metionin kalıntıları okside olabilirler (Hennink ve Stenekes, 2000). Son dönemlerde, TEMED ve amonyum persülfat başlatıcı sistemini içeren metakrilatlı PEG, UV polimerizasyonu ile elde

edilmiştir (Yang ve ark., 2001). Son yıllarda UV-polimerizasyonu, hidrojel hazırlamada sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. Dekstran-MA (A). Dekstran-HEMA (B) ve Dekstran-Laktat-HEMA yapıları.



Şekil 2.3. Dekstran-HEMA ve Dekstran-HEMA-laktat hidrojellerin oluşum ve bozunma reaksiyonlarının şematik gösterimi

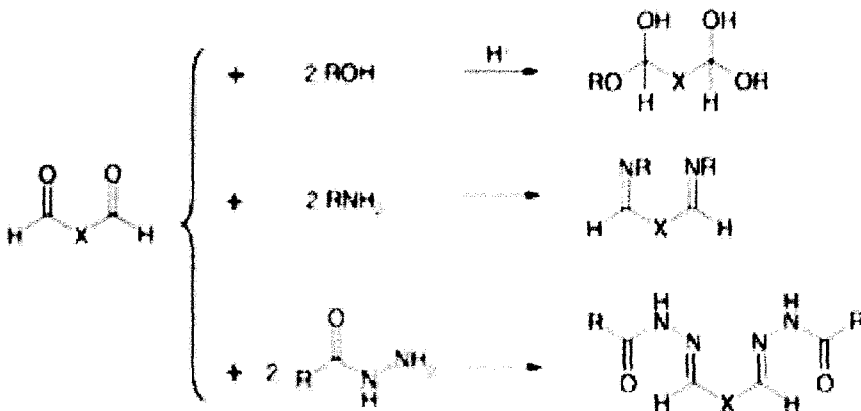
ii. Tamamlayıcı grupların kimyasal reaksiyonuyla çapraz bağlama

Suda çözünür polimerler çözünme özelliklerini fonksiyonel gruplarına (başlıca OH, COOH, NH₂) borçludurlar. Bu gruplar hidrojel oluşumunda kullanılabilir. Polimer zincirleri arasındaki kovalent bağlar amin-karboksilik asit veya izosiyanat-OH/ NH₂ reaksiyonu veya Schiff baz oluşumu gibi tamamlayıcı reaksiyonlarla gerçekleştirilebilir.

- Aldehitlerle çapraz bağlama

Hidroksil gruplu suda çözümlü polimerler (örneğin polivinil alkol) glutaraldehit kullanılarak çapraz bağlanabilir (Şekil 2.4) (Peppas ve ark.,1980, Dai ve ark., 1999).

Amin içeren polimerler de aynı ajanla ve ılımlı koşullarda Schiff bazlar oluşturur. Bu özellikle çapraz bağlı proteinlerin, örneğin albumin (Willmott ve ark., 1984), jelatin (Yamamoto ve ark., 2000) ve amin içeren polisakkaritlerin hazırlanması için araştırılmıştır. Fakat glutaraldehit düşük konsantrasyonlarda bile toksik ve hücre inhibisyonuna neden olduğundan yeni alternatifler araştırılmıştır. Dekstranın kısmi oksidasyonu ile elde edilen polialdehitlerin kullanılmasıyla jelatin çapraz bağlanmıştır. Bu jeller yara iyileştirilmesinde kullanılmak üzere EGF (epidermal büyüme faktörü) ile yüklenmiştir (Draye ve ark., 1998). Kısmi olarak depolimerize edilmiş aljinatın periodat ile oksidasyonu sonucu oluşan poli(aldehit gluronat) adipik asit dihidrazid ile çapraz bağlanarak hidrojel elde edilmiştir (Şekil 2.4). Jellerin şişmesi ve bozunması adipik asit dihidrazid miktarının ayarlanmasıyla kontrol edilmiştir (Mooney ve ark., 2000). Yine Luo ve ark., (2000) adipik dihidrazidli hyluronik asit türevinin bir makromolekül çapraz bağlayıcı poli(etilen glikol-propiondialdehit) ile çapraz bağlanmasıyla hidrojel filmler hazırlamışlardır. Bu filmler hyaluronidaz enzimi ile bozunabilmektedir ve anti-bakteriyel ve anti-inflamator ilaçların kontrollü salımı için kullanılması uygundur.



Şekil 2.4. Alkol, amin ve hidrazid grupları içeren polimerlerin aldehitlerle yürütülen çapraz-bağlama reaksiyonları (R polimer zincirlerini, X ise glutaraldehitdeki CH₂ gruplarını ifade eder)

- Katılma reaksiyonlarıyla çapraz bağlama

Suda çözünen polimerler bis (veya daha yüksek) fonksiyonel çapraz bağlayıcı ajanların, bu polimerlerin fonksiyonel gruplarıyla katılma reaksiyonları üzerinden etkileşmesi sonucu hidrojele dönüştürülebilir. Polisakkaritler 1,6-hekzan dibromür, 1,6-hekzametilendiizosiyanat, divinil sülfon ve daha birçok ajanla çapraz bağlanabilir. Çapraz bağlanma reaksiyonları organik çözücülerde gerçekleşir. Çünkü su da çapraz bağlama ajanlarıyla reaksiyona girebilir. Polimer zincirleri arasındaki çapraz bağlar son derece kararlı olduklarından, yalnızca enzimlerle ana zincirleri üzerinden bozunmaya uğratılabilirler (Brondsted ve ark., 1998). Ancak buradaki çapraz-bağlayıcı ajanlar son derece toksik olduğundan, reaksiyon sonrası dönüşmemiş grupların yapıdan uzaklaştırılmasına dikkat edilmelidir.

- Kondenzasyon reaksiyonlarıyla çapraz bağlama

Hidroksil grupları veya aminler ile karboksilik asitler veya bunların türevleri arasındaki kondenzasyon reaksiyonları sırasıyla poliester ve poliamid gibi polimerlerin sentezinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlar aynı zamanda hidrojjelerin hazırlanmasında da kullanılmaktadır. Suda çözünen polimerlerin amid bağları ile çapraz bağlanmasında çok etkili bir ajan N,N-(3-dimetilaminopropil-N-etil karbodi amidin) (EDC)'dir. Feijen ve ark., (2000) bu ajanı kullanarak jelatin hidrojjeller sentezlemişlerdir. Reaksiyon sırasında N-hidroksisuccinimide eklenerek olası yan reaksiyonları önlenmiş ve jellerin çapraz bağlanma yoğunluğu üzerinde daha iyi bir kontrol sağlanmıştır. Elde edilen bu jeller antibakteriyel proteinlerin salımında kullanılmak üzere Dacron protezlere yerleştirilmiştir. Mooney ve ark. (1999) iyonik olarak çapraz bağlı jellere göre daha iyi mekanik özelliklere sahip aljinat jeller elde etmek amacıyla, bu polimeri kovalent olarak çapraz bağlamışlardır. Bu yöntemde aljinat ve PEG-diaminler EDC kullanılarak çapraz bağlanmıştır. Mekanik özellikler jeldeki PEG-diamin miktarıyla ve PEG'in molekül ağırlığı ile kontrol edilebilmiştir. Crescezi ve ark. (1999 ve 2000), Passerini ve Ugi kondenzasyon reaksiyonları (Şekil 2.5) yoluyla polisakkarit hidrojjeller sentezlemişlerdir. Passerini kondenzasyonunda bir karboksilik asit ve aldehit veya keton, α -(akriloksi)amid elde etmek için izosiyanat ile kondense edilmiştir. Ugi kondenzasyonunda bu reaksiyona bir amid eklenerek α -(akril

amino) amid elde edilmiştir. Reaksiyon hafif asidik pH'da ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir. Passerini reaksiyonunda çapraz bağlar ester bağlarıyla olduğundan, jeller pH 9.5 ve oda sıcaklığında bozunurlar. Bozunma süresi bileşime bağlı olarak 1-8 gün arasında değişmektedir. Ugi kondenzasyonu çapraz bağlarında amid bağları içerdiğinden bu jeller yukardaki koşullarda kararlı kalmışlardır.

Yui ve ark. (2001) hidroliz olabilir polirotaksen ile çapraz bağlanmış PEG-hidrojel sentezlemişlerdir. Jel elde etmek amacıyla α -siklodekstin'ler yığın halinde ve bozunur ester uç grupları oluşturacak şekilde PEG zincirleri üzerine kaplanma yoluyla dizilmişlerdir. Daha sonra siklodekstrinlerin hidroksil grupları karbonildiimidazol kullanılarak aktif hale getirilmiş ve bunu takiben PEG-bisaminlerle çapraz bağlanma gerçekleşmiştir (Şekil 2.6). Ester grupları nedeniyle jel bozunur ve bozunma süresi bileşime bağlı olarak 200 ila 500 saat arasında değişir. Bu jeller yumuşak doku jenerasyonunda doku iskelesi olarak kullanılmışlardır.

iii. Yüksek enerji radyasyonu ile çapraz bağlama

Doymamış bileşikler çapraz bağlamada özellikle gama ve elektron bombardımanı kullanılmaktadır. Bunun anlamı; vinil gruplarıyla türevlendirilmiş suda-çözünür polimerlerin yüksek enerji radyasyonu kullanılarak hidrojellere dönüştürülebileceğidir. Hidrojeller aynı zamanda monofonksiyonel akrilat (örneğin akilol-L-prolin metil ester) ve uygun bir çapraz bağlayıcı karışımının radyasyon altında polimerizasyonu ile de elde edilebilirler (Yoshida ve ark., 2001). Yüksek enerji radyasyonu aynı zamanda suda-çözünür polimerleri doğrudan çapraz bağlama yeteneğine de sahiptir. Polimer çözeltilerinin radyasyonu süresince polimer zincirleri üzerinde radikaller oluşur (örneğin C-H bağlarının kırılması). Ek olarak, su moleküllerinin radyolizi, polimer zincirlerine katılabilecek hidroksil radikallerin oluşumunu sağlar ve sonuçta makroradikaller oluşur. Makroradikallerin farklı polimer zincirleri üzerine rekombinasyonu kovalent bağlar oluşur ve böylece çapraz bağlı yapı ortaya çıkar.

konsantrasyonuna ve radyasyon dozuna bağlıdır. Genel olarak, çapraz bağ yoğunluğu polimer konsantrasyonunun ve radyasyon dozunun artmasıyla artış gösterir. Son dönemlerde poliaminoasit-bazlı hidrojeller polipeptitlerin sulu çözeltilerinin radyasyonu ile elde edilmişlerdir. GVGVP (G:glisin, V:valin ve P:prolin) ünitelerinden oluşan polipeptitler ve ilgili pentapeptitler rekombinant DNA teknolojisi tarafından hazırlanmışlardır ve 88–102 kg/mol molekül ağırlığına sahiptirler. Poli(GVGVP) yaklaşık 30°C civarında düşük kritik çözelti sıcaklığına sahip olduğundan, şişme sıcaklığına oldukça bağlıdır (Lee ve Macosko, 2001).

Radyasyon polimerizasyonu herhangi bir başlatıcı ve toksik etkiye sahip çapraz bağlayıcıya ihtiyaç duyulmaması, hidrojel oluşumunun tek aşamada gerçekleşmesi, polimerizasyonun oda sıcaklığında ve fizyolojik pH'de gerçekleşmesi gibi avantajlarından dolayı özellikle biyomedikal uygulamalar açısından alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Fakat, kontrollü salım sistemlerindeki uygulamalarda biyolojik aktif malzemelerin radyasyondan hasar görmemeleri amacıyla, hidrojele yüklenme işlemi, polimerizasyondan sonra gerçekleşmelidir (Rosiak ve Ulanski, 1998).

iv. Enzimlerle çapraz bağlama

Sperinde ve ark. (1997) PEG-bazlı hidrojelleri sentezlemek için bir enzimin kullanıldığı ilginç bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yaklaşımda, bir tetrahidroksi PEG, glutaminil gruplarıyla (PEG-Q_a) fonksiyonel hale getirilmiştir. Daha sonra, PEG ağları transglutaminaz'ın, PEG-Q_a ve poli(lisin-ko-fenillalanil) sulu çözeltisine eklenmesiyle oluşturulmuştur. Bu enzim PEG-Q_a'nın γ -karboksiamid grupları arasındaki reaksiyonunu katalizlemiş ve lisin'in ϵ -amin grupları polimerler arasında bir amid bağı oluşturmuşlardır. Elde edilen jeller %90 oranında şişebilmişlerdir. Yine son dönemlerde yayınlanan bir makalede, Westhaus ve ark. (2001) bir jelleşme sistemi geliştirmişlerdir. Bu sistem, transglutaminazların Ca⁺²-bağlı enzimler olmasına dayandırılıyor. Kalsiyum yüklü lipozomlar, fibrinojen ve Ca⁺²'ye bağlı transglutaminaz karışımı oda sıcaklığında sıvı haldedir. Fakat 37°C'ye ısıtıldıklarında hızlı bir şekilde jelleşme meydana getirmektedirler. Sıcaklığın artmasından dolayı, lipozomlar kararlılığını kaybetmişlerdir ve Ca⁺² iyonları çevreye yayılarak enzimi aktif hale geçirmiştir. Bu sistem oda sıcaklığında

kararlı ve 37°C'de katı halde olduğundan, jel biyoaktif maddelerin salımı için matris olarak kullanılabilir.

2.2.3.2. Fiziksel olarak çapraz bağlama

Son yıllarda fiziksel çapraz bağlı jelere ilgi artmaktadır. Bunun ana nedeni hidrojel hazırlanması aşamasında kullanılan çapraz bağ ajanlarının kullanımından kaçınılmasıdır. Bu ajanlar yalnızca yapı içerisine hapsedilmiş maddelerin (örneğin hücreler ve proteinler) bütünlüğünü bozmakla kalmamakta, aynı zamanda toksik etkiye de neden olmaktadır.

i. İyonik etkileşimlerle çapraz bağlama

Aljinat, iyonik etkileşimlerle çapraz bağlanabilen bir polimerdir. Aljinat manuronik ve glukuronik asit kalıntısına sahip bir polisakkarittir ve kalsiyum iyonlarıyla çapraz bağlanabilir (Gacesa, 1985). Çapraz bağlanma oda sıcaklığında ve fizyolojik pH'da gerçekleşebilmektedir. Aynı zamanda, aljinat sıklıkla canlı hücrelerin kapsüllenmesinde ve protein salımında matris olarak kullanılmaktadır. Aljinat mikropartiküller sodyum aljinat çözeltisinin kalsiyum klorür sulu çözeltisine spreyleneceğiyle elde edilmiştir. Bu partiküllerden protein salımı katyonik polimerli partiküllerle (örneğin kitosan ve polilisin) kaplama yoluyla modifiye edilebilmektedir. Kalsiyum iyonlarıyla çapraz bağlanabilen sentetik bir polimer poli-[di(karboksilatofenoksi)fosfazen] (PCPP)'dir. Jel mikrobuncukları, kalsiyum klorür çözeltisine, PCPP sulu çözeltisinin spreyleneceğiyle elde edilmiştir (Andrianov, 1994). Polikatyonlar anyonlarla çapraz bağlanabilir. Kitosan, β -(1-4) glukozamin bağlı bir biyopolimerdir ve kitinin deasetilasyonu ile oluşur. Kitosan-bazlı hidrojeller, kitosanın gliserin-fosfat disodyum tuzu ile çapraz bağlanmasıyla sentezlenmişlerdir. İlginç olarak, kitosan çözeltileri bu tuzun varlığında ve oda sıcaklığının altında sıvı formdadırlar ve oda sıcaklığına ısıtıldıklarında hemen jelleşmektedirler (Chenite ve ark., 2000).

İyonların eklenmesiyle elde edilen çapraz bağlanma için polimerlerde iyonik grupların olması gerekmez. Katyonlar için iyonik bağlanma bölgelerinden yoksun olan dekstran potasyum iyonlarının varlığında çapraz bağlanabilmektedir. Mekanizma Watanabe ve ark. (1996) tarafından açıklanmıştır. Potasyum

iyonunun iyonik yarıçapı, üç polimer zincirinin glukoz birimlerinin 6 oksijen atomu tarafından oluşturulan kafese mükemmel bir uygunluk sağlar ve böylelikle mikroyapı oluşur. Bununla beraber, bu dekstran/potasyum jeli suda kararsızdır ve bu yüzden ilaç salım sistemleri için pek uygun değildir. Bir polisakkarit olan carragenan, potasyum iyonlarıyla jel yapı oluşturur. Fakat jelleşme tuzun bulunmadığı koşullarda gerçekleşebilir. Bununla birlikte, metalik iyonların varlığında hazırlanan jeller, bu jellerden daha güçlü yapılar oluşturmuşlardır (Miyanaga ve ark., 2001). Metalik iyonlarla çapraz bağlanabilen anyonik polimerlere ek olarak, hidrojeller aynı zamanda polianyonların polikatyonlarla oluşturduğu komplekslerle de elde edilebilir. İyonik olarak çapraz bağlı kitosan hidrojeller kitosan ve dekstran sülfat veya polifosforik asit gibi polianyonlar arasındaki kompleks oluşumuyla elde edilebilir (Janes ve ark., 2001).

ii. Kristalizasyonla çapraz bağlama

- Homopolimer sistemlerin kristalizasyonu

Poli(vinil alkol) (PVA) suda çözünür bir polimerdir ve bunun sulu çözeltisi oda sıcaklığında düşük mekanik dayanımlı jel oluşturur. Fakat, bu polimerin sulu çözeltisi "freze-thawing" prosesi ile güçlü ve oldukça elastik jel yapı meydana getirir. Jel özellikleri PVA molekül ağırlığına, PVA'nın sudaki konsantrasyonuna, sıcaklığa, dondurma süresi ve dondurma çevrim sayısına bağlıdır. Hazırlanan jeller koşulların optimize edilmesiyle 37°C'de 6 hafta boyunca kararlı kalmışlardır. Jel oluşumu ağıdaki fiziksel çapraz bağlanma bölgeleri olarak rol oynayan PVA kristalitlerin oluşumuna dayandırılmaktadır (Peppas ve ark., 2000). Son dönemlerde, dekstran 6000 çözeltileri oda sıcaklığında inkübe edilerek hidrojel elde edilmiştir. Jel özellikleri çözeltideki polimer miktarına bağlıdır. Çözeltinin karıştırılmasıyla mikroküreler elde edilmiştir. Jel oluşumunda hidrojen bağları boyunca zincirlerin ortaklığı kristalizasyon ile sağlanmıştır.

- Sterekompleks oluşumu ile çapraz bağlama

PLLA ve PDLA sırasıyla L-laktik asit ve D-laktik asit homopolimerleridir ve yarı kristalin materyallerdir. Yüksek molekül ağırlıklı PLA 170°C'lik erime sıcaklığına sahiptir. PDLA ve PLLA'nın yüksek molekül ağırlıklı karışımında sterekompleks

oluşumunu sağlayan bir faz gözlenmiştir. PLA'nın sterokompleks oluşturma yeteneği ilk kez Ikada ve ark. (1987) tarafından keşfedilmiştir. Son zamanlarda ilaç salım sistemleri için sterokompleks oluşumuna dayalı hidrojeller tanımlanmıştır. PLLA-PEG-PLLA ve PDLA-PEG-PDLA'nın triblok kopolimerlerinin karışımları sterokompleks oluşumuna neden olur. Bu triblok kopolimerlere dayalı mikrokürelerden BSA salımı Lim ve ark. (2000) tarafından çalışılmıştır ve PLLA mikrokürelerdeki BSA salımıyla karşılaştırılmıştır. Burada sterokompleks triblok kopolimerlerinden salım PLLA mikrokürelerine göre başlangıçta daha hızlı olmuştur ki, bunun nedeni PEG içeren mikrokürelerin daha yüksek su tutma kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. Diğer bir sistem Lim ve ark. (2000) tarafından hazırlanmıştır. Bu çalışmayla enantiomerik oligo (laktik asit) yan zincirleri pHEMA'a aşılansarak poli(HEMA-g-oligolaktat) sterokompleksi oluşturulmuştur. Sistem poli (HEMA-g-oligo(L)laktat) ve poli HEMA-(g) oligo (D) laktat)'ın kloroformda çözülmesiyle elde edilen döküm çözeltisinden film formunda hazırlanmıştır.

iii. Ampifilik blok ve graft kopolimerlerden elde edilen fiziksel çapraz bağlı hidrojel

Ampifilik blok ve graft kopolimerler suda kendi başlarına organize yapılar oluşturabilirler. Ampifilik diblok kopolimerler miseller ve ince tabakalı fazlar meydana getirir. Fiziksel çapraz bağlı hidrojel genellikle multiblok kopolimer veya graft kopolimerlerden elde edilirler. Graft kopolimerler hidrofobik birimlerin suda çözünür polimer ana zinciriyle etkileşimi sonucu oluşur (Forster ve ark., 1998).

- PEG'in ve PL(G)A'nın blok ve graft kopolimerleri

Poli (laktik asit) (veya bunun glikolik asit ile olan kopolimeri) ve poli (etilen glikol)'ün biyoyumluluğu pek çok araştırmacının bu yapılardan blok kopolimerler hazırlamasına ve ilaç salım sistemleri için hidrojel geliştirmesine neden olmuştur.

PEG'li triblok kopolimerler PEG'in varlığında laktadın halka açılması polimerizasyonu ile hazırlanırlar. Hidrojel elde etmek için yöntem faz ayırımı metodudur (örneğin tetraglikol içindeki polimer çözeltisine su ekleme). Suyla

kariştirilabilir çözeltiler su ile yıkamayla uzaklaştırılmıştır. Hidrojeller, hidrofilik ilaçları, şişmiş PEG fazında, hidrofobik ilaçları ise PLA birimlerinde taşıyabilir. Ayrıca hidrojellerin enjeksiyon yoluyla verilmesi için yeterince yumuşak olduğu da gözlenmiştir. Bu jellerden BSA ve fibrinojen farklı salım davranışları göstermiştir. BSA'nın aksine fibrinojen hemen hemen doğrusal bir salım profili göstermiştir. Tiriblok mikroküreleri ve yıldız blok kopolimerler Kissel ve ark. (2000) tarafından hazırlanmıştır ve şişme ve bozunma davranışı aynı zamanda protein salımında kullanımı çalışılmıştır (Bittner ve ark., 1999).

PEG ve PLGA'nın multiblok kopolimerleri dikarboksilatlı PLA ve PEG'in polikondenzasyonu ile hazırlanmıştır. Bağlı olarak küçük PLA blokları blok kopolimerler suda çözünürler ve düşük kritik sıcaklık (LCST) davranışı sergilerler ve faz ayırma sıcaklığı PLA'nın molekül ağırlığına bağlıdır. Polimerler suda çözünmezdirler, fakat şişerler.

PEG ve PLA'nın graft kopolimerleri hem PLGA zinciriyle, hem de PEG graftlarından oluşur. Bu jellerde kısmi bozunma ve protein salımı gözlenmiştir (Won. ve ark., 2000).

- PEG ve PBT'nin blok kopolimerleri

PEG'in ve diğer poliester, poli(butil tereftalin)'in multiblok kopolimerleri Feijen ve ark. (1999 ve 2000) tarafından hazırlanmıştır. Bu biyouyumlu polimerler PEG, butandiol ve dimetil tereftalatın eriyik polikondenzasyonu ile hazırlanmışlardır.

- Hidrofobik hale getirilmiş polisakkaritler

Literatürdeki hidrofobik hale getirilmiş polisakkarit örnekleri, kitosan, dekstran, pullulan ve karbosimetil curdolan'ın hidrofobik modifikasyonu ile fiziksel çapraz bağlı hidrojeller halinde hazırlanmışlardır. Sunamoto ve ark. (1997) kollestrol kaplı pullulan'a dayalı hidrojel sentezlemişlerdir. Bu bileşim 20-30 nm boyutlarında monodispers hidrojel nanopartiküllerin oluşmasını sağlamıştır.

Kendi kendine bir araya gelen hidrojel nanopartiküller antitümör aktivitesine sahip karbosimetil curdlandan elde edilmiştir (Kim ve ark., 2000).

Hidrofobik polisakkaritlerin başka bir örneği palmitol zincirleriyle desteklenmiş suda çözünür glikol kitosandır. Bunlar kolesterol varlığında ince tabakalı polimerik keseler oluştururlar ve biyoyumludurlar.

Kitosan, Qu ve ark. (1999 ve 2000) tarafından PL(G)A ile graft edilmiştir. Burada, hidrofobik poliester yan zincirleri, sudaki hidrofobik etkileşmeden sorumludurlar. Diğer kitosan hidrojelleri poli(akrilik asit) veya poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm) ile graft edilerek pH ve sıcaklığı duyarlı hale getirilmişlerdir. Kitosana ek olarak, karbosimetil dekstran da poli(izopropilakrilamid) zincirleriyle graft edilmiş ve termo-duyarlı hidrojeller elde edilmiştir (Kim, Lee ve ark., 2000).

- Diğer blok ve graft kopolimerler

Blok kopolimerlerden fiziksel çapraz bağlı son hidrojel örnekleri PEG-poliizobutilen'in multiblok kopolimeri (Kurian ve ark., 2000), poli(γ -benzil L-glutamat (Cho ve ark., 2000), poli(2-etil-2 oksazolin)-PCL (Akiyoshi ve ark., 1998) ve PEG-PNIPAAm'dan elde edilen termoduyarlı hidrojellerdir. Sonuncu hidrojel sıcaklık-duyarlı terminal bloklar olarak PNIPAAm ve suda çözünür merkezi blok olarak lineer ve çok kollu PEG'den türetilen yıldız kopolimerler ve tiriblok kopolimerlerinden oluşur (Lin ve Cheng, 2001).

Hidrofobik çapraz bağlanmaya dayalı süperemici hidrojeller poli(N-vinilprolidon-g-stiren)'den elde edilmişlerdir. Bunlar kendi kütlelerinin 33 katı su tutma özelliğine sahiptirler (Beers ve ark., 1998). Son olarak, PMMA mikroemülsiyon partiküllerin tersinmez fiziksel çapraz bağlanması Ming ve ark. (1999) tarafından gerçekleştirilmiştir.

iv. Hidrojen bağlarıyla çapraz bağlama

Poli(akrilik asit) ve poli(metakrilik asit) poli(etilen glikol) ile kompleks oluşturur. Bu kompleksler poli(etilen glikol)'ün oksijen ve poli(metakrilik asit)'in karboksil grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla birbirlerini tutarlar.

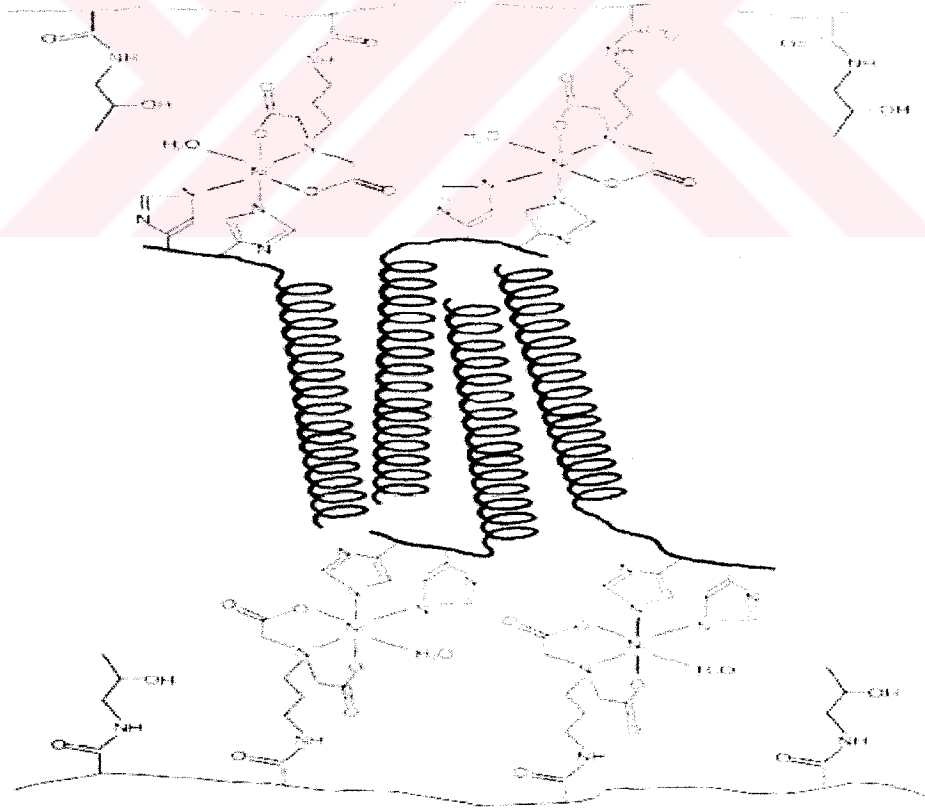
DNA'daki çift sarmallar birbirlerini hidrojel bağlarıyla tutmaktadırlar. Nagahara ve ark. (1996) bu prensibi kullanarak hibridizasyonla meydana getirilen bir hidrojel sistemi elde etmişlerdir. Bu yaklaşımla oligodeoksiribonükleotit'ler suda çözünür

bir polimer (poli(N,N-dimetilakrilamid-ko-N-akriloloksisuccinamid) ile eşleştirilmiştir. Hidrojeller komplimenter ODN ilavesiyle hidrojele dönüştürülmüşlerdir.

v. Protein etkileşimleriyle çapraz bağlama

- Genetik olarak işlenmiş proteinlerin kullanımı

Kopecek ve ark. (1999 ve 2001) yumak-yumak etkileşimleri gösteren doğal ve işlenmiş proteinler keşfetmişlerdir ve bunları poli(N-(2-hidroksipropil) metakrilamid) için çapraz bağlayıcı olarak kullanmışlardır. Bu proteinler, polimer zinciri üzerindeki histidin etiketleri (tag) ve metal-şelatlı (chelating) ligandlar arasındaki metal kompleksleriyle birbirlerine tutturulmuşlardır (Şekil 2.7.). Doğal protein içeren hidrojel yumak-yumak proteinin erime sıcaklığına (35°C) yakın bir çökme davranışı sergilemiştir. Bu işlenmiş proteinden elde edilen hidrojel ise böyle bir faz değişimi göstermemiştir.



Şekil 2.7. Hibrid hidrojel ana zincirlerinin ve His-etiketlenmiş yumak-yumak protein bağlanmasının şematik gösterimi.

- Antijen-antibadi etkileşimleriyle çapraz bağlama

Miyata ve ark. (1999a), ek bir çapraz bağlayıcı olarak antikor varlığında kimyasal olarak çapraz bağlı poliakrilamid'e bir antijenin (tavşan IgG) graft edildiği bir hidrojel hazırlamışlardır. Hidrojeller serbest antijen varlığında şişmişlerdir. Çünkü polimer ve bu polimere bağlı antijenin yer değiştirmesi antikorların salımını sağlar ve bu nedenle çapraz bağ yoğunluğu düşer. Şişme oranı antijen konsantrasyonunun artmasıyla artar. Diğer bir hidrojel IPN polimer ağına antijen ve antikorun birlikte immobilize edilmesiyle hazırlanmıştır (Miyata ve ark., 1999b).

2.3. Biyobozunma

Polimerlerin, özellikle biyomalzeme olarak kullanımlarında dikkate alınması gereken önemli özelliklerinden biri de bozunma özellikleridir. Bozunma özellikleri, genel olarak bozunma mekanizması ve bozunma kinetiği olarak iki aşamada ele alınabilir.

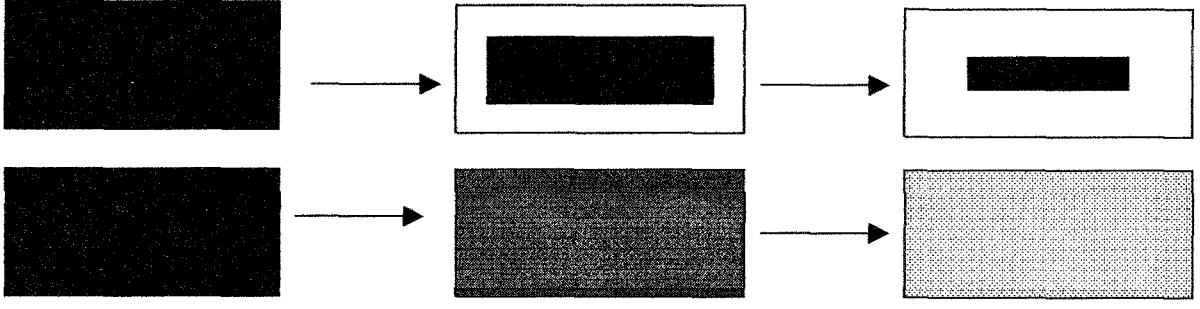
İlk olarak, polimerlerde bozunmanın iki şekilde meydana geldiği bilinmelidir. Bunlar "kimyasal bozunma" ve "polimer aşınması" aşamalarıdır. Kimyasal bozunma aşamasında, polimer moleküllerini bir arada tutan bağlar, kimyasal reaksiyonlar sonucu parçalanır ve polimer yapısı oligomerlere parçalanır. Fakat bu aşamada polimerlerden madde kaybı olmayabilir. Polimer aşınması aşamasında ise, kimyasal bozunma sırasında ortaya çıkan oligomerler, diffüzyon veya akışla sürüklenme yoluyla polimer yapısından uzaklaşırlar. Bu iki aşamanın bu sıra ile ve ardı ardına gelmesi şart değildir, fakat polimer bozunması proseslerinin çoğunda bozunma bu aşamalar sonucu meydana gelir (Göpferich, 1996).

Polimer bozunması, bozunmayı meydana getiren etkiye bağlı olarak foto, termal, mekanik ve kimyasal bozunma olarak sınıflandırılabilir. Bazı polimerler bu bozunmaların birkaçına birden hassas olabilirler Fakat tüm polimerler ultraviyole ışınlar ve gama radyasyonuna maruz kaldıklarında kaçınılmaz bir şekilde bozunurlar. Biyolojik ortamda parçalanan polimerlerin diğer polimerlerden farkları, hidrolizlenebilen bağlar içermeleridir. Polimer bağlarının parçalanmasında temelde iki mekanizma vardır. Birincisi, pasif hidrolizleme yoluyla, ki bu yapay

polimerlerin temel parçalanma mekanizmasıdır. İkincisi ise, aktif (enzimatik) hidrolizleme yoluyla parçalanmadır. İkinci mekanizma ancak doğal polimerlerin bozunmasında etkilidir ve bu yolla bozunabilen yapay polimerler oldukça enderdir. Bunun nedeni, canlı yapısındaki enzimlerin belli yapılar için özel olmalarıdır. Burada malzemenin daha az kompleks bir yapıya dönüşmesi veya çözünürleştirme, basit hidroliz ve biyolojik olarak mevcut olan organizmalar ile son ürünlere dönüşmesi şeklinde biyobozunma prosesi gerçekleşmektedir. Bu proseste, polimer molekülleri fraksiyonlarına ayrılır, malzemenin bütünlüğü azalır ve vücuttan kolayca uzaklaştırılabilir. Biyobozunma hem hidrolitik hem de enzimatik prosesler içerebilir ve bu mekanizmalar, bozunmanın farklı kademelerinde, farklı seviyelerde ortaya çıkabilir. Bozunma hidrolizle başlayabilir, fakat enzimle etkileşebilecek yüzey alanı arttıkça enzimatik bozunma daha aktif hale gelir (Vercauteren, 1990). Her enzimde substratları bağlayıcı aktif bölge vardır. Enzim ve substrat arasındaki bağlayıcılık aktif bölgelerin üç boyutlu yapısına ve substratın segmentlerine bağlıdır. Vücutta mevcut olan bazı spesifik enzimler bazı protein ve polisakaritlerin bozunması için kullanılıyorsa bu enzimatik bozunma 'substrata-özgü' bozunmadır (Schacht ve ark., 1998).

Bozunma prosesini izlemeye kullanılabilecek en önemli parametre, molekül ağırlığıdır. Polimer yapısının dış görünüşünü izlemek de bir yöntemdir, fakat polimer bozunurken, eğer aşınma meydana gelmiyorsa, genel yapı özelliklerini kaybetmeyeceği unutulmamalıdır.

Polimer bozunması mekanizmalarının yanısıra, aşınma mekanizmalarının anlaşılması da önemlidir. Proteinlerin aşınmasında temel olarak iki mekanizma vardır: Yığın aşınması ve yüzey aşınması (Şekil 2.8). Yığın aşınmasında, polimer yapısı homojen olarak tüm yapıdan madde kaybeder. Yüzey aşınmasında ise, heterojen bir aşınma prosesi söz konusudur ve polimer yapısı yalnızca yüzeyden madde kaybeder. Yüzey aşınması için ilaç salım sistemleri gibi uygulamalarda, şişme ve gözeneklilik de önemli parametrelerdir. Doku mühendisliğinde, implante edilebilir yapıların performansı, yüzey özellikleri ve gözenekliliği tarafından belirlenir (Langer, 1993). Yine de, aşınma prosesi, bozunmadan daha karmaşık bir prosestir. Her iki prosesin ortak noktası ise, polimere özel olmalarıdır.



Şekil 2.8. Yüzey ve yığın aşınmalarının şematik gösterimi

Aşınma prosesi sırasında ilk ve en büyük yapısal değişiklikler yüzeyde meydana gelir; polimer yüzeyi daha gözenekli yapıya kavuşur. pH'da meydana gelen değişiklikler ise daha karmaşıktır. Bozunma hızı pH'a bağlıdır. Fakat polimer zincirleri ortam pH'ı nedeniyle oligomere parçalanıp, ortama salındıklarında, yalnızca ortam pH'ını değil, polimer gözeneklerindeki pH'ı da değiştirmiş olurlar. Aşınma proseslerinde diğer bir farklılık ise, kristaliniteye ortaya çıkar. Bunun iki kaynağı vardır:

-Kristalize oligomerlerin oluşumu ve

-Kısmen kristalize olmuş oligomer ve monomerlerin aşınma sırasındaki davranışları. Genelde, amorf yapılar, kristalize yapılardan daha kolay aşındığı için yapının genel kristalinitesi artar.

Bozunma proseslerinde dikkat edilecek diğer bir nokta, bozunma ürünlerinin davranışlarıdır. Bozunma sonucu ortaya çıkan oligomer ve monomerler, polimer yapısını hemen terk etmek zorunda değildirler. Ortaya çıkan moleküllerin yüzeyi terk etme davranışlarını açıklamak için iki mekanizma önerilmiştir.

1. Aşınma kontrollü salım: Bu mekanizmada, polimer ana zincirlerindeki farklı bağların, farklı hızlarla kopması ve böylece yapıyı terk edecek oligomerlerin farklı hızlarda salındığı varsayılır.

2. Diffüzyon kontrollü salım: Bu mekanizmada ise, reaksiyon hızlarındaki farklılıkların, çözünürlük ve diffüzyondaki farklılıklar nedeniyle meydana geldiği varsayılır.

Bozunma ve aşınma sırasında meydana gelen değişikleri tahmin etmek oldukça zordur. Bunun nedeni, günümüze kadar geliştirilmiş modellerin hiçbirinin, bozunmaya ve aşınmaya etki eden parametrelerin tamamını tümüyle hesaba katmayışlarıdır.

Bozunma prosesinin modellenmesi, belli matematiksel temellere dayanır. Her ne kadar tahmin edilen değerlerin deney sırasında gözlenmeleri zor olsa da, bozunmanın rastgele zincir kopması şeklinde olduğu varsayılır. Bu nedenle, rastgelelik teorisi (random theory) son zamanlarda bozunma prosesi modellemelerine uygulanmıştır (Göpferich, 1993).

Aşınma prosesinin modellenmesi ise, içerdii proseslerin çokluğu yüzünden zordur. Fakat son zamanlarda, rastgelelik teorisi bu alana da uygulanmıştır. Böylece, bilgisayar simülasyonları yardımıyla, deneysel olarak elde edilebilen (gözeneklilik ve ağırlık kaybı gibi) bilgilerin kontrolü sağlanmaktadır.

Polimer bozunmasında asıl önemli nokta, bozunabilir malzemenin tanımıdır. Her malzeme zaman içinde bozunur. Fakat bozunabilir malzeme dendiğinde akla gelmesi gereken, uygulama sırasında ve uygulamadan hemen sonra bozunan bir malzemedir. Buna göre, bozunabilir ve bozunmayan malzemeler arasında tek fark, yalnızca bozunma süresidir.

Polimer bozunmasına etki eden parametreler ise şu şekilde sıralanabilir.

- Ana zincirlerdeki kimyasal bağın cinsi hidroliz hızını etkiler. Sterik ve elektronik etkiler sonucu fonksiyonel grupların değişimi veya katalizlenme sonucu reaktivitede değişiklikler meydana gelebilir. Kimyasal bağın önemi de özetlenmiştir. pH'da meydana gelen değişiklikler, sistem üzerinde katalitik bir etki yapar ve reaksiyon hızı birkaç büyüklük derecesi ölçeğinde değişebilir. Böylece asidik veya bazik maddelerin etkilenmesi yoluyla, reaksiyon hızı istenildiği gibi belirlenebilir.

- Kopolimer bileşimi üretim aşamasında, polimer ana zincirine ikinci bir monomer katılarak, polimer özellikleri belirlenebilir. Bununla birlikte, kopolimer bileşiminin bozunma hızı üzerine dolaylı etkileri olabileceği unutulmamalıdır. Hidroliz işlemi, su molekülleri ile hassas bağ içeren fonksiyonel grup arasında (örneğin ester

grubu) meydana gelen bir reaksiyon olduğu için, polimerik malzemeye suyun absorpsiyon hızını etkiler. Su absorpsiyon hızı, özellikle ilaç salım sistemlerinde önemli parametredir.

Polimer bozunma hızını ayarlamak çoğu zaman gereklidir. Bunun için ortam pH'ının ayarlanması da yeterli olmakla birlikte, her zaman mümkün olmayabilir. Alternatif olarak polimerde yapı değiştirilmesi de kullanışlı bir yöntemdir. Bunun için iki yöntem vardır:

1. Kopolimerizasyon: Polimer yapısına, farklı özellikler sağlayacak farklı bir monomer katılır.

2. Polimer harmanlama: Farklı özelliklere sahip polimerler harmanlandıktan sonra maris yapısı oluşturulur.

Polimerlerin bozunması için genel bir kinetik ifadenin tanımlanması güçtür. Çünkü, bozunma kinetiği, bozunma sırasında dahi hızlı bir şekilde değişebilmekte, bunun yanı sıra, pek çok parametreye bağlı olmaktadır. Tüm bu nedenlerden ötürü, bugün elimizde olan bilgilerle kinetik modelleme, ancak ampirik eşitlikler şeklinde yapılabilmekte ve hassas bir tanımdan uzak kalmaktadır.

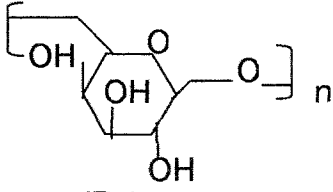
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile ilgili açıklamalara yer verilmiştir. İlk bölümde; farklı çapraz bağlayıcı reaktifler kullanılarak hazırlanan dekstran bazlı hidrojellerin sentezi ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan karakterizasyon çalışmaları açıklanmıştır. İkinci bölümde ise hidrojellerin biyobozunma davranışlarının incelenmesine yönelik olarak yürütülen deneysel çalışmalara yer verilmiştir. Bu bölümde IgG, BSA ve dekstranaz varlığında biyobozunma incelenmiş ve deneysel veriler FTIR, SEM, gravimetrik analiz ve oligosakkarit salım değerlerine bağlı olarak değerlendirilmiştir.

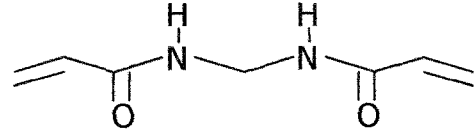
3.1. Kimyasal Maddeler

Tez çalışması sırasında geliştirilen hidrojellerin sentezinde polimer olarak dekstran (Dx-T70; $M_w=70\ 000$ g/gmol, $M_n=46\ 800$ g/gmol), çapraz bağlayıcı reaktif olarak N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBA), epiklorohidrin (ECH; %98(v/v), $d_4^{20}=1.180$ g/ml) kullanılmış olup, ECH; Aldrich, diğerleri Sigma firmasından temin edilmiştir. Dekstran ve çapraz bağlayıcı reaktiflerin kimyasal yapıları Şekil 3.1'de verilmiştir.

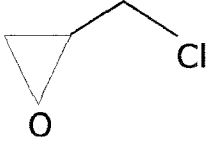
Bazik ortamda gerçekleştirilen hidrojel sentezinde Merck firmasından temin edilen Sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. Sentezlenen hidrojellerin şişme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen deneylerde fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanılmıştır. PBS tamponu Sigma firmasından temin edilmiştir. Jellerin biyobozunma davranışının incelendiği çalışmalarda ise Sigma firmasından temin edilen Sığır Serum Albumin (BSA; $M_w=65.000$, Fraction V), kaynağı *Penicillium sp.* ve optimum pH aralığı 5.0-7.0 olan *Dextranaz* enzimi (3.2.1.11; $M_w=41\ 000$) ve Sığır İmmüoglobulin G (IgG; $M_w=165\ 000$, teknik saflıkta) kullanılmıştır. Oligosakkarit salımına dayalı olarak biyobozunmanın incelendiği çalışmalarda fenol, dinitrosalisilik asit, sodyum potasyum tartarat ve sodyum hidroksit'den oluşan Sumner reaktifi ve sodyum sülfid kullanılmıştır. Adı geçen tüm kimyasallar Sigma firmasından sağlanmıştır.



Dekstran (Dx)



N,N'-Metilen-bis-akrilamid (MBAm)



Epiklorohidrin (ECH)

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan polimer ve çapraz bağlayıcı reaktiflerin kimyasal yapıları.

3.2. Hidrojel Sentezi

Tez çalışması sırasında kullanılan dekstran hidrojeller; yaklaşık 70.000 g/gmol molekül ağırlığına sahip ticari dekstranın, ECH ve MBAm çapraz bağlayıcı reaktifleri ile ağırlıkça %50 çapraz bağlayıcı oranında, bazik ortamda hazırlanmıştır. Çözücü olarak bidistile su kullanılmıştır. Sentez esnasında ilk olarak 2.8 N NaOH içeren dekstran çözeltisi hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı reaktif, dekstran çözeltisine eklendikten sonra tüp karıştırıcıda (Heidolp REAX top, Almanya) 10 dakika karıştırılmış ve çapı 7 mm ve yüksekliği 3 mm olan cam kalıplar içerisinde uygun sıcaklık programında (10-40 °C aralığında) inkübatöre (ES 500, Nüve, Türkiye) yerleştirilmiştir. Ayrıca ECH ile yürütülen çapraz-bağlanma reaksiyonlarında ortama 1:1 oranında etanol eklenerek de hidrojeller sentezlenmiştir.

Diğer bir grup hidrojinin sentezlenmesi amacıyla gama radyasyonu kullanılmıştır. Bu amaçla yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan dekstranın 2.8 N NaOH varlığındaki sulu çözeltisi cam bir tüp içerisinde ⁶⁰Co-γ kaynağına yerleştirilmiştir. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü'nde mevcut kaynak kullanılmış, olup doz hızı 0.0185 Mrad/saat'tir.

Çapraz-bağlanma reaksiyonları sonrasında, jeller cam kalıplardan çıkartılmış ve saf su içerisinde yıkama işlemine geçilmiştir. Yıkama işlemi belirli sürelerde suyun değiştirilmesiyle 1 hafta boyunca devam ettirilmiştir. Yıkaması tamamlanan hidrojeller 24-gözlü polistiren petri kapları içerisinde vakum etüvüne (Nüve EV 018, Türkiye) yerleştirilmiş ve sabit tartıma ulaşana kadar kurutulmuştur. Kuru diskler çalışmalarda kullanılana kadar ağzı kapatılmış petri kaplarında muhafaza edilmiştir.

3.3. Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları

Bu grupta şişme deneyleri, çapraz-bağlar arası molekül ağırlığı tayini, FTIR spektral analiz, termal analiz ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yürütülen çalışmalara yer verilmiştir.

3.3.1. Şişme Deneyleri

Hidrojellerin şişmelerine çapraz bağlayıcının etkisini incelemek amacıyla, vakum etüvünde sabit tartıma gelen kuru jeller, 25 ml PBS içeren beherlere konulmuşlardır. Beherler, sıcaklığı 37°C'ye ayarlanmış inkübatöre yerleştirilerek şişme deneyleri başlatılmıştır. Uygun aralıklarla dikkatlice ortamdan uzaklaştırılan jellerin yüzey nemleri alınmış ve analitik terazide (Precisa 205 A SCS; duyarlılığı $\pm 0.0001g$, İsviçre) tartıldıktan sonra tekrar şişme ortamına konulmuştur. Denge şişme değerine ulaşıncaya kadar belirli zaman aralıklarında hidrojel disklerin ağırlığındaki değişimler kaydedilmiş, her bir hidrojelin % su içeriği; başlangıçta ölçülen kuru ağırlıkla, herhangi bir t anında şişen hidrojelin ağırlık farkından gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Su içeriği} = [(yaş \text{ ağırlık} - kuru \text{ ağırlık}) / kuru \text{ ağırlık}] \times 100 \quad (3.1)$$

Şişme deneyleri boyunca, buharlaşmadan kaynaklanan tampon çözelti kayıplarını önlemek için beherlerin ağzı sıkıca kapatılmıştır. Denge şişme değerine ulaşan hidrojeller şişme ortamından dikkatlice uzaklaştırılmış ve yüzey nemi alındıktan sonra tartılmıştır. Hidrojellerin denge su içeriği de (EWC) (3.1) numaralı eşitliğe göre tayin edilmiştir. Hidrojellerin şişme değerlerinin hesaplanmasına yönelik örnek Ek 1'de sunulmuştur.

3.3.2. Çapraz Bağlar Arası Molekül Ağırlığı (M_c) Tayini

M_c tayini için 7 mm çapında 3 mm kalınlığa sahip hidrojel diskler kullanılmıştır. Hazırlanan disklerin çapraz bağlanma sonrası (relaxed durumda) sudaki yoğunlukları ($\rho_{p,r}$) piknometrik yöntemle saptanmıştır. Daha sonra aynı örnekler, saf su içerisinde bekletilerek denge şişme değerlerine ulaşmaları sağlanmış ve şişme sonrası sudaki ($\rho_{p,s}$) yoğunlukları bulunmuştur. Suda şişen örnekler sabit tartıma gelene kadar kurutulmuş (25°C , 740 mmHg basıncı) ve kuru halde yoğunlukları ($\rho_{p,d}$) belirlenmiştir. Piknometrik yöntemle ölçülen yoğunluk değerlerinden, hidrojellerin relaxed durumda ($w_{p,r}$), denge şişme ulaştığında ($w_{p,s}$) ve kuru haldeki ağırlıkları ($w_{p,d}$) hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerlerler kullanılarak aşağıdaki eşitlikler yardımıyla M_c tayini için gerekli parametreler bulunmuştur.

$$\text{Çapraz bağlanma sonrası polimer hacmi } (v_{g,r}) = (w_{p,r}) / \rho_w \quad (3.2)$$

ρ_w : suyun yoğunluğu

$$\text{Şişme sonrası hacim } (v_{g,s}) = (w_{p,s}) / \rho_w \quad (3.3)$$

$$\text{Kuru polimer hacmi } (v_p) = w_{p,d} / \rho_p \quad (3.4)$$

ρ_p : polimer yoğunluğu

$$\text{Relaxed durumunda hacim kesri } (v_{2,r}) = v_p / v_{g,r} \quad (3.5)$$

$$\text{Şişme durumunda hacim kesri } (v_{2,s}) = v_p / v_{g,s} \quad (3.6)$$

Bu parametrelerden faydalanılarak EK.2'de Eşitlik EK 2.3. yardımıyla M_c hesaplanmıştır. Örnek hesaplama Ek 2'de verilmiştir.

3.3.3. FTIR Analizi

Dekstran-çapraz bağlayıcı reaktif karışımından sentezlenen dekstran hidrojellerde çapraz bağlanma tepkimesinin ve biyobozunmanın hangi gruplar üzerinden yürüdüğünün belirlenmesi amacıyla, hidrojellerin biyobozunma öncesi ve sonrası infrared spektrumları FTIR (MATTSON 1000 FTIR) spektrofotometresi ile kalitatif olarak incelenmiştir. Vakum etüvünde kurutulup toz haline getirilmiş örnekler potasyum bromür (KBr, %10(w/w)) ile karıştırılmış ve ardından vakum altında disk formunda preslenmiştir. ECH sıvı formda olduğu için, KBr disklerine damlatılarak

FTIR spektrumları incelenmiştir. Spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlükte ve 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında kaydedilmiştir.

3.3.4. Termal Analiz

Çalışma kapsamında hazırlanan hidrojellerin termal davranışı, termogravimetrik analizör (TGA) ile incelenmiştir. Analizler vakum etüvünde kurutulan örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TGA çalışması 25°C - 500°C aralığında, $10^{\circ}\text{C}/\text{dak}$. ısıtma hızıyla yürütülmüştür. TGA çalışması ASTM E 1131-86; test standardına uygun olarak yapılmıştır.

3.3.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Morfolojik Analizi

Sunulan çalışmada hazırlanan polimerik disklerin biyobozunma öncesi ve sonrası yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL JSM-840 A) ile incelenmiştir. Bir bistrü yardımıyla kesilen örnekler, vakum ortamında altın-palladyum ile kaplandıktan sonra yüzeylerin morfolojisi ve kesit yapıları SEM fotoğrafları ile incelenmiştir.

3.4. Hidrojellerin Biyobozunma Davranışının İncelenmesi

Dekstran hidrojellerin biyobozunmasını incelemek amacıyla yürütülen bu grup çalışmalar, farklı derişimlerdeki BSA, IgG ve dekstranaz ile 10 ml'lik rezervuar hacminde 37°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Her bir deney paralel iki çözelti ile yürütülmüştür. Çözeltilerin her birine önceden belirlenmiş ağırlıklardaki 1'er adet jel yerleştirilerek biyobozunma deneyleri başlatılmıştır. Belli zaman aralıklarında hidrojel içeren enzim çözeltilerinden oligosakkarit tayini için 1'er ml'lik örnekler alınmıştır. Rezervuar hacimlerinin sabit tutulması amacıyla alınan her 1 ml örnek yerine ortama stok çözeltilerden eklenmiştir.

3.4.1. BSA Stok Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg/ml'lik stok BSA çözeltisi $\text{pH}=7.4$ 'de PBS tampon ortamında hazırlanmıştır. Bozulmaması amacıyla enzim çözeltisi uygun koşullar altında buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.4.2. IgG Stok Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg/ml'lik stok IgG çözeltisi pH=7.4'de PBS tamponu ortamında hazırlanmıştır. Aktifliklerinin bozulmaması amacıyla enzim çözeltileri uygun koşullar altında buzdolabında muhafaza edilmiştir.

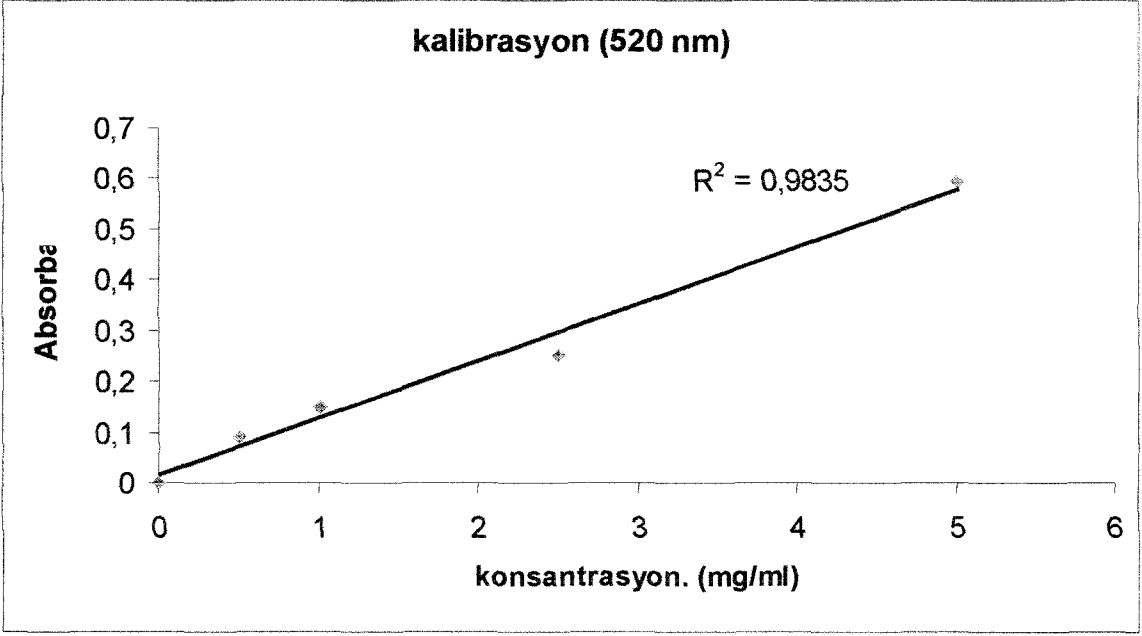
3.4.3. Dekstranaz Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Stok dekstranaz çözeltisi, pH=7.4'de PBS tamponu ile 500 U/ml derişiminde hazırlanmış ve bu stok çözeltiden mikropipet yardımıyla farklı miktarlarda alınarak seyreltme yöntemiyle 0.05 U/ml, 0.1 U/ml, 0.5 U/ml ve 1 U/ml enzim içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Stok çözelti inaktif olmaması için uygun koşullarda (derin dondurucu, Ariston, İtalya) muhafaza edilmiştir.

3.4.4. Biyobozunmanın Oligosakkarit Salımı İle İncelenmesi

Sumner reaktifinin hazırlanması: 0,2 mg/ml sodyum potasyum tartarat, 10 mg/ml NaOH, 2 mg/ml fenol ve 10mg/ml dinitrosalisilik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında bidistile su kullanılmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler 50 ml'lik balon joje içerisinde karıştırılmış ve oluşan reaktif (Sumner reaktifi) buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Salınan oligosakkarit miktarını belirlemek amacıyla, cam tüpler içerisine alınan herbir örnek içerisine 1,5 ml Sumner reaktifi ve 100 µl sodyum sülfid eklenmiş ve bu tüplerin ağzı streç filmle kapatıldıktan sonra 95°C'de 15 dakika boyunca fırında bekletilmiştir. Bu süre sonunda fırından alınan örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve sonra 520 nm'de UV-vis spektrofotometrede absorbansları ölçülmüştür. Glukoz referans alınarak elde edilen kalibrasyon grafiğinden (Şekil 3.2) absorbansa karşılık salınan oligosakkarit miktarı hesaplanmıştır. Kümülatif salım değerleri Ek 3'deki örneğe uygun olarak hesaplanmış ve biyobozunma bu verilerle çizilen grafiklere göre değerlendirilmiştir.



Şekil 3.2. Oligosakkarit salım miktarının belirlenmesi amacıyla elde edilen glukoz kalibrasyon grafiği

84. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI

Bu bölümde çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere dekstran bazlı hidrojenlerin sentezlenmesi, yapısal karakterizasyonu ve *in vitro* ortamda, biyobozunmasıyla ilgili olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. Deneysel sonuçlar, dekstran bazlı hidrojenlerin sentezi; şişme kinetiğinin matematiksel analizi, yığın yapı, yüzey, kimyasal ve termal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yönelik M_c ve χ tayini, SEM, FTIR, ve TGA ile gerçekleştirilmiş karakterizasyon çalışmaları; hidrojenlerin IgG, BSA ve dekstranaz enzimi varlığındaki biyobozunma davranışlarının incelendiği çalışmalar olmak üzere üç ana başlık altında açıklanmıştır.

4.1. Dekstran Bazlı Hidrojenlerin Sentezi

Sunulan çalışmada öncelikle dekstran bazlı hidrojenler sentezlenmiştir. Hidrojel sentezinde 70.000 dalton molekül ağırlığına sahip "klinik dekstran" amaca uygunluğu açısından seçilmiş ve kullanılmıştır.

Bu çalışmada, dekstran hidrojenlerin hazırlanması amacıyla N,N'-metilenbisakrilamid (MBA) ve epiklorohidrin (ECH) çapraz bağlayıcı reaktiflerinin kullanımına karar verilmiştir. Daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalarda, dekstran hidrojenlerin, fonksiyonel grup içeren çapraz bağlayıcı reaktiflerle kimyasal yolla çapraz bağlanması sonucu sentezlenebileceği gösterilmiştir (Edman ve ark., 1980). Hovgaard ve Brøndsted (1995), dekstran hidrojenleri; dimetilsülfoksit varlığında 1,6-hekzanediizosiyanat ile çapraz bağlayarak sentezlemişlerdir. Bazı araştırmacılar da, dekstranı doğrudan çapraz bağlamak yerine, glisidil metakrilat (Van Dijk-Wolthuis ve ark., 1995) ve metakrilat türevli (Franssen ve ark., 1997) ya da vinil grubu taşıyan (Kim ve ark., 1999b) dekstranları hazırlamışlardır. Bir diğer grup araştırmacı ise dekstran türevli yapıların başlatıcı ve çapraz bağlayıcı varlığında serbest radikal polimerizasyonu ile veya γ -radyasyon polimerizasyonu ile dekstran hidrojenleri sentezlemişlerdir.

Son yıllarda, dekstranın doğrudan çapraz bağlanması ile hidrojel sentezi yöntemi pek çok araştırmacı tarafından en sık başvurulan yöntem olmuştur. Güner ve ark.

(2001), farklı fonksiyonel grup içeren çapraz bağlayıcı reaktiflerle dekstranın doğrudan çapraz bağlanması sonucu dekstran hidrojelleri sentezlemişlerdir. Grubumuzca protein ilaçların kolona-özümlenmesinde kullanılmak üzere yürütülen önceki bir çalışmada da benzer yöntem kullanılarak dekstran MBAm, ECH, ve glutaraldehit (GA) ile çapraz bağlanmış ve oluşan hidrojellerden BSA ve IgG salımı incelenmiştir (İmren, 2003). Sentezlenen hidrojellerin yüksek derecede şişebilme özelliklerine bağlı olarak emdirme yöntemiyle büyük miktarlarda protein ilaç yüklenebilmiş ve uygun salım davranışlarına ulaşılmıştır. Ancak, özellikle protein yükleme aşamasında dekstran-MBAm jellerin BSA varlığında, Dekstran-ECH jellerin ise IgG varlığında parçalanarak bozunduğu gözlenmiştir. Yürütülen bu tez çalışmasında da yukarıda sözü edilen çalışmanın devamı niteliğinde jellerin biyobozunma davranışlarının incelenmesine karar verilmiştir.

Sunulan çalışmada dekstran hidrojellerin sentezinin; klinik dekstranın ($M_w = 70\ 000$ g/gmol), çapraz bağlayıcı reaktif varlığında, bazik ortamda, doğrudan çapraz bağlanmasıyla yürütülmesine karar verilmiştir. Yöntem, uygulanması açısından son derece kolaydır. Çapraz bağlayıcı reaktif tipi değiştirilerek, hidrojinin şişme ve biyobozunma özelliklerinin belirlenebileceği düşünülmektedir. Bu avantajlarından dolayı, kontrollü ilaç salım teknolojisinde, bölgeye-özümlenmesi ilaç hedeflemesinde ve doku mühendisliği alanında kullanılacak hidrojellerin sentezi açısından son derece cazip bir yöntem olarak görülmektedir.

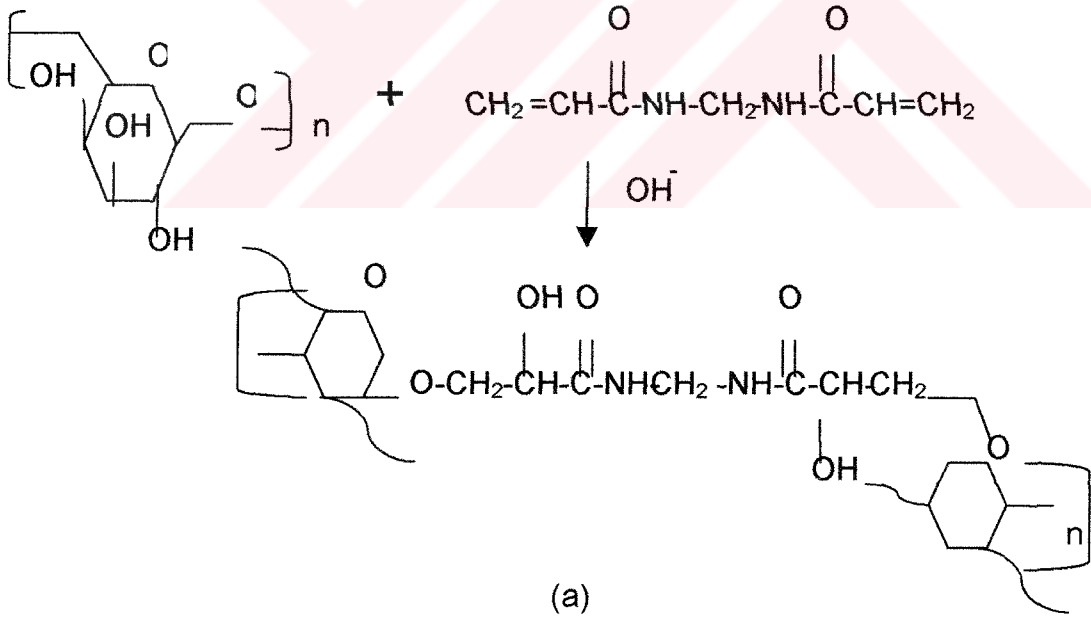
Bu yöntemle hidrojel sentezinde en büyük zorluk, dekstranın hidroksil grupları ile çapraz bağlayıcının fonksiyonel grupları arasındaki reaksiyonun etkili bir biçimde gerçekleşebilmesi için dekstran ve çapraz bağlayıcı miktarının çok iyi ayarlanması ve her bir çapraz bağlayıcı reaktif tipine göre çapraz-bağlanma sıcaklığının optimum bir ayar gerektirmesidir. Bu çalışmada İmren (2003) tarafından belirlenmiş optimum koşullar kullanılarak hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir.

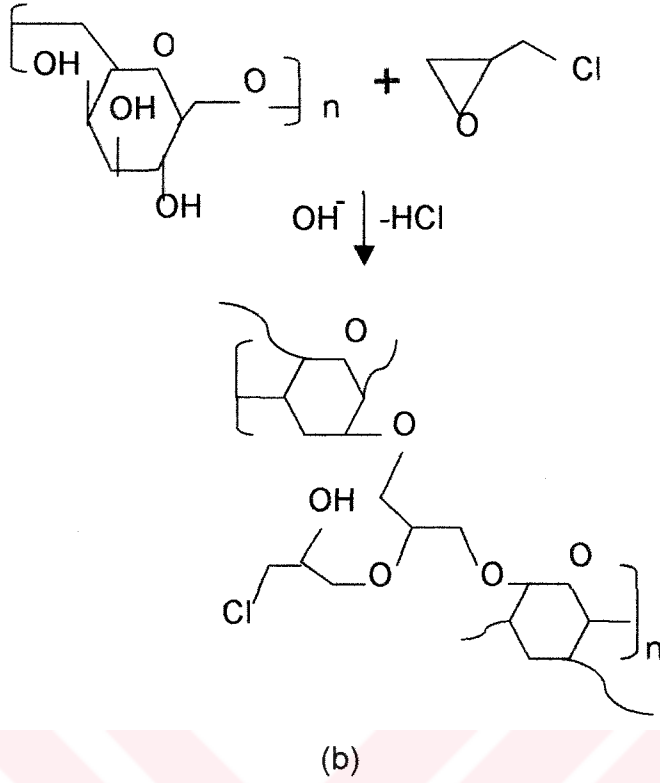
4.1.1. Çapraz bağlanma mekanizması

Dekstran ve çapraz bağlayıcı reaktiflerin Şekil 3.1'de verilen kimyasal yapılarına bakılarak ve ilgili literatürden de yararlanılarak çapraz bağlanma mekanizması açıklanabilir (Akman, 2000). MBAm, polifonksiyonel bir çapraz bağlayıcıdır ve dekstranın hidroksil grupları ile MBAm'in amin grupları arasındaki yan zincir

reaksiyonuyla çapraz bağlanma gerçekleşir. Çapraz bağlanma reaksiyonunun ilk basamağında, amid gruplarının hidrolizi gerçekleşir. Daha sonra, $H_2N-CH_2-NH_2$ doymamış fragmentlerinin uzaklaşmasıyla çapraz-bağlı hidrojel yapı oluşur (Şekil 4.1.a).

ECH'in eter polioller (etilen glikol ve polietilen glikol) ile bazik ortamdaki reaksiyonlarının çok sayıda epoksi reçinesinin üretiminde temel bir reaksiyon olduğu bilinmektedir. Bu reaksiyon NaOH varlığında gerçekleşir. Dekstranın ECH varlığında çapraz bağlanma reaksiyonu da benzer biçimde gerçekleşir. Bu reaksiyonda dekstran bir polieter poliol gibi davranır ve ECH ile reaksiyona girer. Dekstranın ECH ile reaksiyonunun ilk basamağında, epoksi halkası açılarak oluşan serbest klorohidrin fragmentleri makromolekülde (dekstran) yan zincir alkolat (Dx-ONa) oluşum reaksiyonunu başlatır. Sonraki basamakta, hidroksil ve klor grupları içeren iki makromolekül arasındaki deklorinasyon reaksiyonuyla çapraz-bağlı hidrojel oluşur (Şekil 4.1.b).





Şekil 4.1. Dekstranın çapraz-bağlanma mekanizmaları
 (a) MBAm ile çapraz-bağlanma
 (b) ECH ile çapraz-bağlanma

4.1.2. Çapraz bağlayıcı reaktif tipi ve oranının hidrojel sentezine etkisi

Bölüm 4.1.1'de açıklandığı gibi çapraz-bağlanma reaksiyonları bazik ortamda gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle tüm reaksiyonlar 2.8 N NaOH varlığında yürütülmüştür. Dekstran hidrojeller teorik olarak, dekstranın hidroksil grupları ile çapraz bağlayıcının fonksiyonel grupları arasındaki reaksiyon sonucu sentezlenmektedir. Çapraz bağlayıcı reaktif tipi değiştikçe, içerdiği fonksiyonel gruplar da değişmekte ve sonuç olarak hidrojel sentezi de önemli ölçüde etkilenmektedir. Bu çalışmada farklı fonksiyonel grup içeren MBAm ve ECH çapraz bağlayıcıları ile bu çapraz bağlayıcıların ağırlıkça %50 oranında hidrojel sentezlenmesine karar verilmiştir.

Çizelge 4.1'de çalışma kapsamında sentezlenen jellerin bileşimine ve özelliklerine yer verilmiştir. MBAm varlığında hidrojel sentezi sırasında verimin çok düşük olduğu ve elde edilen hidrojellerin şişme sırasında büyük ölçüde parçalandığı gözlenmiştir. ECH varlığındaki sentez sırasındaki ise verim bağıl olarak daha

yüksek olmasına karşın reaksiyon ortamına etanol ilave edildiğinde %100'e yakın bir verim elde edilmiştir. Ayrıca sentezlenen jellerin mekanik açıdan da daha dayanıklı bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durumda, Çizelge 4.1'deki listeye etanol varlığında hazırlanan jeller de ilave edilmiştir

Çizelge 4.1 Çapraz bağlayıcı reaktif tipi (ÇR) ve miktarı

| Hidrojel | Dekstran (g) | Ç.R tipi | Ç.R mik. (g) | Yorum |
|---------------|--------------|----------|--------------|------------------------------------|
| Dx-MBAm | 0.20 | MBAm | 0.20 | Sarımtırak yapıda jel elde edildi. |
| Dx-ECH | 0.20 | ECH | 0.20 | Şeffaf yapıda jel elde edildi. |
| Dx-ECH+etanol | 0.20 | ECH | 0.20 | Şeffaf yapıda jel elde edildi. |

γ -radyasyonuyla çapraz-bağlı hidrojel sentezine yönelik literatüre (Akman, A.Ö., 2000) uygun olarak yürütülen çalışma başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu durumun, radyasyon toplam dozu (399.6 Mrad/saat) aynı tutulmasına rağmen, Kimya bölümü'nde mevcut γ -kaynağının doz hızının zaman içerisinde çok düşük değerlere (0.0185 Mrad/saat) inmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır ve bu konu tez kapsamında çıkartılmıştır. Hidrojel sentezi için uygun sıcaklık programının seçiminde yine önceki çalışmaların sonuçları göz önüne alınmış ve Çizelge 4.2'de belirtilen programlarda çalışılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.2 Hidrojel sentezi için sıcaklık programı

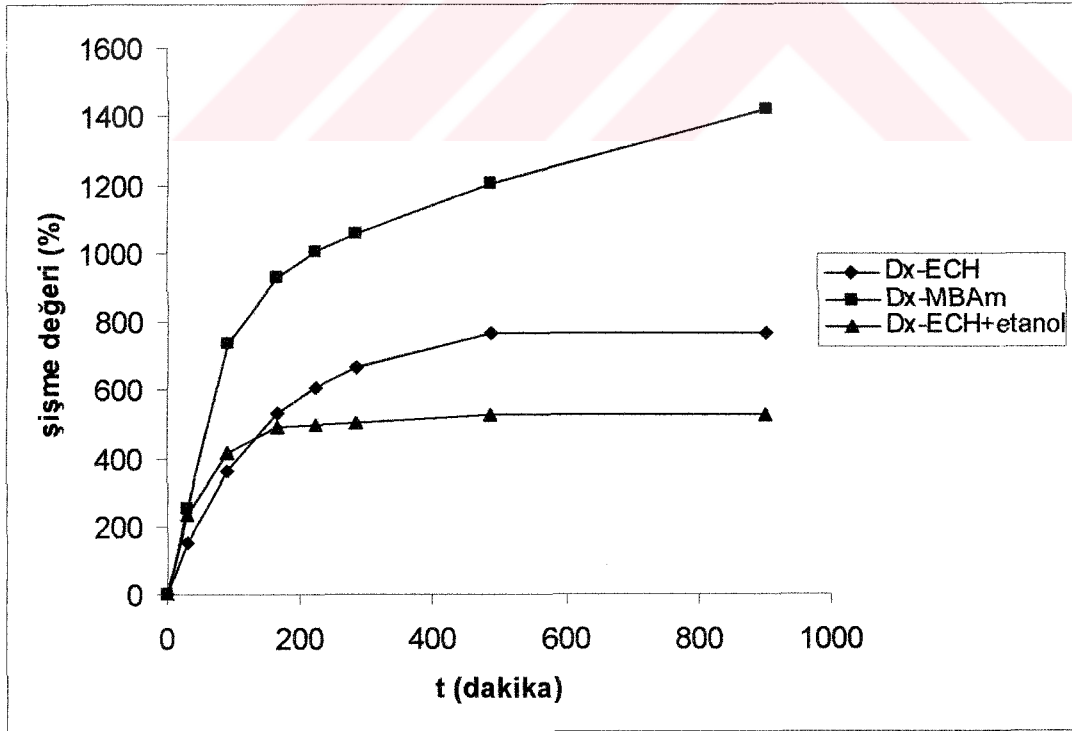
| Hidrojel | Sıcaklık-zaman programı |
|---------------|-----------------------------|
| Dx-MBAm | 2 saat 25°C, 60 saat 37,5°C |
| Dx-ECH | 2 saat 25°C, 60 saat 37,5°C |
| Dx-ECH+etanol | 70 saat 10°C |

4.2. Dekstran Hidrojellerin Karakterizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde, hidrojellerin şişme deneyleri, şişme kinetiğinin matematiksel analizi, M_c tayini, hidrojellerin SEM ile analizi, FTIR spektrumları, ve termal analizleriyle ilgili deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve gerekli tartışmalar yapılmıştır.

4.2.1. Hidrojellerin şişme deneyleri ile ilgili sonuçlar

Hidrojellerin dinamik şişme deneyleri, kuru halde 7 mm çap ve 3 mm kalınlığa sahip disk formundaki hidrojellerle, pH 7.4'deki PBS tampon çözeltilerinde yürütülmüştür. Dinamik şişme deneylerinde gravimetrik tayin yöntemi kullanılmıştır. Vakum etüvünde sabit tartıma gelen kuru örnekler, PBS tamponu içeren 25 ml hacimdeki beherler içerisine daldırılmış ve şişme deneyi başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında ortamdan uzaklaştırılan örneklerin şişme değerleri (% su içeriği) kuru ağırlık temelinde hesaplanmış ve zamana karşı grafiğe geçirilerek şişme eğrileri elde edilmiştir. Şekil 4.2'de Dx-MBA_m, Dx-ECH ve Dx-ECH+etanol hidrojellerine ait şişme eğrileri görülmektedir.



Şekil 4.2. Dekstran hidrojellerin şişme eğrileri

Dinamik şişme deneylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde; şişmenin dekstran-ECH hidrojenleri ve dekstran-MBAm hidrojenleri için ilk 90 dakikada; dekstran-ECH+etanol hidrojenleri için ise ilk 30 dakikada oldukça hızlı olduğu görülmüştür. Dekstran-ECH hidrojenlerinin 8 saat sonra dengeye ulaştığı; dekstran-MBAm hidrojenlerinin 15 saat sonra dengeye ulaştığı ve dekstran-ECH+etanol hidrojenlerinin ise 4 saat sonra denge'ye ulaştıkları görülmüştür. dekstran-MBAm örneklerinin, denge şişmelerine ulaşmadan büyük oranda parçalandıkları görülmüştür.

Hidrojenlerin dengeye ulaşma süresinin ve denge şişme değerlerinin dekstran-MBAm > Dx-ECH > Dx-ECH+etanol > şeklinde olduğu görülmüştür.

4.2.2. Şişme kinetiğinin matematiksel analizi

Çalışma kapsamında hazırlanan dekstran hidrojenlerin yüksek derecede şişme özelliğine sahip olmaları ve şişme sırasında diskin hacminde önemli derecede bir şişmenin olması nedeniyle (kuru halde disk çapı=7 mm, kalınlık=3 mm; denge şişmesine ulaşıldığında çap=20 mm, kalınlık=6 mm olmaktadır. Bu değerler dekstran-ECH için ortalama değerlerdir ve 18 katlık hacim artışı gerçekleşmektedir.) yüksek-dereceden şişen jeller için Schott (1992) tarafından difüzyon-kontrollü şişmeyi ikinci derece kinetik ile tanımlayan teorik model kullanılmaktadır. Bu model daha sonra başka araştırma grupları tarafından da farklı kimyasal yapıdaki, yüksek-dereceden şişebilen hidrojenler için uygulanmıştır. Peniche ve grubu (1996), 2-hidroksietil metakrilat-trietilenglikol hidrojenlerinin S_{eq} değerlerinin pH'ya bağlı değişimini incelemiş ve deneysel şişme değeri ile teorik denge şişme değeri arasında iyi bir uyum olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı grup; diğer bir çalışmada IPN yapıda kitosan/poliakrilik asit membranların, S_{eq} ve k_s değerlerini bu yöntemle göre hesaplamıştır (Peniche ve ark., 1999).

Schott'un önerdiği model Eş. 4.1 ile ifade edilmiştir.

$$t/S = A + Bt \quad (4.1)$$

Burada S, herhangi bir t anındaki şişme olup,

$$S = (S_w - S_0)/S_0 \quad (4.2)$$

Eş. 4.2 ile tanımlanmıştır. S_0 , hidrojinin başlangıçtaki yani kuru ağırlığı, S_w ise herhangi bir t anındaki ağırlığıdır. Diğer bir deyişle “S”, Eş. 3.1’de verilen “%su içeriği” değerlerinin 100 ile çarpılmamış halini ifade etmektedir.

Uzun-zaman periyodunda Eş. 4.1’deki $Bt \gg A$ olacağından A ihmal edilebilir ve $B=1/S_{eq}$ olarak tanımlanır. S_{eq} , zaman ∞ ’a giderken, yani dengedeki şişme değeri olup, Eş. 3.1’de tanımlanan EWC değerinin 100 ile çarpılmamış halidir.

Kısa-zaman periyodunda ise $A \gg Bt$ olacağından limit durumda Eş. 4.1,

$$\lim_{t \rightarrow 0} (ds/dt) = 1/A \quad (4.3)$$

şekline dönüşecektir.

Böylece $A = 1/(ds/dt)_0$ olarak ifade edilebilir. Kısacası fiziksel anlam olarak B ; maksimum şişmenin (denge şişmesi) tersi, A ise; başlangıç şişme hızının tersidir.

Eşitlik 4.9 ikinci derece şişme kinetiğini ifade etmek üzere

$$ds/dt = k_s (S_{eq} - S)^2 \quad (4.4)$$

şeklinde yazılabilir. Burada k_s , özgül hız sabiti olup A ’ya bağlı olarak

$$k_s = 1/(A S_{eq}^2) \quad (4.5)$$

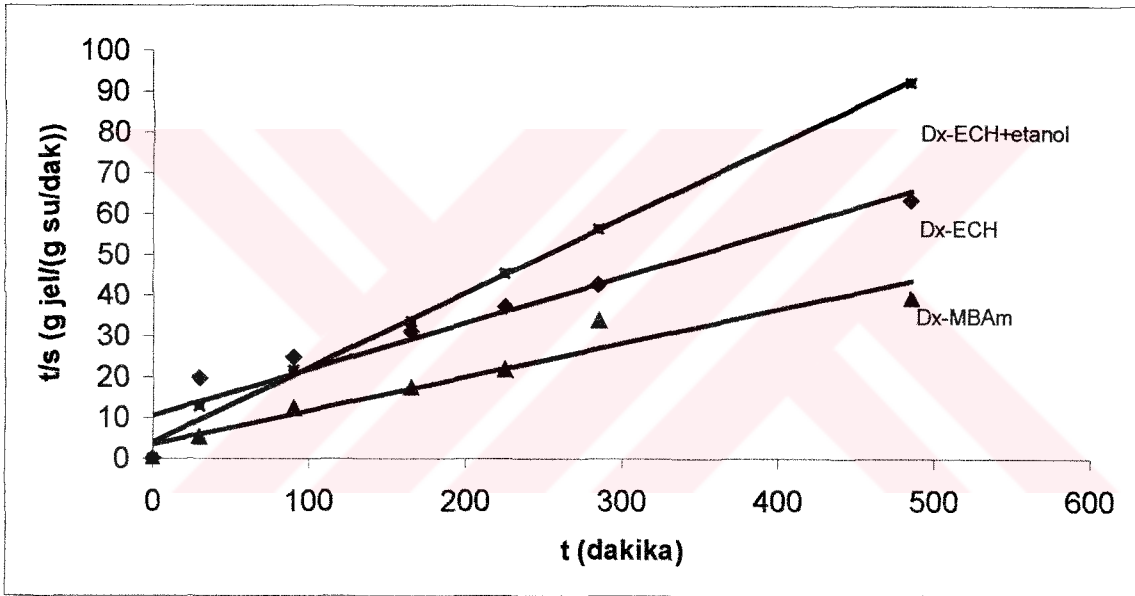
şeklinde ifade edilir.

Çalışma kapsamında hazırlanan dekstran hidrojinin (S) değerinden faydalanarak, t/S değerleri zamana (t) karşı grafiğe geçirilmiş ve lineer regresyon ile doğru eğimleri ve kesim noktaları bulunmuştur. Şekil 4.3, Dx-MBAm, Dx-ECH ve Dx-ECH+etanol hidrojinin için deneysel şişme verilerinin Eşitlik 4.1’ a uygulanması sonucu elde edilen grafiklerdir. Herbir durumda deneysel veriler ile modelin uyumu iyi olup ($R^2 \geq 0,9276$) şişme davranışının ikinci derece difüzyon kinetiğine uyduğunu göstermektedir.

Şekil 4.2’de, hidrojinin için su içeriği (S) değerlerinin zamanla değişimine bakıldığında başlangıçta S ile t arasındaki artışın doğrusal olduğu görülmektedir ki bu da şişmede “Case II” mekanizmasının etkin olduğunu ifade eder (Windle, 1985). Difüzyon hızı ve su moleküllerinin hareketliliği, polimer segmentlerinin

hareketliliğinden fazla olduğu durumda "Case II" mekanizması gerçekleşir. Difüzyon tabakaları karşı yüzeylerden polimerin merkezine doğru ilerleyerek merkezde karşılaşırlar. Bu basamakta hidrojel önemli miktarda su absorpladığı için elastik davranış gösterir. Daha sonra şişme, makromolekül zincirlerinin gevşemesiyle devam eder ve böylelikle su alımı yani şişme ikinci derece kinetiğe uygun olarak gerçekleşir.

Şekil 4.3'de sunulan eğrilerden elde edilen değerler (eğim ve kesim noktası), Eşitlik 4.1'a göre düzenlenmiş ve her bir hidrojel için teorik denge şişme değerleri (S_{eq}) ve başlangıç şişme hızları $((ds/dt)_0)$ hesaplanarak Çizelge 4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.3. Hidrojellere ait t/S - t eğrileri (noktalar deneysel verileri, düz doğrular ise modeli ifade etmektedir).

Çizelge 4.3. Dekstran hidrojeller için hesaplanan şişme parametreleri ve deneysel EWC değerleri.

| | S_{eq} (g su/g jel) | $(ds/dt)_0$ (g su/g jel.dak) | R^2 | EWC (%) |
|---------------|--------------------------|---------------------------------|--------|---------|
| Dx-ECH | 8.7951 | 0.0940 | 0.9276 | 525 |
| Dx-ECH+etanol | 5.4378 | 0.2520 | 0.9949 | 764 |
| Dx-MBAm | 12.0337 | 0.2924 | 0.9372 | 1417 |

Çizelge 4.3'de açıkça görüldüğü gibi, dekstran-MBAm S_{eq} değeri dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojellerine göre daha yüksektir. Hidrojellerin başlangıç şişme hızları karşılaştırıldığında; dekstran-MBAm hidrojellerinin başlangıç şişme hızlarının dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojellere göre daha yüksek olduğu görülmektedir. S_{eq} ve $(dS/dt)_0$ için elde edilen sonuçlar, hidrojellerin deneysel şişme değerleri (EWC) ile teorik şişme değerleri arasındaki uyumun kanıtı olarak alınabilir.

4.2.3. M_c tayini ile ilgili sonuçlar

Çapraz bağlı yapılar için tanımlanan çapraz bağlar arası molekül ağırlığı M_c , polimerlerin ağ (network) yapısı hakkında bilgi vermektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar, denge şişme anında polimerin hacim kesrinin ($v_{2,s}$) saptanmasına dayanmaktadır.

Sunulan çalışmada da dekstran-MBAm, dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojellerin M_c ve elek boyutu (ζ) gibi yapısal parametreleri, piknometrik yöntemle saptanmıştır.

Hidrojellerin M_c değerleri Flory-Rehner teorisinin, Peppas ve Merril tarafından modifiye edilmiş formu olan Eşitlik 4.6 yardımıyla hesaplanmıştır. Bu eşitlikte M_n , dekstranın sayıca ortalama molekül ağırlığı ($M_n=46800$ dalton), v , dekstranın kısmi özgül hacmi ($v=0.62$ cm³/g), V_1 , suyun molar hacmi ($V_1=18$ cm³/g), χ_1 ise Flory polimer-çözücü etkileşim parametresidir (Dekstran-su sistemi için $\chi_1=0.473$) (De Jong ve ark., 2001). Hidrojellerin denge şişmesine ulaştığı durumdaki elek boyutları (ζ) ise Eşitlik 4.9 kullanılarak hesaplanmıştır (Peppas ve ark., 1985).

$$1/M_c = 2/M_n - \frac{(v/V_1) [(\ln(1-v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2)]}{v_{2,s} [(v_{2,s}/v_{2,r})^{1/3} - 1/2(v_{2,s}/v_{2,r})]} \quad (4.6)$$

$$\zeta = (v_{2,s})^{-1/3} \sqrt{r_0}^{-2} \quad (4.7)$$

Burada; $\sqrt{r_0}^{-2}$, birbirini izleyen iki çapraz bağ arasındaki ortalama uzaklığı (kuru hidrojel için), $v_{2,s}$ ise denge şişme durumunda polimerin hacim oranını gösterir.

Dekstran hidrojenlerin elek boyutunun belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda $\sqrt{r_o^{-2}}$ değerini molekül ağırlığına bağlayan Eşitlik 4.8 türetilmiştir (Gekko, 1981).

$$\sqrt{r_o^{-2}} = 0.071 \sqrt{M_n} \quad (4.8)$$

Eşitlik 4.8'deki $\sqrt{r_o^{-2}}$ değeri, Eşitlik 4.7'de yerine konulmuş ve M_c ile M_n yer değiştirilerek aşağıdaki eşitlik türetilmiştir.

$$\zeta = 0.071 (v_{2,s})^{-1/3} \sqrt{M_c} \quad (4.9)$$

Sunulan çalışmada; yukarıda sunulan bilgilere dayanarak, dekstran hidrojenlerin elek boyutu Eşitlik 4.9 ve M_c değerleri Eşitlik 4.9 kullanılarak hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.5'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Çalışma kapsamında hazırlanan dekstran hidrojenlerin ağ yapı özellikleri

| Örnek | $v_{2,r}$ | $v_{2,s}$ | M_c (g/mol) | ζ (nm) |
|---------------|-----------|-----------|------------------|-----------------|
| Dx-MBAm | 0.2278 | 0.0319 | 7385 | 19.23 |
| Dx-ECH | 0.3062 | 0.0313 | 7128 | 19.02 |
| Dx-ECH+etanol | 0.3300 | 0.0305 | 6499 | 18.32 |

Çizelgedeki sonuçlar, en az üç örnek üzerinden yürütülen deney sonuçlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır

Çizelge 4.4'de görüleceği gibi çalışma kapsamında hazırlanan dekstran hidrojenlerin M_c değerleri ortalama 6499-7385 g/mol aralığında değişmektedir. $M_c > 5000$ g/mol olduğu için hidrojenlerin düşük derecede çapraz bağlı oldukları söylenebilir.

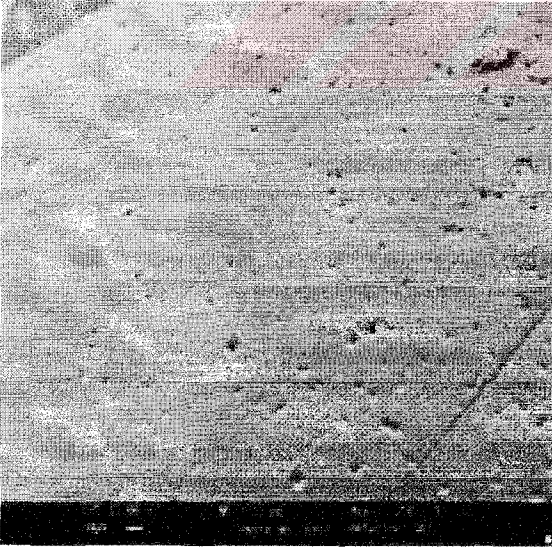
Ağırlıkça %50 oranında çapraz bağlayıcı içeren dekstran-MBAm ve dekstran-ECH hidrojenlerinin M_c değerleri karşılaştırıldığında, çapraz bağlayıcı reaktif tipinin M_c değerini fazla etkilemediği görülmektedir. dekstran-ECH+etanol hidrojeni için M_c değerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, etanolün ECH'ye çapraz bağlanma reaksiyonunda daha aktif ortam yarattığı ve artan çapraz bağlanma miktarına paralel olarak M_c değerinin azaldığı şeklinde yorumlanabilir. De Jong ve

grubu (2001) tarafından yapılan bir çalışmada da dekstran-laktat hidrojel için M_c değerlerinin 5800-6800 g/mol aralığında değiştiği bulunmuştur.

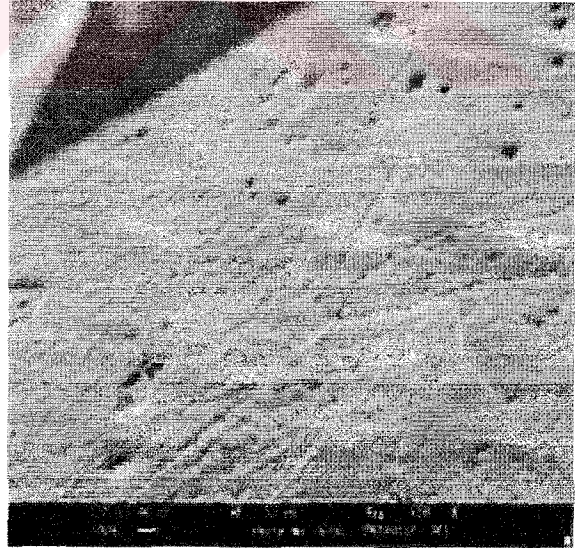
Elek boyutları (ζ) ile ilgili sonuçlar değerlendirildiğinde; çalışma kapsamında sentezlenen dekstran hidrojellerin denge şişme durumundaki elek boyutlarının dekstran-MBAm jeli için ortalama 19,02 nm, dekstran-ECH jeli için ortalama 19,23 nm ve dekstran-ECH+etanol jeli için ise 18,32nm olduğu Çizelge 4.5'de görülmektedir.

4.2.4. Hidrojellerin SEM ile Analizi

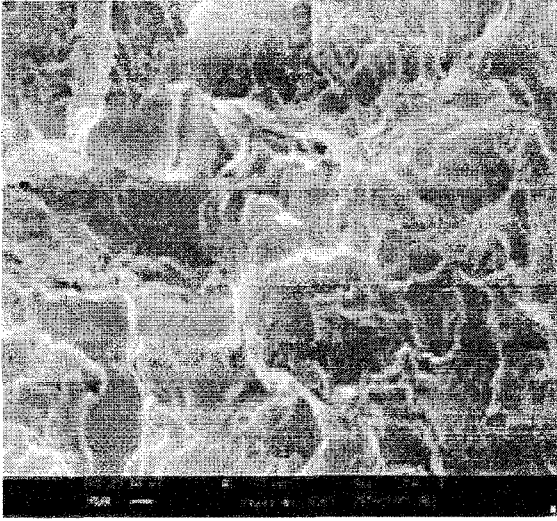
Çalışma kapsamında hazırlanan hidrojellerin yüzey ve yığın yapısı Bölüm 3.3.5'de açıklanan yöntemine uygun olarak SEM ile incelenmiştir. dekstran-MBAm ve dekstran-ECH hidrojellerin yüzey yapılarını gösteren SEM fotoğrafları iki farklı büyütmede (x250 ve x650) karşılaştırılmıştır. Şekil 4.4 a ve b'de görüldüğü gibi dekstran-ECH hidrojel oldukça düzgün ve kararlı bir yüzey yapısına sahipken, dekstran-MBAm hidrojellerin yüzeyi daha pürüzlüdür ve şişmeye bağlı olarak oluşan çatlaklar son derece belirgin olup malzemede düşük mekanik dayanıma sebep olmaktadır (Şekil 4.4 c ve d).



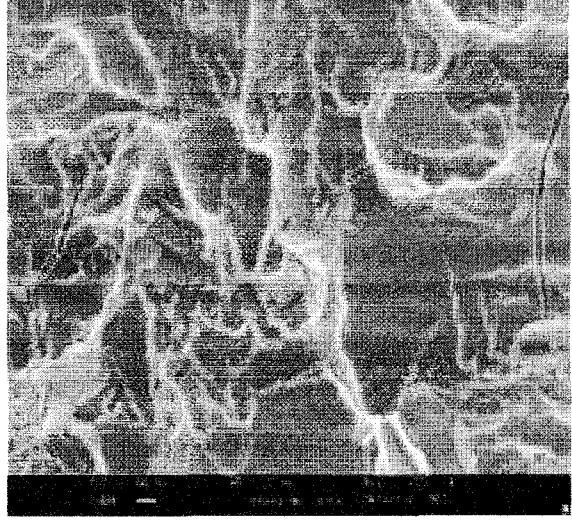
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.4. Hidrojellere ait SEM fotoğrafları

- Dx-ECH hidrojel (Büyütme x250)
- Dx-ECH hidrojel (Büyütme x650)
- Dx-MBAm hidrojel (Büyütme x250)
- Dx-MBAm hidrojel (Büyütme x650)

4.2.5. FTIR Analizi

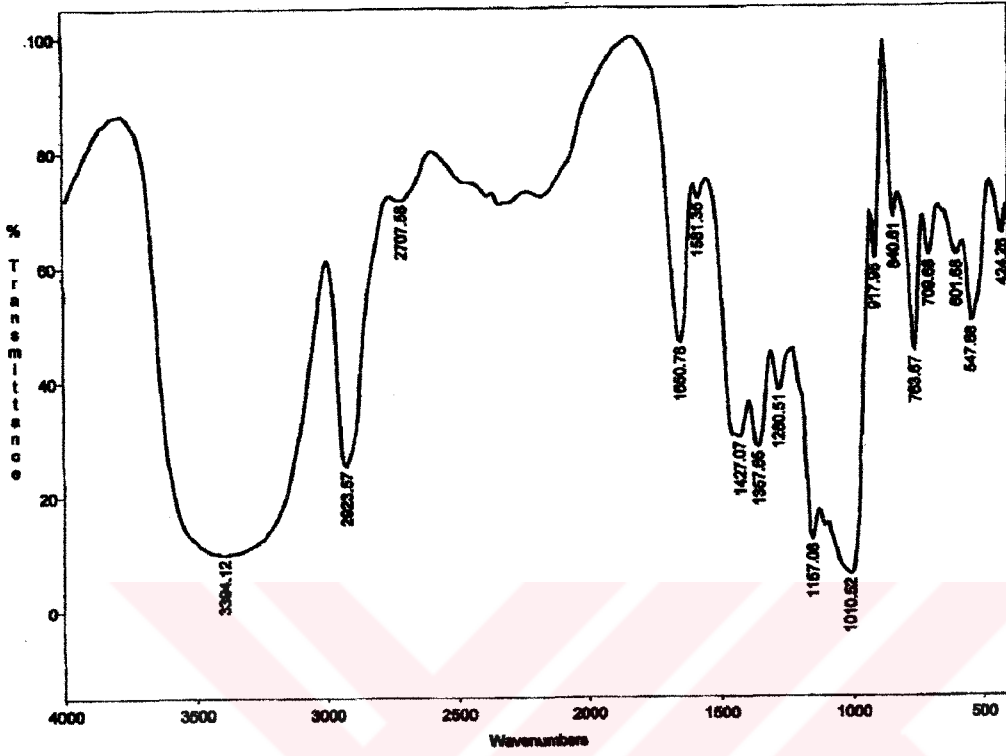
Farklı çapraz-bağlayıcılarla sentezlenen dekstran hidrojellerde çapraz bağlanma reaksiyonunun hangi gruplar üzerinden yürüdüğü belirlenmesi ve çapraz bağlayıcı türünün yapıda meydana getirdiği değişikliklerin saptanması amacıyla örnekler FTIR spektrofotometresi ile kalitatif olarak incelenmiştir. Spektrumlar 4 cm^{-1} çözünürlükte ve $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında kaydedilmiştir.

4.2.5.1. Hidrojellerin FTIR spektrumları

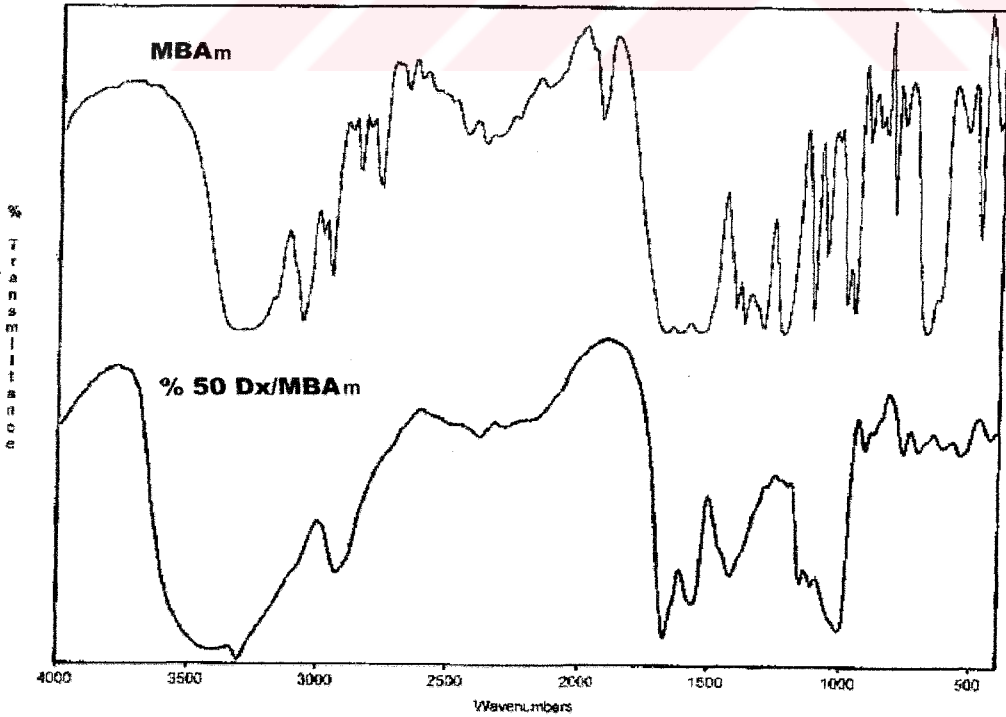
Şekil 4.5'da ticari dekstran'ın (T70) FTIR spektrumu görülmektedir. Bu spektrumda 3394 cm^{-1} deki geniş bant, yapıdaki OH gruplarını göstermektedir. Şekil 4.6 ve 4.7 ise sırasıyla MBAm, dekstran-MBAm ve ECH, dekstran-ECH; çiftlerine ait spektrumlar yer almaktadır. Bu spektrumların değerlendirilmesi için bantların yoğunluğunda ve yerleşiminde gözlenen değişiklikler Çizelge 4.5 ve 4.6'da sunulmuştur.

dekstran–ECH-etanol hidrojelleri için elde edilen FTIR spektrumunun dekstran-ECH hidrojelleri ile bire bir uyduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, etanol'ün çapraz

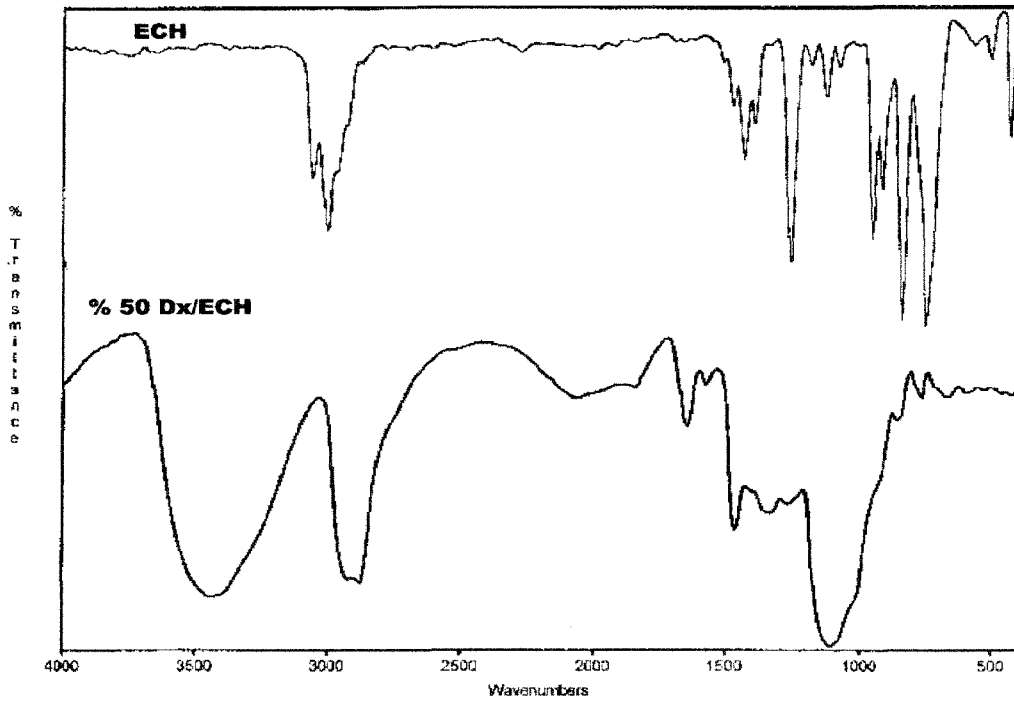
bağlanma reaksiyonuna katılmadığı yalnızca ECH'ye daha aktif bir ortam yaratarak, çapraz bağ yoğunluğunu arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 4.5. Dekstran polimerine ait FTIR spektrumu



Şekil 4.6. MBAm, dekstran-MBAm FTIR spektrumları



Şekil 4.7. ECH, dekstran-ECH FTIR spektrumları

Çizelge 4.5. N,N¹-metilen-bis-akrilamid (MBAm) ve dekstran-MBAm hidrojeline ait FTIRspektrum verileri ve değerlendirilmesi.

| Dalgaboyu (cm ⁻¹) | | |
|-------------------------------|------------------|---|
| MBAm | Dx-MBAm | Açıklama |
| 3326, 3270 b | | N-H gerilmesi, serbest ve H bağlı |
| | 3425 b | O-H gerilmesi |
| | 3308 sp | N-H gerilmesi |
| 3072 s | da-sh | Süstitüe amid |
| 2960 sp | 2923 b | C-H gerilmesi |
| 1665, 1615 sp | 1665, 1634 sh-di | C=O tersiyer amid (-CONR ₂) |
| 1540 sp | 1560 di | N-H bükülmesi |
| 1417 w | Da | C-N gerilmesi |
| 1386, 1312 m | Da | CO-NH-R gerilmesi |
| 1230 sp | Da | C-N gerilmesi |
| 1120 s | Di | C-O-C gerilmesi |
| 990, 958 s | Da | N-H titreşimi |
| | 1014 s | C-O gerilmesi |
| 680 s | Di | N-C=O gerilmesi |
| 481 s | Di | C-C=O gerilmesi |

Çizelge 4.6.Epiklorohidrin (ECH) ve Dx-ECH hidrojeline ait FTIR spektrum verileri ve değerlendirilmesi

| Dalgaboyu (cm ⁻¹) | | |
|-------------------------------|--------------|-----------------------|
| ECH | Dx-ECH | Açıklama |
| | 3444 b | O-H gerilmesi |
| 3010 s | 2917, 2880 s | C-H gerilmesi |
| | 1647 s | O-H bükülmesi |
| 1436 m | 1467 m | C-C gerilmesi (halka) |
| 1296 s | Di | Epoksi halkası |
| | 1107 b | C-O gerilmesi |
| 965 m | Di | C-O gerilmesi |
| 853 s | Di | Epoksi halkası |
| 753 s | Di | C-Cl gerilmesi |

Kısaltmalar: s: Güçlü (strong), sp: Keskin (sharp), w: Zayıf (weak), sh: Omuz (shoulder), m: Orta (medium), da: Yokolma (disappear), b: Geniş (broad), di: Şiddet azalması (decreased intensity)

FTIR ile ilgili tüm veriler değerlendirildiğinde;

Dx-MBAm spektrumlarında;

- 1634 cm⁻¹ ve 1014 cm⁻¹'de sırasıyla C=O üçlü amid (-CONR₂) ve C-O gerilmesine karşılık gelen yeni absorpsiyon bandları oluşmuştur.
- 1417 cm⁻¹ (C-N gerilmesi), 1386, 1312 cm⁻¹(CO-NH-R gerilmesi), 1230 cm⁻¹ (C-N gerilmesi) ve 990, 958 cm⁻¹ (N-H titreşimi) yok olmuştur.
- 1560 cm⁻¹ (N-H bağı), 1120 cm⁻¹ (C-O-C gerilmesi), 680 cm⁻¹ (N-C=O gerilmesi) ve 481 cm⁻¹ (C-C=O gerilmesi)'nin şiddetleri dikkate değer ölçüde azalmıştır.

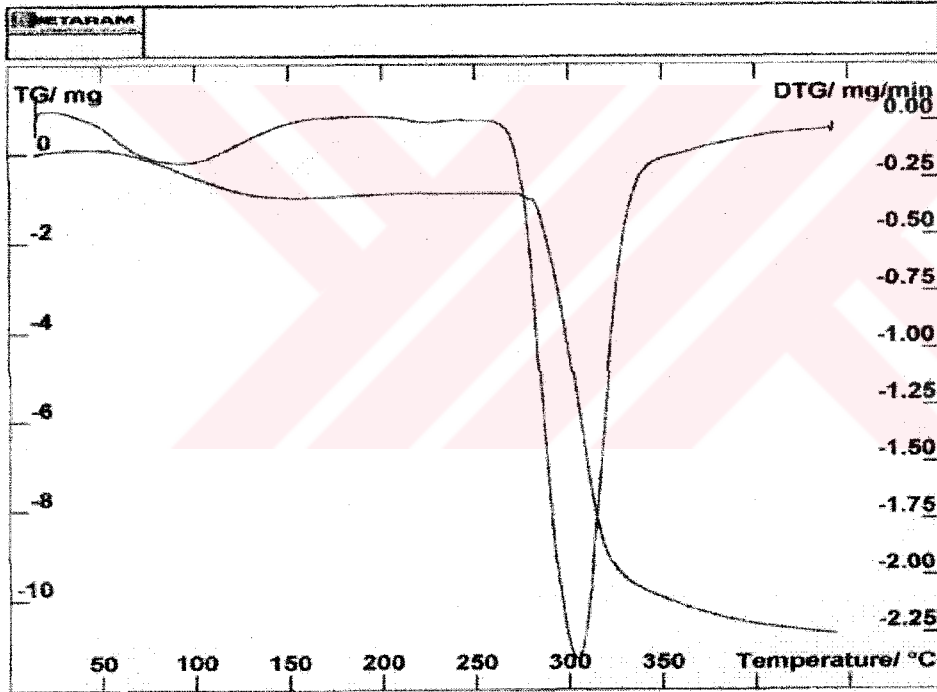
Dx-ECH spektrumlarında;

- 1107 cm⁻¹ (C-O gerilmesi) ortaya çıkmıştır.
- 1269 cm⁻¹ (epoksi halkaları), 956 cm⁻¹ (C-O gerilmesi), 853 cm⁻¹ (epoksi halkaları) ve 753 cm⁻¹ (C-Cl gerilmesi)'nin şiddeti belirgin şekilde azalmıştır.

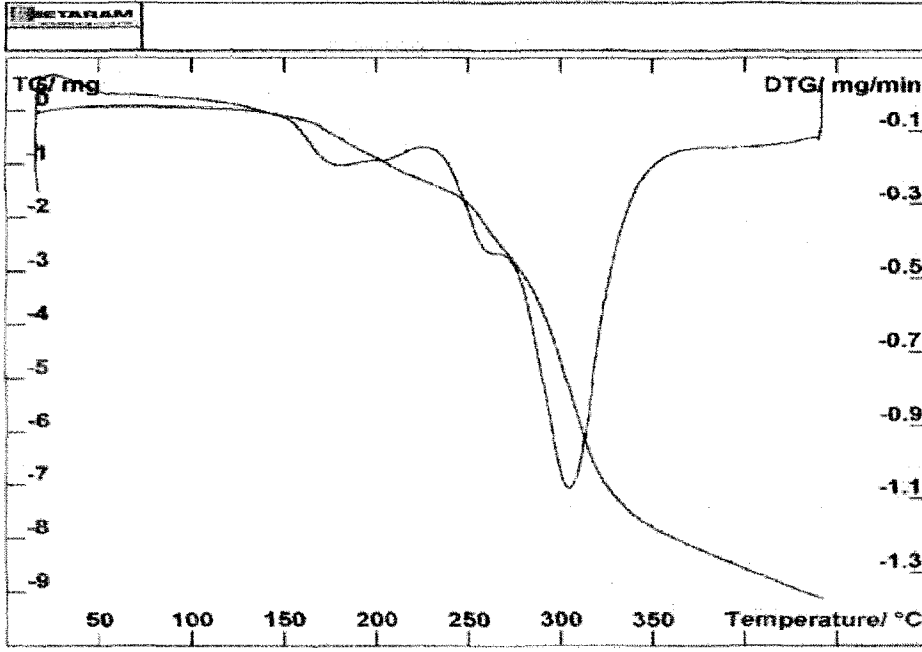
Sonuç olarak, teorik açıdan da beklenildiği gibi çapraz-bağlanma reaksiyonlarının MBAm'in amino grupları, ECH'in epoksi halkaları ve klor grupları ile dekstran'ın hidroksil gruplarının yan zincir reaksiyonları sonucu dekstran'ın hidroksil grupları üzerinden yürüdüğü söylenebilir.

4.2.6. Termal Analiz Sonuçları

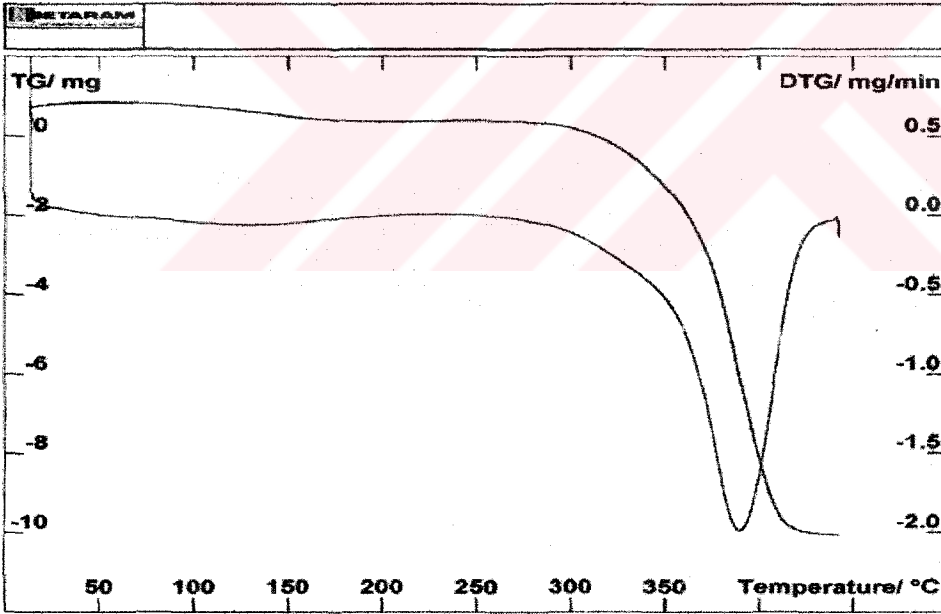
Çalışma kapsamında hazırlanan hidrojellerin termal davranışı, TGA ile incelenmiştir. Analizler Bölüm 3.4.3'de açıklanan yöntemine uygun olarak TGA ile 25°C-500°C aralığında, 10°C/dak. ısıtma hızıyla yürütülmüştür. Dekstran, dekstran-MBAm, dekstran-ECH ve örnekleri için TGA analizine ait termogramlar Şekil 4.10 a, b ve c'de gösterilmiştir. Hidrojellerin içerdiği nem miktarları, oda sıcaklığı (25°C) ile 200°C aralığındaki ağırlık kaybından saptanmıştır. Bu nem, işlem öncesi örnek vakum etüvünde kurutulmasına rağmen yine de yapıda kalmış olan suyun ve yapının hidrofilitesi nedeniyle analiz başlayana kadar almış olduğu nemin toplamı olarak düşünülebilir. Termogramın zamana göre birinci türevinden ağırlıkça kaybın başladığı değer net olarak belirlenmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.8. TGA analizine ait termogramlar

- a) Dekstran polimeri
- b) Dx-MBAm
- c) Dx-ECH

Dekstrana ait TGA termogramına göre; başlangıçta suyun buharlaşmasından kaynaklanan kütle kaybının yanında, 200°C'nin üzerinde yapısal bozunma

başlamaktadır. T = 30-170°C arasında keskin bir endotermik pik vardır. Bu yapıda kalan suyun buharlaşmasından kaynaklanmaktadır ve pikin entalpi değeri 161,86 j/g'dır. Bu değer, yaklaşık % 7.16 oranındaki suyun buharlaşma entalpisidir (saf suyun buharlaşma entalpi 2260 j/g). Maksimum kütle kaybı 300°C'de gerçekleşmektedir. dekstran-MBAm ve dekstran-ECH hidrojel için, su pikinin entalpi değerleri sırayla 222,83, 88,59 ve 64,41j/g'dır. Bu entalpi değerlerinden ve TGA termogramlarından elde edilen sonuçlara göre hidrojellerin nem içerikleri ve termal bozunma değerleri Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Tüm hidrojellerde sıcaklık artışıyla tek basamakta dekompozisyon gözlenmiştir. Dekstran ve dekstran-MBAm için termal kararlılık benzer davranış gösterirken, dekstran-ECH jeller termal açıdan daha kararlıdır. Hidrojeller ısıl kararlılık açısından dekstran-ECH> dekstran-MBAm şeklinde sıralanabilir.

Çizelge 4.7. Dekstran hidrojel için termal analiz sonuçları

| Örnek | % ÇR (w/w) | Nem İçeriği (% ağırlık) | Termal bozunmanın başlangıcı (°C) | Maksimum kütle kaybının olduğu sıcaklık (°C) |
|----------|------------|-------------------------|-----------------------------------|--|
| Dekstran | - | 7.16 | 261.18 | 303.84 |
| Dx-MBAm | 50 | 9.86 | 240.51 | 305.21 |
| Dx-ECH | 50 | 3.92 | 320.33 | 388.46 |

4.2.7. Dekstan hidrojellerin biyobozunma davranışlarının incelenmesi ile ilgili sonuçlar

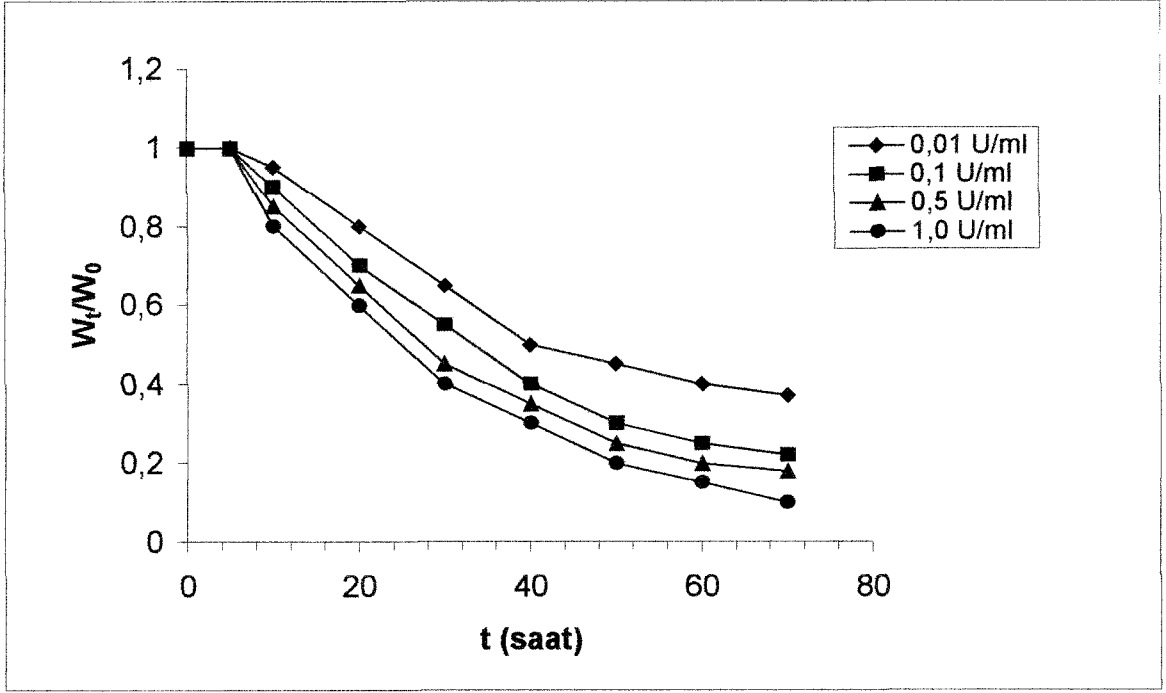
Biyolojik ortam, çok sayıda malzemenin yavaş yavaş ya da hızlı bir şekilde bozunmasına neden olabilecek kadar güçlü bir ortamdır. Vücuda implante edilebilen biyomalzemede ardarda gözlemlenebilen çeşitli olaylar sonucunda biyobozunma gerçekleşir. Örneğin, uygulanan gerilimler sonucu malzemede çatlaklar oluşur ve bu kısımlar reaksiyona açık yeni yüzeyler oluşmasına neden olur. Malzemenin, içinde bulunduğu ortam sıvısını absorplayarak şişmesi de (özellikle hidrojelde) aynı şekilde reaktif yüzeyler oluşturacaktır. Bozunma sonucu oluşan ürünler, ortamın pH değerini yükselterek yeni reaksiyonlara zemin hazırlayabilir. Polimerin hidrolizi, daha hidrofilik yapılar oluşmasına ve dolayısıyla polimerlerin şişmesine, bozunma sonucu ortaya çıkan birtakım malzemelerin de polimerin yığın yapısına girmesine neden olabilir.

Bir biyomalzeme vücuda implante edildikten sonra, adsorpsiyon ve absorpsiyon prosesleri meydana gelir. Vücut sıvısıyla temas halinde olan polimerik yüzeyler, protein ve benzeri bileşenleri adsorplar ve yığın yapı, su, protein, lipid gibi gibi bileşenleri absoplamaya başlar. Hücre elemanları yüzeye yapışarak kimyasal prosesleri başlatır. Literatürde yer alan çalışmalar, polimerik biyomalzemelerde etkin biyobozunma prosesinin, "hidroliz" olduğuna işaret etmektedir. Hidroliz, hassas moleküler grupların, suyla reaksiyonu sonucu, yapıdan kopmalarıdır. Bu olay, asitler, tuzlar ya da enzimler tarafından katalizlenebilir. Bir polimerin hidroliz reaksiyonuna hassasiyeti, polimerin kimyasal yapısı, morfolojik boyutları ve vücut ortamına bağlıdır. Bölüm 4.1.'de açıklanan daha önceki gözlemlerimiz ve yukarıdaki bilgilerin ışığında dekstran hidrojenlerin biyobozunma davranışlarının BSA, IgG ve ayrıca kolon enzimlerinden dekstranaz varlığında izlenmesine karar verilmiştir.

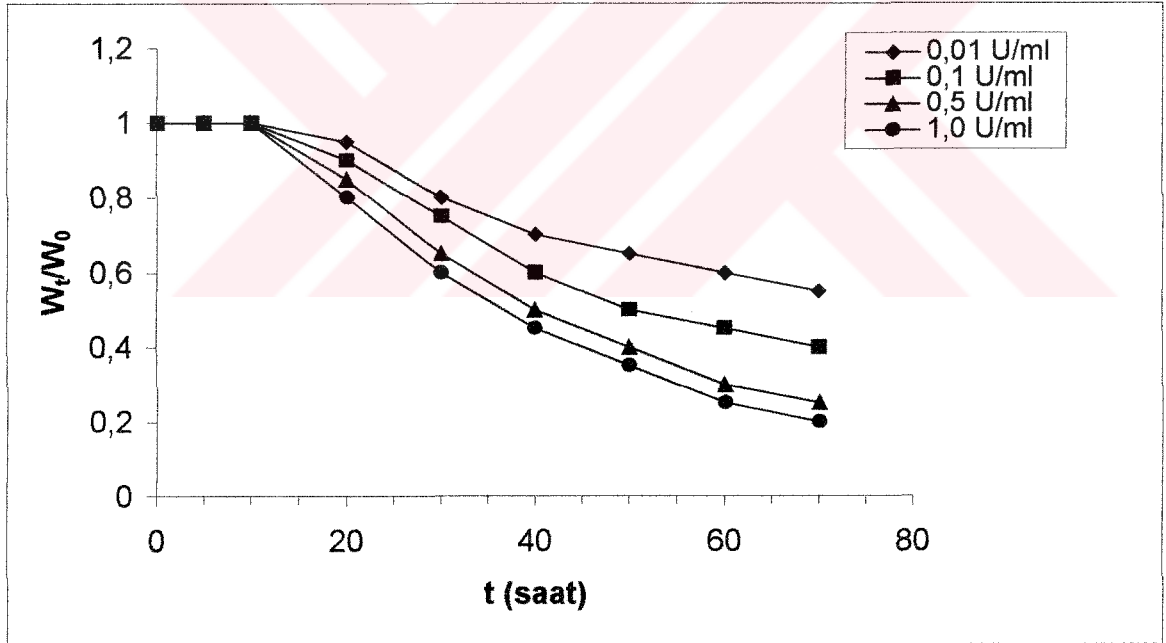
4.2.7.1. Dekstranaz varlığında biyobozunma

Dekstranazlar, 1,6- α -D-glukan, 6-glukanohidrolaz (EC 3.2.1.11) enzimleridir. Dekstranaz enzimleri, çeşitli küfler (Hultin ve Nordström, 1949; Tsuchiya ve ark., 1952) ve bazı bakteriler tarafından (Ingelman, 1948; Sery ve Hehre, 1956; Bailey ve Clarke, 1959), insan kolonik ortamında ise genus *Bacteroides*'ler tarafından üretilirler (Sery ve Hehre, 1952). *Bacteroides*ler, insan kolonik ortamında sayıca baskın (10^{11} /g barsak içeriği) anaerob bakterilerdir. Dekstranazların, endodekstranaz ve exodekstranaz olmak üzere iki türü vardır ve sırasıyla dekstran ana zincirinden ve uçlardan yapıyı enzimatik bozunmaya uğratırlar. Enzim aktivitesi pH'ya bağlıdır ve maksimum etki pH=5.5-7.0'de gerçekleşmektedir (Aberg, 1953).

Dekstran hidrojenlerin dekstranaz varlığında biyobozunma davranışlarının incelenmesi amacıyla, yaklaşık 0.025 g kuru ağırlığa sahip hidrojel diskleri, 37°C'de, 4 farklı derişimde (0.01, 0.1, 0.5 ve 1) U/ml dekstranaz enzimi içeren 10 ml rezervuar hacimli pH=7.4 PBS tampon ortamlara yerleştirilmiş ve deneyler Bölüm 3.4.'de açıklandığı şekilde gravimetrik olarak yürütülmüştür. Her enzim derişiminde hidrojel ağırlığında gözlenen değişiklikler zamana karşı grafiğe geçirilmiş ve biyobozunma eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.10).



(a)



(b)

Şekil 4.9. Hidrojellere ait gravimetrik bozunma eğrileri
a) Dekstran-ECH hidrojel
b) Dekstran-ECH-etanol hidrojel

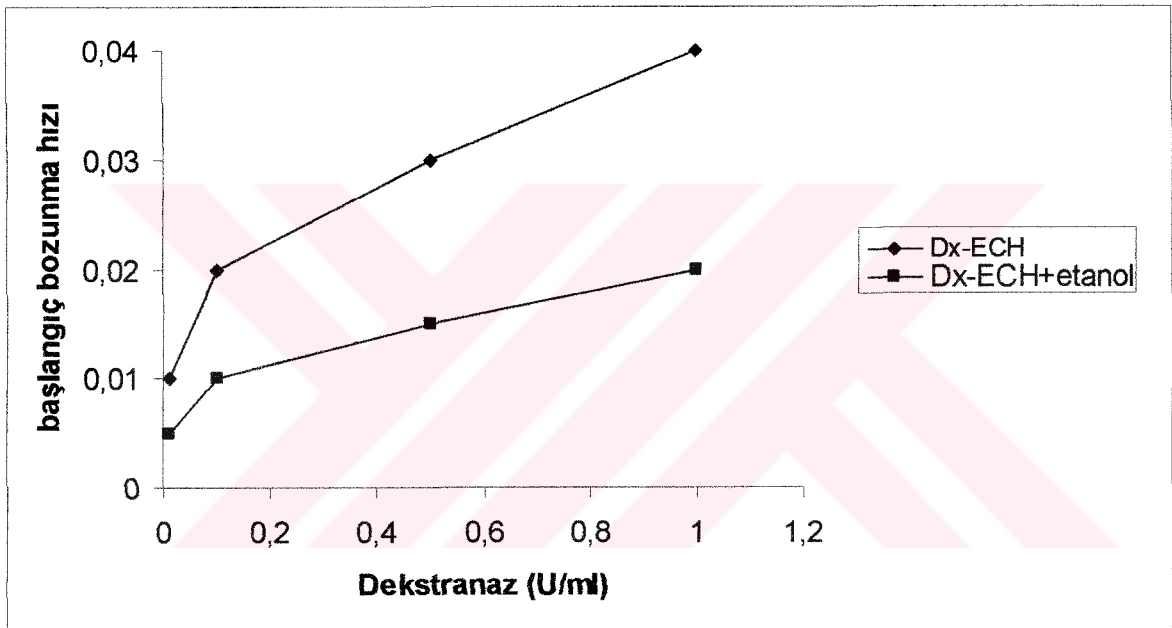
Şekil 4.9. a ve b'de dekstran-ECH ve etanol varlığında hazırlanan dekstran-ECH jellerin biyobozunma eğrileri verilmiştir. Eğrilerde W_t , bozunma süresince herhangi bir t anındaki kuru jel ağırlığını, W_0 ise jelin başlangıçtaki kuru ağırlığını

göstermektedir. Dekstan-MBAm hidrojenleri çok kararsız ve oldukça az mekanik dayanıma sahip olduklarından çalışmanın bu bölümünde kullanılmamışlardır.

Çalışmada kullanılan endo-dekstranaz'ın dekstran zincirlerini enzimatik hidrolize uğratması sonucu bozunma prosesinin gerçekleştiği bilinmektedir. Öncelikle polisakkarit yapısı oligosakkaritlere parçalanmakta ve daha sonra oligosakkaritlerin hidrojenlerden diffüzyonla kütle kaybı gözlenmektedir. Bu nedenle Şekil 4.9 a'da ilk 5 saatlik ve b'de ilk 10 saatlik eğrilerde kütle kaybının gözlenmediği bölge, oligosakkarit difüzyonu başlayana kadar olan aşamayı içermektedir. Bozunma sırasındaki gözlemler hidrojen matrisin "yığın bozunma"ya (bulk degradation) uğradığını göstermiştir. Hidrojenlerin biyobozunma davranışlarının incelendiği 70 saat içinde her bir enzim derişimi için, Dx-ECH hidrojeninin dekstran-ECH+etanol hidrojenine göre daha yüksek bir bozunma oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Tüm bozunma eğrilerinin benzer bir profile sahip olduğu ve ortam enzim konsantrasyonuna bağlı olarak kütle kaybının arttığı görülmektedir. Biyobozunma eğrilerinin doğrusal kısımlarının eğiminden hesaplanan "başlangıç bozunma hızı" değerleri, kullanılan enzim derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.10). Dekstran-ECH hidrojenli için enzim derişiminin 0.01 U/ml'den 0.1 U/ml'e kadar artışıyla başlangıç bozunmasının hızlı bir biçimde arttığı gözlenmiştir. 0.1 U/ml derişimin üzerinde ise daha düşük hızda ve doğrusal biçimde değiştiği görülmektedir. Bununla beraber, dekstran-ECH+etanol hidrojenli için tüm enzim derişimindeki biyobozunma hızının dekstran-ECH hidrojenine nazaran daha düşük hızda gerçekleştiği, yaklaşık doğrusal bir değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, dekstranaz'ın yapısında bulunan ve aktivitesini belirleyen, katalitik ve katalitik olmayan bölgelerin davranışı ile açıklanabilir. Enzimin katalitik olmayan bölgeleri, substrat ile enzimin katalitik bölgesi arasındaki etkileşimi sağlamak amacıyla, substrat üzerindeki elektrostatik yük yoğunluğunu dengeler ve katalitik bölgenin substratı bozunmaya uğratabilmesi için gerekli olan aktivasyon enerjisini azaltırlar. Böylelikle enzimin katalitik bölgesi, substrat üzerinde bozunmayı daha kolay başlatabilir. Dekstran-ECH hidrojenlerinin daha fazla bozunmaya uğraması, dekstran-ECH hidrojen yapı içerisinde enzim-substrat etkileşiminin daha kolay kurulmasından kaynaklanabilir.

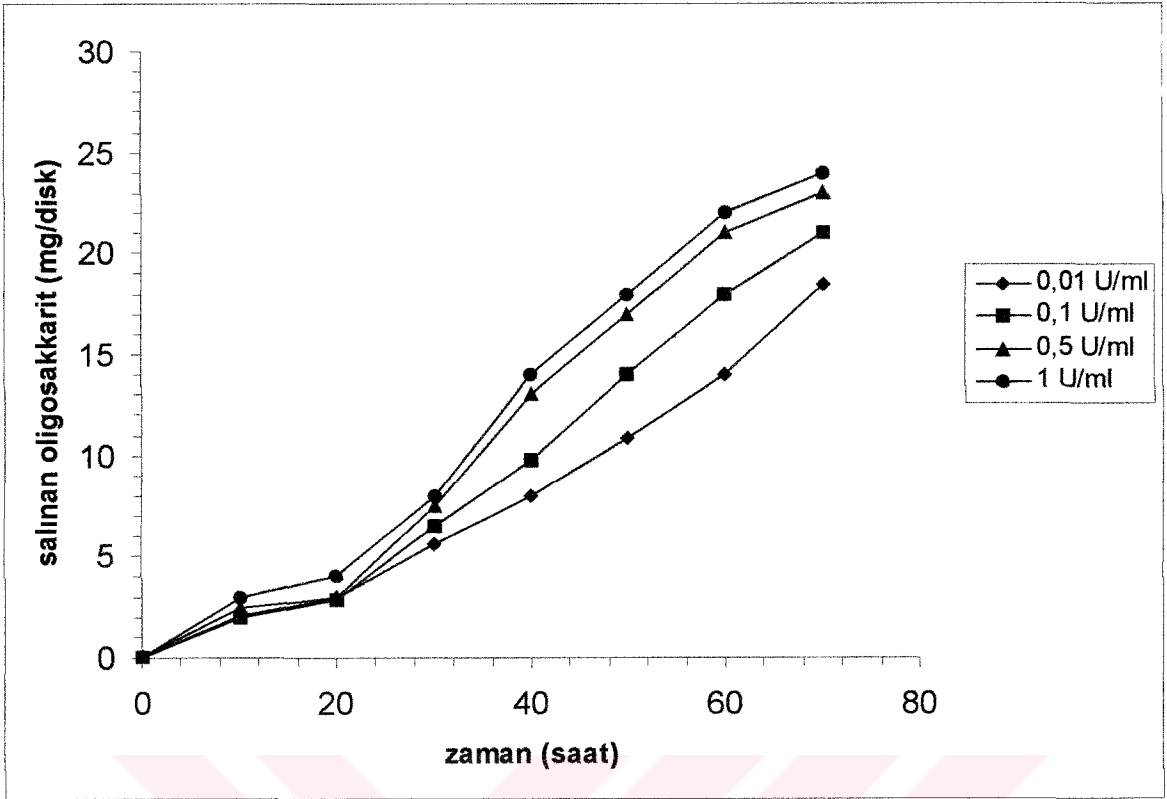
Dekstran-ECH hidrojel 70. nci saatin sonunda, 0.01 U/ml dekstranaz varlığında yaklaşık %74'lük bir kütle kaybına uğrarken dekstran-ECH+etanol hidrojel ise %80'lik bir kütle kaybına uğramışlardır. 1 U/ml enzim derişiminde dekstran-ECH hidrojel %96, dekstran-ECH+etanol hidrojel ise % 100 oranında bozunmuşlardır.

Bu kısımda sunulan sonuçlar pH=7.4'de yürütülen çalışmalara aittir. Dekstranaz enziminin pH=5.5'da aktivitesinin en yüksek olduğu bilinmektedir. İlgili literatürde de belirtildiği gibi dekstran hidrojellerin 37°C ve pH 7'deki bozunma hızı 37°C ve pH=5.5'daki bozunma hızının %20'si civarında olacaktır (Franssen ve ark., 1997).

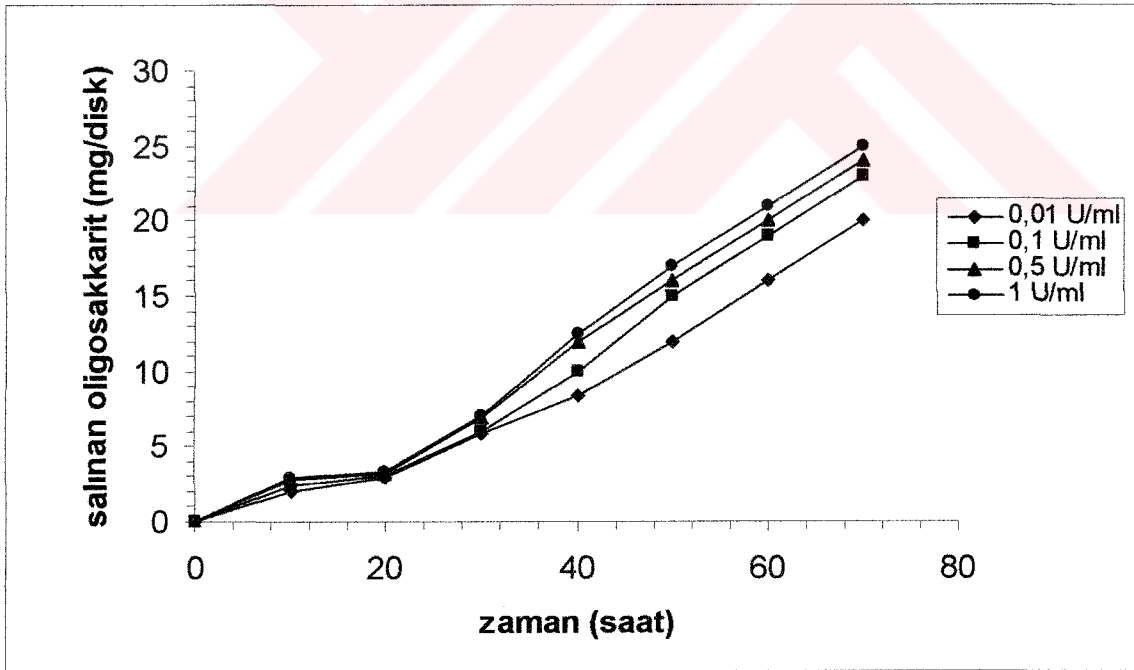


Şekil 4.10. Dekstranaz derişiminin dekstran hidrojellerin başlangıç bozunma hızına etkisi

Dekstran hidrojel disklerinde meydana gelen oligosakkarit salım miktarının belirlenmesi amacıyla yapılan deneysel çalışmalara sonuçları Şekil 4.11'de sunulmuştur. Dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojellerden salınan oligosakkarit miktarının enzim derişimin artmasına paralel olarak arttığı ve aynı zamanda 70 saatin sonunda salınan oligosakkarit miktarının her iki hidrojel türü içinde yaklaşık aynı olduğu görülmüştür.



(a)



(b)

Şekil 4.11. Hidrojellerin oligosakkarit salım eğrisi
a) Dekstran-ECH
b) Dekstran-ECH+etanol

4.2.7.2. IgG varlığında biyobozunma

Dekstran hidrojellerin IgG varlığında biyobozunma davranışını incelemek amacıyla, yaklaşık 0.025 g kuru ağırlığa sahip hidrojel diskleri, 37°C'de, 1 mg/ml derişimde IgG enzimi içeren 5 ml rezervuar hacimli pH=7.4 PBS tampon ortamlara yerleştirilmiş ve deneyler Bölüm 3.4.'de açıklandığı şekilde gravimetrik olarak yürütülmüştür. Oligosakkarit salımında gözlenen değişiklikler Çizelge 4.8'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 IgG varlığında biyobozunma ile ilgili sonuçlar

| Zaman (saat) | Dx-ECH | | Dx-ECh+etanol | |
|--------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|
| | Salınan oligosakkarit (mg/disk) | Kütle Kaybı (%) | Salınan oligosakkarit (mg/disk) | Kütle Kaybı (%) |
| 2,5 | 3 | | 2 | |
| 20 | 5 | | 5 | |
| 40 | 12 | | 11 | |
| 90 | 19 | 43 | 18 | 39 |

Çizelge 4.8'deki sonuçlar her iki hidrojelden de oligosakkarit salım miktarlarının ve kütle kayıplarının yaklaşık aynı olduğunu göstermektedir.

4.2.7.3. BSA varlığında biyobozunma

1 mg/ml derişiminde BSA içeren PBS tamponunda dekstran hidrojellerin bozunması oligosakkarit salımının takibi ile incelenmiş, ayrıca bu süre içinde hidrojelde meydana gelen kütle kaybı belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.9'da dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojel için karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.9'daki sonuçlar, dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojelleri için oligosakkarit salımının yaklaşık aynı olduğu göstermektedir. 90 saatin sonunda dekstran-ECH+etanol hidroجلي %40 Dekstran-ECH hidroجلي ise %42 oranında kütle kaybına uğramıştır.

Çizelge 4.9. BSA varlığında biyobozunma ile ilgili sonuçlar

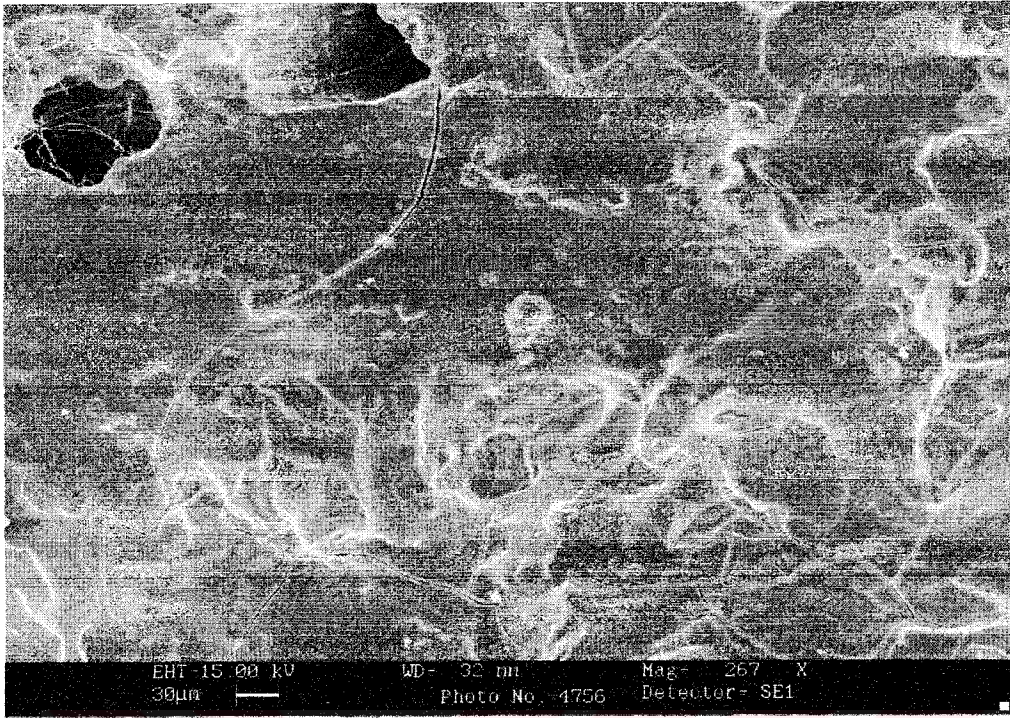
| Zaman (saat) | Dx-ECH | | Dx-ECH+etanol | |
|--------------|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|
| | Oligosakkarit miktarı (mg/disk) | Kütle kaybı (%) | Oligosakkarit miktarı (mg/disk) | Kütle kaybı (%) |
| 2 | - | | - | |
| 5 | - | | - | |
| 20 | 3,1 | | 6 | |
| 45 | 6 | | 10,5 | |
| 90 | 13 | 42 | 12 | 40 |

4.2.7.4. Biyobozunmanın FTIR spektrumlarıyla değerlendirilmesi

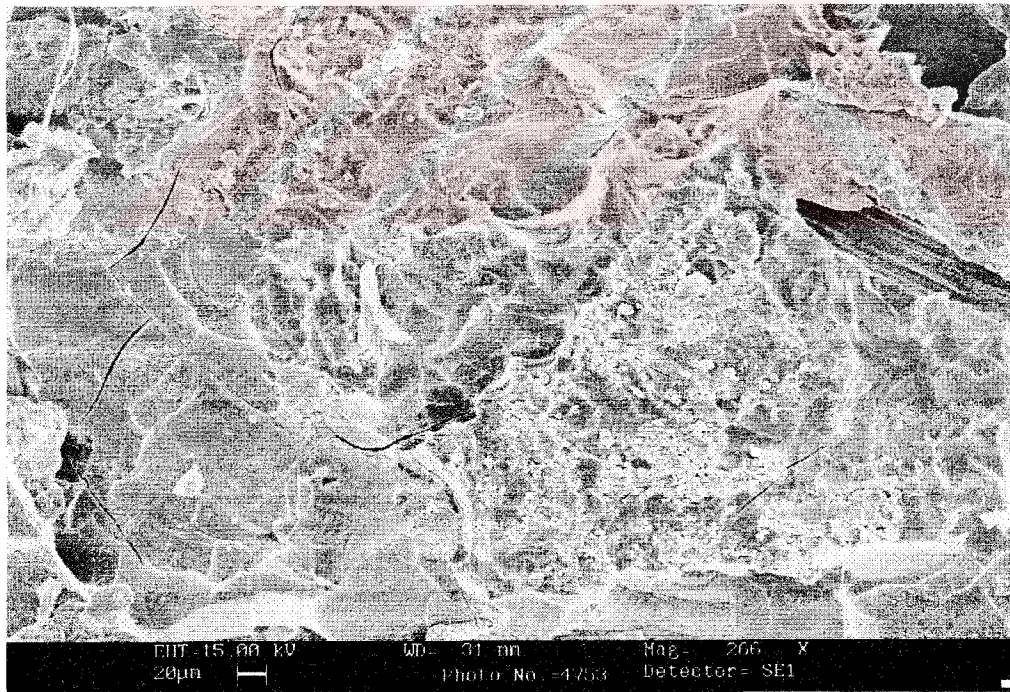
BSA, IgG ve dekstranaz varlığında yürütülen tüm biyobozunma deneyleri sonucunda hidrojel yapıların FTIR spektrumları alınmış ve yalnızca 1550 cm^{-1} dalga boyunda gözlenen karbonil pikinin şiddetinde, bozunma süresince bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Bu da biyobozunmanın polimer ana zinciri üzerinden gerçekleştiğini kanıtlamaktadır ve diğer deneysel verilerle de uyumludur.

4.2.7.5. Biyobozunmanın SEM analizi ile incelenmesi

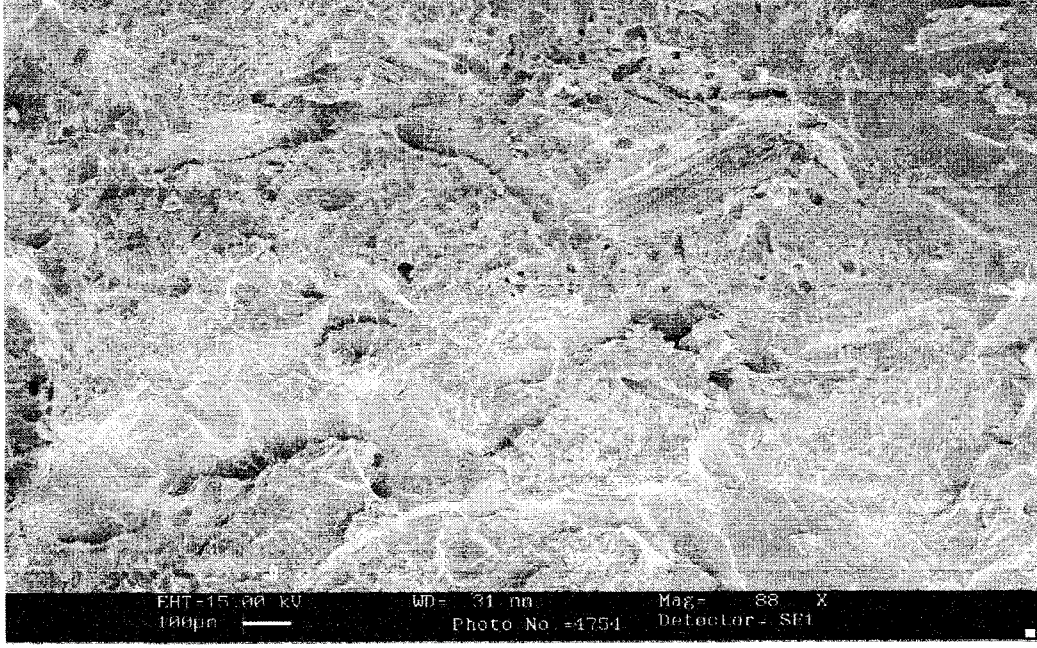
Biyobozunma grubunda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve sonuçları, özellikle dekstranaz varlığında biyobozunmanın etkili bir biçimde meydana geldiğini kanıtlamıştır. Bu nedenle SEM analizi yalnızca dekstranaz varlığında bozunan hidrojellere uygulanmıştır. Dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojeller için biyobozunmanın benzer davranış izlemesi nedeniyle incelemelerde dekstran-ECH hidrojeller kullanılmıştır. Biyobozuma süresince belirli zaman aralıklarında ortamdaki uzaklaştırılan jeller Bölüm 3.3.5'de açıklanan yöntem uygun olarak hazırlanmış ve SEM ile incelenmiştir. Şekil 4.12'de örnek olarak seçilmiş fotoğraflara yer verilmiştir.



(a)



(b)



(c)

- Şekil 4.12. Biyobozunma sırasında dekstran-ECH hidrojellere ait SEM fotoğrafları
- Biyobozunmanın 5. saatinde hidrojel yüzeyi
 - Biyobozunmanın 25. saatinde hidrojel yüzeyi
 - Biyobozunmanın 40. saatinde hidrojel yüzeyi

Şekil 4.12a biyobozunmanın 5 nci saatinde hidrojel yüzeyinde bir takım çatlakların oluştuğunu göstermektedir. Daha önce de açıklandığı gibi bu çatlaklar, biyobozunma reaksiyonlarını etkilemektedir. Şekil 4.12b biyobozunmanın 25 inci saatinde yüzeyden kopmaları ve kopan parçaların yüzeydeki birikimini göstermektedir. Biyobozunmanın devam eden sürelerinde kopan parçaların yapıdan uzaklaşmasıyla kütle kaybı önemli boyutlara ulaşmaya başlamıştır (Şekil 4.13c).

4.2.7.6. Biyobozunma sonuçlarının topluca değerlendirilmesi

Bu bölümde gerçekleştirilen çalışmalara ait sonuçlar değerlendirildiğinde, gravimetrik ve spektrofotometrik yöntemlere ait sonuçların birbirini desteklediği görülmektedir. En etkin biyobozunmanın dekstranaz varlığında gerçekleştiği ve ortam dekstranaz derişimiyle bozunma kinetiğinin doğrusal artış profili izlediği gözlenmiştir. BSA ve IgG varlığında biyobozunmanın daha yavaş olduğu ve %100 kütle kaybının gözlenmediği kaydedilmiştir. Dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojellerinin biyobozunma sonuçları, çapraz bağların biyobozunmayı

etkilemediğini ve bozunmanın dekstran ana zinciri üzerinden yürüdüğünü göstermiştir.



5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan çalışmada ağırlıkça %50 oranında farklı fonksiyonel grup içeren çapraz-bağlayıcı reaktiflerle dekstranın çapraz bağlanması sonucunda, dekstran hidrojellerin sentezlenmesi, şişme davranışlarının incelenmesi, IgG, BSA ve dekstranaz varlığında enzimatik bozunmasının saptanması ve çapraz bağlayıcı reaktif türünün biyobozunma üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında ulaşılan önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

◆ Dekstran hidrojeller, 70.000 dalton molekül ağırlığına sahip dekstran polimerinin, çapraz-bağlayıcı reaktif olarak kullanılan N,N'-metilen-bis-akrilamid (MBAm), epiklorohidrin (ECH) ve ECH varlığında etanolün ilave edilmesiyle , bazik ortamda çapraz-bağlanma reaksiyonu ile sentezlenmiştir.

◆ MBAm'in dekstranı çapraz bağlamada son derece yetersiz kaldığı ve oluşan jellerin kararsız ve düşük mekanik dayanıma sahip oldukları tespit edilmiştir.

◆ ECH'in dekstranı çapraz bağlamada oldukça etkili olduğu, yüksek oranda jel sentezlendiği ve elde edilen hidrojellerin oldukça kararlı ve şeffaf yapıda oldukları görülmüştür.

◆ ECH varlığında sentez ortamına etanolün eklenmesiyle %100'e yakın verimle jel sentezlendiği, oluşan jellerin şeffaf ve çok kararlı oldukları gözlenmiştir.

◆ Dinamik şişme deneylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde, tüm hidrojel türlerinde zamanla su içeriğinin artıyor olduğu görülmektedir. Hidrojellerin denge şişmelerine ulaştıklarında, dengeye ulaşma süresinin ve denge şişme değerlerinin $Dx-MBAm > Dx-ECH > Dx-ECH+etanol$ şeklinde olduğu görülmüştür.

◆ Su içeriği (S) değerlerinin zamanla değişimine bakıldığında, başlangıçta S ile t arasındaki artışın doğrusal olduğu görülmüş ve şişmede "Case II" mekanizmasının etkin olduğu sonucuna varılmıştır.

◆ Hidrojellerin şişme kinetiğine yönelik incelemede, yüksek-dereceden şişen jeller için difüzyon-kontrollü şişmeyi ikinci derece kinetik ile tanımlayan matematiksel model ile değerlendirilmiş ve her bir hidrojel için teorik denge şişme değerleri (S_{eq}) ve başlangıç şişme hızları ($(ds/dt)_0$) hesaplanmıştır. Dekstran-MBAm, dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojelleri'nin S_{eq} değerleri, sırayla 12.0337, 8.7951, 5.4378 g su/g jel'dir. S_{eq} ve $(dS/dt)_0$ için elde edilen sonuçlar, hidrojellerin deneysel şişme değerleri (EWC) ile teorik şişme değerleri arasında iyi bir uyum olduğu gözlenmiştir.

◆ Çapraz bağlı yapılar için tanımlanan çapraz bağlar arası molekül ağırlığı, M_c ve elek boyutu, ζ gibi yapısal parametreler saptanarak dekstran hidrojellerin örgü yapısı aydınlatılmıştır. Çapraz-bağlayıcı türüne bağlı olarak M_c değerlerinin ortalama 6499-7385 g/mol aralığında, denge şişme durumundaki elek boyutlarının ise ortalama 18.32-19.23 nm aralığında değiştiği saptanmıştır. Dekstran-MBAm ve dekstran-ECH hidrojelleri için M_c değerlerinin pek fazla değişmediği görülmektedir. Dx-ECH+etanol hidrojel için M_c değerinin daha düşük olduğu görülmüş ve bu durumun, etanolün ECH'ye çapraz bağlanma reaksiyonunda daha aktif ortam yarattığı ve çapraz bağlanmaya katılan reaktif grup miktarının artmasına paralel olarak, M_c değerinin azaldığı şeklinde yorumlanmıştır. Çapraz bağlayıcı reaktif türünün değişmesiyle, M_c ve ζ değerlerinin pek değişmediği, fakat yapıya etanol katılmasıyla azaldığı görülmüştür.

◆ Hidrojellerin yüzey ve kesit yapılarının SEM ile analizi sonucunda. Dx-ECH hidrojeller oldukça düzgün ve kararlı bir yüzey yapısına sahipken, Dx-MBAm hidrojellerin yüzeyinin daha pürüzlü olduğu görülmüştür.

◆ Hidrojel oluşumunu sağlayan çapraz-bağlanma reaksiyonlarının, MBAm'in amino grupları, ECH'in epoksi halkaları ve klor grupları ile dekstran'ın hidroksil grupları arasındaki yan zincir reaksiyonları üzerinden yürüdüğü, FTIR analizi sonucunda saptanmıştır.

◆ TGA analizleri sonucunda, tüm hidrojellerde sıcaklık artışıyla tek basamakta dekompozisyon gözlenmiştir. Dekstran-ECH jellerin, Dx-MBAm jellerine göre

termal açıdan daha kararlı olduğu görülmüştür. Hidrojeller ısı kararlılık açısından Dx-ECH>Dx-MBAm şeklinde sıralanmıştır.

◆ Dekstranaz enzimi varlığında yürütülen biyobozunma çalışmaları enzim miktarındaki artışın hidrojellerin bozunma profilini etkilediğini göstermiştir. 70'nci saat sonunda her bir enzim derişimi için, Dx-ECH hidrojelinin dekstran-ECH+etanol hidrojeline göre daha yüksek hızda bir bozunma hızına sahip olduğu gözlenmiştir. Tüm bozunma eğrilerinin benzer bir profile sahip olduğu ve ortam enzim konsantrasyonuna bağlı olarak kütle kaybının arttığı görülmektedir. 0.1 U/ml ve 1 U/ml enzim derişiminde Dx-ECH hidrojeli için ağırlık kaybı sırasıyla % 74 ve 96; Dx-ECH+etanol hidrojeli için de sırasıyla % 80 ve 100 olarak gözlenmiştir. Hidrojel matrisin yığın yapıdan bozunduğu (bulk degradation) görülmüştür.

◆ IgG ve BSA varlığındaki biyobozunma çalışmaları sonucunda, her iki enzimin de hidrojellerin biyobozunma davranışını pek değiştirmediği ve jellerde yaklaşık olarak eşit miktarda (%40) kütle kaybının olduğu gözlenmiştir.

◆ Biyobozunma çalışmalarında dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojellerinde, çapraz bağlanma derecesinin biyobozunma profilini pek etkilemediği, bunun da dekstranının yalnızca ana zincirleri üzerinden bozunmaya uğradığı sonucunu doğurduğu anlaşılmıştır.

◆ Biyobozunma eğrilerinin doğrusal kısımlarının eğiminden hesaplanan "başlangıç bozunma hızı" değerleri, kullanılan enzim derişimine karşı grafiğe geçirilmiştir. Dekstran-ECH hidrojeli için enzim derişiminin 0.01 U/ml'den 0.1 U/ml'e kadar artışıyla başlangıç bozunmasının hızlı bir biçimde arttığı gözlenmiştir. 0.1 U/ml derişimin üzerinde ise daha düşük hızda ve doğrusal biçimde değiştiği görülmektedir. Bununla beraber, dekstran-ECH+etanol hidrojeli için tüm enzim derişimlerindeki biyobozunma hızının dekstran-ECH hidrojeline nazaran daha düşük hızda gerçekleştiği, yaklaşık doğrusal bir değişim gösterdiği gözlemlenmiştir.

◆ BSA, IgG ve dekstranaz varlığında yürütülen tüm biyobozunma deneyleri sonucunda hidrojel yapıların FTIR spektrumları alınmış ve yalnızca 1550 cm^{-1}

dalga boyunda gözlenen karbonil pikinin şiddetinde, bozunma süresince bir azalmanın olduğu gözlenmiştir. Bu da biyobozunmanın polimer ana zinciri üzerinden gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

◆ Biyobozunma grubunda gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve sonuçları, özellikle dekstranaz varlığında biyobozunmanın etkili bir biçimde meydana geldiğini kanıtlamıştır. Bu nedenle SEM analizi yalnızca dekstranaz varlığında bozunan hidrojellere uygulanmış ve dekstran-ECH ve dekstran-ECH+etanol hidrojeller için biyobozunmanın benzer davranış izlemesi nedeniyle, incelemelerde dekstran-ECH hidrojeller kullanılmıştır. Hidrojellerin SEM fotoğrafları incelendiğinde zamanla yüzey üzerinde birtakım çalıkların oluştuğu ve 25 saatin sonunda yüzeyden kopmalar meydana geldiği belirlenmiştir.



REFERANSLAR

- Aberg, B., 1953, Breakdown of dextran by human feces, *Scand J Clin Lab Invest*; 5(1),37-8.
- Akiyoshi, K., Kobayashi, S., Shichibe, S., Mix, D., Baudys, M., Kim, S.W., Sunamoto, J., (1998), Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: Complexation and stabilization of insulin, *J. Controlled Release* 54, 313–320.
- Akman, A.Ö., 2000, Preparation and determination of swelling behavior of dextran hydrogels in water, *Master of Science in Chemistry, Institute of Sciences of Hacettepe University, Ankara.*
- Andrianov, A.K., Payne, L.G., Visscher, K.B., Allcock, H.R., Langer, R., 1994, Hydrolytic degradation of ionically crosslinked polyphosphazene microspheres, *J. Appl. Polym. Sci.* 53, 1573–1578.
- Beers, K.L., Matyjaszewski, K., Kern, A., Gaynor, S.G., (1998), Hydrogels by atom transfer radical polymerization. I. Poly (N-vinylpyrrolidinone-g-styrene) via the macromonomer method, *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* 36, 823–830.
- Bezemer, J.M., Grijpma, D.W., Dijkstra, P.J., Van Blitterswijk, Feijen, J., 2000, Control of protein delivery from amphiphilic poly(ether ester) multiblock copolymers by varying their water content using emulsification techniques, *J. Controlled Release* 66, 307–320.
- Bezemer, J.M., Radersma, R., Grijpma, D.W., Van Blitterswijk, C.A., Feijen, J., 2000, Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers. 1. Insufficiency of preparation techniques on particle characteristics and protein delivery, *J. Controlled Release* 67, 233–248.
- Bezemer, J.M., Radersma, R., Grijpma, D.W., Van Blitterswijk, C.A., Feijen, J., 2000, Microspheres for protein delivery prepared from amphiphilic multiblock copolymers. 2. Modulation of release rate, *J. Controlled Release* 67, 249–260.
- Bittner, B., Witt, C., Mader, K., Kissel, T., 1999, Degradation and protein release properties of microspheres prepared by biodegradable poly(lactide-co-glycolide) and ABA triblock copolymers: influence of buffer media on polymer erosion and bovine serum albumin release, *J. Controlled Release* 60, 297–309.
- Brondsted, H., Anderson, C., Hovgaard, L., 1998, Crosslinked dextran new capsule material for colon targeting of drugs, *J. Controlled Release* 53, 7–13.
- Brannon, L., Peppas, N.A., 1991, Equilibrium swelling behavior of pH-sensitive hydrogels, *Chem. Eng. Sci.*, 46: 715-722.

- Cadee, J.A., Van Steenberghe, M.J., Versluis, C., Heck, A.J.R., Underberg, W.J.M., Otter den, W., Jiskoot, W., Hennink, W.E., Oxidation of interleukin-2 by potassium peroxodisulfate, *Pharm. Res.*, in press.
- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M.D., Hoemann, C.D., Leroux, J.C., Atkinson, B.L., Binette, F., Selmani, A., 2000, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials* 21, 2155–2161.
- Cho, C.-S., Jeong, Y. I., Kim, S.-H., Nah, J.-W., Kubota, M., Komoto, T., 2000, Thermoplastic hydrogel based on hexablock copolymer composed of poly(g-benzyl L-glutamate) and poly(ethylene oxide), *Polymer* 41, 5185–5193.
- Crescenzi, V., de Nooy, A.E.J., Masci, G., 1999, Versatile synthesis of polysaccharide hydrogels using the Passerini and Ugi multicomponent condensations, *Macromolecules* 32, 1318–1320.
- Crescenzi, V., de Nooy, A.E.J., Capitani, D., Masci, G., 2000, Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multiterials component condensations: synthesis, behavior and solid-state NMR characterization, *Biomacromolecules* 1, 259–267.
- Dagani, R., 1997, Intelligent gels, *Chem. Eng. News*, June, 26-37
- Dai, W.S., Barbari, T.A., 1999, Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly(vinyl alcohol), *J. Membr. Sci.* 156, 67–79.
- De Jong, S.J., Van Eerdenbrugh, B., Van Nostrum, C.F., 2001, Physically crosslinked dextran hydrogels by stereocomplex formation of lactic acid oligomers: degradation and protein release behavior. *J. Controlled Release* 71, 261-275.
- Ding, Z.Y., Akinois, J.J., Salovey, R., 1995, *J Polym. Sci. Polym. Phys.* 56: 1561
- Draye, J.P., Delaey, B., Van de Voorde, A., Van den Bulcke, A., Bogdanov B., Schacht, E., 1998, In vitro release characteristics of bioactive molecules from dextran dialdehyde cross-linked congelatin hydrogel films, *Biomaterials* 19, 99–107.
- Edman, P., Eckman, B., Sjöholm, I., 1980, Immobilization of proteins in microspheres of biodegradable polyacryldextran, *J Pharm. Sci.*, 69, 838-842.
- Feijen, J., Bezemer, J.M., Radersma, R., Grijpma, D.W., Dijkstra, P.J., van Blitterswijk, C.A., 2000, Zero-order release of lysozyme from poly(ethylene glycol)/poly(butylene terephthalate) matrices, *J. Controlled Release* 64, 179–192.
- Feijen J., Kuijpers, A.J., Van Wachum, P.B., Van Luyn, M.J.A., Engbers, G.H.M., Krijsveld, J., Zaat, S.A.J., Dankert, J., 2000, In vivo and in vitro release of

lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves, *J. Con-
polyntapeptidetrolled Release* 67, 323–336.

Feijen, J., Bezemer, J.M., Grijpma, D.W., Dijkstra, P.J., van Blitterswijk, C.A., 1999, A controlled release system for proteins based on poly(ether ester) block-copolymers: polymer network characterization, *J. Controlled Release* 62, 393–405.

Flory P.J. and Rehner, R., 1943, Statistical mechanics of crosslinked polymer networks. II. Swelling, *J. Chem. Phys.*, 11, 521-526.

Forster, S., Antonietti, M., 1998, Amphiphilic block copolymers in structure-controlled nanomaterial hybrids, *Adv. Mater.* 10, 195–217.

Franssen, O., Van Rooijen, R.D., De Boer, D., Maes, R.A.A., Hennink, W.E., 1999, Enzymatic degradation of crosslinked dextrans, *Macromolecules* 32, 2896–2902.

Franssen, O., Van Ooijen, R.D., De Boer, D., Maes, R.A.A., Herron, J.N., and Hennink, W.E., 1997, Enzymatic degradation of methacrylate dextrans, *Macromolecules*, 30: 7408-7413.

Franssen, O., Van Ooijen, R.D., De Boer, D., Maes, R.A.A., Herron, J.N., and Hennink, W.E., 1997, Enzymatic degradation of methacrylate dextrans, *Macromolecules*, 30, 7408-7413.

Gacesa, P., 1988, Alginates, *Carbohydr. Polym.* 8, 161–182.

Gekko, K., 1981, in: *Solution properties of polysaccharides*, Brant, D.A., (Ed.), ACS Symp. Ser. 150, American Chemical Society, Washington, DC, 415-438.

Göpferich, A., 1996, Mecanizm of polymer degradation and erosion, *Biomaterials*, 39, 103-104

Göpferich, A., Langer, R., 1993, modeling polymer erosion, *Macromolecules*, 16, 4105-4112

Guzman, M., Garcia, F.F., Molpeceres, J., Aberturas, M.R., 1992, Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer gels as sustained release vehicles for subcutaneous drug administration, *Int. J. Pharm.*, 80, 119-127.

Güner, A., Akman, Ö., Rzaev, Z.M.O., 2001, Crosslinking of dextran with some selective Cl-, P- and N-containing functional substances in aqueous solutions, *Reactive & Functional Polymers*, 47, 55-65.

Harboe, E., Larsen, C., Johansen, Olesen, H.P., 1989, Macromolecular prodrugs, XV. Colon targeted delivery-bioavailability of naproxen from orally administered dextran-naproxen ester prodrugs varying in molecular size in the pig, *Pharm. Res.* 6, 919-923.

- Hennink, W.E., Stenekes, R.J.H., (2000), Polymerization kinetics of dextran-bound methacrylate in an aqueous two phase system, *Polymer* 41, 5563–5569.
- Hennink, W.E., Van Dijk-Wolthuis, W.N.E., Tsang, S.K.Y., Kettenes-Vanden Bosch, J.J., 1997, A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacryldextranated dextran with and without oligolactate spacer, *Polymer* 38, 6235–6242.
- Hennink, SW.E., Talsma, H., Borchert, J.C.H., Smedt de, S.C., Demeester, J., 1996, Controlled release of proteins from dextran hydrogels, *J. Controlled Release* 39, 47–55.
- Hovgaard, L., Brøndsted, H., 1995, Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery, *J. Controlled Release*, 36, 159-166.
- Ikada, Y., Jamshidi, K., Tsuji, H., Hyon, S.-H., 1987, Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides), *Macromolecules* 20, 904–906.
- İmren, D., 2003, Biyobozunur ve/veya pH-Duyarlı dekstran hidrojllerin sentezi, karakterizasyonu ve kolon-spesifik ilaç salımındaki kullanımları, Hacettepe Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi
- Jameela, S.R, Jayakrishnan, A., 1995, Glutaraldehyde crosslinked chitosan as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle, *Biomaterials* 16, 769–775.
- Janes, K.A., Fresneau, M.P., Marazuela, A., Fabra, A., Alonso, M.J., 2000, Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin, *J. Controlled Release* 73 (2001) 255–267. C.M. Hassan, N.A. Peppas, Structure and morphology of freeze /thawed PVA hydrogels, *Macromolecules* 33, 2472–2479.
- Kim, S.H., Won, C.Y., Chu, C.C., 1999a, Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking, *Carbohydr. Polym.* 40, 183–190.
- Kim, H., Won, C.-Y., Chu, C.C., 1999b, Synthesis and characterization of dextran-maleic acid based hydrogel, *J. Biomed. Mater. Res.* 46, 160–170.
- Kim, S.H., Chu, C.C., 2000, Synthesis and characterization of methacryldextran-methacrylate hydrogels and structural study by SEM, *J. Biomed. Mater. Res.* 49, 517–527.
- Kim, S.Y., Chu, S.M., Lee, Y.M., Kim, S.J., 2000, Thermo- and pH-responsive behaviors of graft copolymer and blend based on chitosan and N-isopropylacrylamide, *J. Appl. Polym. Sci.* 78, 1381–1391.
- Kissel, T., Witt, C., Mader, K., (2000), The degradation, swelling and erosion properties of biodegradable implants prepared by extrusion or compression moulding of poly(lactide-co-glyzation colide) and ABA triblock copolymers, *Biomaterials* 21, 931–938.

- Klotz, U., and Kroemer, H., 1987, Clinical pharmacokinetics considerations in the use plasma expanders, *Clin. Pharmacokinetics*, 12, 123.
- Klotz, U., 1985, Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid, *Clin. Pharmacokinetics*, 10, 285-302.
- Kopecek, 2001, Tang, A., C. Wang, R.J. Stewart, J. The coiled coils in the design of protein-based constructs: hybrid hydrogels and epitope displays, *J. Controlled Release* 72, 57–70.
- Kopecek, J., Wang, C., Stewart R.J., (1999), Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains, *Nature* 397 417–420.
- Kurian, P., Zschoche, S., Kennedy, J.P., 2000, Synthesis and complex characterization of novel amphiphilic block copolymers di-, tri-, multi-, and star blocks of PEG and PIB, *J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem.* 38 3200–3209.
- Larsen, C., Horboe, E., Johansen, M., Olesen, H.P., 1989, Macromolecular prodrugs, XVI. Colon-targeted delivery-comparison of the rate of release of naproxen from dextran ester prodrugs in homogenates of various segments of the pig GI tract, *Pharm. Res.*, 5, 995-999.
- Larsen, C., Johansen, M., 1985, Macromolecular prodrugs I. Kinetics and mechanism of hydrolysis of O-benzoyl dextran conjugates in aqueous buffer and in human plasma, *Int. J. Pharm.*, 27, 205.
- Lee, J., Macosko, C.W., Urry, D.W., 2001, Swelling behavior of γ -irradiation crosslinked elastomeric polypentapeptide based hydrogels, *Macromolecules* 34, 4114–4123.
- Lee, J., Macosko, C.W., Urry, D.W., 2001, Elastomeric polypentapeptides crosslinked into matrices and fibers, *Biomacromolecules* 2, 170–179.
- Lee, S.C., Kim, C., Kwon, I.C., Kim, Y.H., 1998, Thermosensitive hydrogels based on poly(2-ethyl-2-oxazoline)/poly(ϵ -cap-rolactone) multiblock copolymers, *Proc. Int. Symp., Controlled Release Bioact. Mater.*, 25, 717–718.
- Lim, D.W., Park, T.G., (2000), Stereocomplex formation between enantiomeric PLA-PEG-PLA triblock copolymers: characterization and use as protein delivery microparticulate carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 75, 1615–1623.
- Lin, H.H., Cheng, Y.L., 2001, In-situ thermoreversible gelation of block and star copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(N-isopropylacrylamide) of varying architectures, *Macromolecules* 34, 3710–3715.
- Lucht, L. M., 1983, Ph. D. Thesis School of Chemical Engineering, Purdue University

- Lucht, L. M. and Peppas, N. A., 1981, In *Chemistry and Physics of Coal Utilization*, B. S. Cooper and L. Petrakis (eds.). American Institute of Physics, New York, 28.
- Luo, Y., Kirker, R.K., Prestwich, G.D., 2000, Crosslinked hyaluronic acid hydrogels films: new biomaterials for drug delivery, *J. Controlled Release* 69, 169–184.
- Marsano, E., Bianchi, E., Gagliardi, S., Ghioni, F., 2000, Hydroxy-propyl-cellulose derivatives: phase behaviour of hydroxy-propylcellulose methacrylate, *Polymer* 41, 533–538.
- Ming, W., Zhao, Y., Cui, J., Fu, S., Jones, F.N., 1999, Formation of irreversible nearly transparent physical polymeric hydrogels during a modified microemulsion polymerization, *Macromolecules* 32, 528–530.
- Miyana, K., Hossain, K.S., Maeda, H., Nemoto, N., 2001, Sol–gel transition behavior of pure carrageenan in both salt-free polyand added salt states, *Biomacromolecules* 2, 442–449
- Miyata, T., Asami, N., Uragami, T., 1999a, Preparation of an antigen-sensitive hydrogel using antigen–antibody bindings, *Macromolecules* 32, 2082–2084.
- Miyata, T., Asami, N., Uragami, T., 1999b, A reversibly antigen-responsive hydrogel, *Nature* 399 766–769.
- Mooney, D.J., Lee, K.Y., Bouhadir, K.H., 2000, Degradation behavior of covalently crosslinked Poly(aldehyde guluronate) characterizahydrogels, *Macromolecules* 33, 97–101.
- Mooney, D.J., Eiselt, P., Lee, K.Y., 1999, Rigidity of two-component hydrogels prepared from alginate and poly(ethylene glycol)-diamines, *Macromolecules* 32 5561–5566.
- Na, K., Park, K.H., Kim, S.W., Bae, Y.H., 2000, Self-assemble hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2), *J. Controlled Release* 69, 225–236.
- Nagahara, S., Matsuda, T., 1998, Hydrogel formation via hybridization of oligonucleotides derivatized in water-soluble vinylpolymers, *Polym. Gels Networks* 4 (1996) 111–127, *Science* 281, 389–392.
- Oppermann, W., 1992 Swelling behavior and elastic properties of ionic hydrogels, in: R.S. Harland, R.K. Prud'homme (Eds.), *Polyelectrolyte Gels: Properties, Preparation, and Applications*, ACS Symposium Series, No. 480, American Chemical Society, Washington, DC, 159-170.
- Parker, G., Wilson, C.G., Hardy, J.G., 1988, The effect of capsule size and density on transit through the proximal colon. *J. Pharm Pharmacol*, 40, 376-7.

- Patil, N.S., Dordick, J.S., Rethwisch, D.G., 1996, Macroporous poly(sucrose acrylate) hydrogels for controlled release of macromolecules, *Biomaterials* 17, 2343–2350.
- Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Davidenko, N., Sastre, R., Gallardo, A., San Roman, J., 1999, Self-curing membranes of chitosan/PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation, *Biomaterials*, 20: 1869-1878.
- Peniche, C., Cohen, Ma. E., Vazquez, B., San Roman, J., 1996, Water sorption of flexible networks based on 2-hydroxyethyl methacrylate-triethylenglycol dimethacrylate copolymers, *Polymer*, 38, 5977-5982.
- Peppas, N.A., Hassan C.M., (2000), Structure and morphology of freeze /thawed PVA hydrogels, *Macromolecules* 33, 2472–2479.
- Peppas, N.A., Mongia, N.K., 1997, Ultrapure poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 43, 51-58.
- Peppas, N.A., Langer, R., 1994, New challenges in biomaterials, *Science*, 263, 1715-1720.
- Peppas, N.A., 1991, Physiologically responsive hydrogels, *J. Bioact. Compatible Polym.*, 6: 241-246.
- Peppas, N.A., Mikos, A.G., 1986, Preparation methods and structure of hydrogels, in: N.A. Peppas (Ed.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL, Chapter 1.
- Peppas, N.A., Moynihan, H.J., Lucht, L.M., 1985, The structure of highly crosslinked poly (2-hydroxyethylmethacrylate) hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res.* 19, 397-411.
- Peppas, N.A., Benner, R.E., 1980, Proposed method of intracordal injection and gelation of poly(vinyl alcohol) solution in vocalcords: polymer considerations, *Biomaterials* 1, 158–162.
- Peppas, N. A. and Merril, E. W., 1976-a, Determination of interaction parameter for PVA and water in gels crosslinked from solutions, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 14: 459-464
- Peppas, N. A. and Merril, E. W., 1976-b, PVA hydrogels: reinforcement of radiation-crosslinked networks by crystallization, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 14: 441-457.
- Qu, X., Wirsén, A., Albertsson, A.C., 2000, Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water, *Polymer* 41, 4589–4598.
- Qu, X., Wirsén, A., Albertsson, A.C., 1999, Structural change and Inswelling mechanism of pH-sensitive hydrogels based on chitosan and D,L-lactic acid, *J. Appl. Polym. Sci.* 74, 3186–3192.

- Rosiak, J.M., Ulanski, P., Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution, (1999), *Radiation Physics and Chemistry* 55, 139-151
- Rothstein, R.D., 2000, Irritable bowel syndrome, *Med. Clin. North Am.*, 84: 115-123.
- Rowley, J., Madlambayan, H., Mooney, D.J., 1999, Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, *Biomaterials*, 20, 45-53.
- Schacht, E.R., Vercauteren, R., Vansteenkiste, S., 1988, Some aspects of the application of dextran in prodrug design, *J. Bioact. Comp. Polym.*, 3: 72-80.
- Schott, H., 1992, Swelling kinetics of polymers, *J Macromol Sci-Phys.*, 31 B: 1-9
- Selby, W., 2000, Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease, *Vet. Microbiol.*, 77, 505-511.
- Sery, T.W., Hehre, E.J., 1956, Degradation of dextrans by enzymes of intestinal bacteria, *J. Bacteriol*, 71: 373.
- Sperinde, J.J., Griffith, L.G., 1997, Synthesis and characterization of enzymatically-crosslinked-poly(ethylene glycol) hydrogels, *Macromolecules* 30, 5255-5264.
- Stenekes, R.J.H., Loebis, A.E., Fernandes, C.M., Crommelin, D.J.A, and Hennink, W.E., 2001, Degradable dextran microspheres for controlled release of liposomes, *Int. J Pharma.* 214: 17-20.
- Sunamoto, J., Akiyoshi, K., Deguchi, S., Tajima, H., Nishikawa, T., 1997, Microscopic structure and thermoresponsiveness of a hydrogel nanoparticle by self-assembly of a hydrophobized characterization polysaccharide, *Macromolecules* 30, 857-861.
- Tabata, Y., Ikada, Y., 1989, Synthesis of gelatin microspheres containing interferon, *Pharm. Res.* 6, 422-427.
- Tanaka, T. Collapse of gels and the critical endpoint, *Phys. Rev. Lett.* 40 (1978) 820-823.
- Van Dijk-Wolthuis, W.N.E., Franssen, O., Talsma, H., Van Steenberghe, M.J., Bosch den Kettenes-van, J.J., Hennink, W.E., 1995, Synthesis, characterization and polymerization of glycidyl methacrylate derivatized dextran, *Macromolecules* 28, 6317-6322.
- Vercauteren, D. P., Vanderveken, D. J., Baudoux, G., Evrard, G., and Durant, F., 1990, Interactive crystal packing using the PHIGS standard, *Journal of Molecular Graphics*, Volume 8, Issue 4, December, Page 242
- Völker, R., 1962, Die depot-wirkung von Dextranen bei oraler Anwendung, *Arzn. Forschung*, 13, 76

- Walker, G.J., 1978, Dextran, in international review of Biochemistry. Biochemistry of Carbohydrates II, Vol. 16, Manners, D.J., Ed., University Park Press, Baltimore
- Wang, C., Stewart, R.J., Kopecek, J., 1999, Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains, *Nature* 397, 417–420.
- Watanabe, T., Ohtsuka, A., Murase, N., Barth, P., Gersonde, K., 1996, NMR studies on water and polymer diffusion in dextran gels. Influence of potassium ions on microstructure formation and gelation mechanism, *Magn. Reson. Med.* 35, 697–705.
- Westhaus, E., Messersmith, P.B., 2001, Triggered release of calcium from lipid vesicles: a bioinspired strategy for rapid gelation of polysaccharide and protein hydrogels, *Biomaterials* 2, 453–462.
- Wichterle, O., Lim, D., 1960, Hydrophilic gels for biological use, *Nature* 185, 117–118.
- Willmott, N., Kamel, H.M.H. I, Cummings, J., Stuart, J.F.B., Florence, A.T., 1984, Adriamycin-loaded albumin microspheres: lung entrapment and fate in the rat, in: S.S. Davies, L. Illum, J.G. Vie, E. Tomlinson (Eds.), *Microspheres and Drug Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects*, Elsevier, Amsterdam, 189–205.
- Windle, A.H., 1985, Case II sorption, in: Cowyn, J., editor, *Polymer permability*, London, Elsevier, 75-118
- Won, Y.Y., Jeong, B., Kibbey, M.R., Birnbaum, J.C., Gutowska, A., 2000, Thermogelling biodegradable polymers with hydrophilic backbones: PEG-g-PLGA, *Macromolecules* 33, 8317–8322.
- Yamamoto, M, Tabata, Y, Hong, L, Miyamoto, , Hashimoto, N, Ikada, Y., (2000) Bone regeneration by transforming growth factor b1 released from a biodegradable hydrogel, *J. Controlled Release* 64 133–142.
- Yang, Z Park, Y.J., Liang, J., Yang, V.C., 2001, Controlled release of clot-dissolving tissue-type plasminogen activator from a poly(L-glutamic acid) semi-interpenetrating polymer network hydrogel, *J. Controlled Release* 75, 37–44
- Yoshida, M., Caliceti, P., Salmaso, S., Lante, A., Katakai, R, Martellini, F, Mei, L.H.I., Carenza, M., 2001, Controlled release of biomolecules from temperature-sensitive hydrogels prepared by radiation polymerization, *J. Controlled Release* 75, 173–181.
- Yu, E., Kramarenko, A., Khoklov, A.R., 1997, Collapse of polyelectrolyte macromolecules revisited, *Macromolecules*, 30: 3383-3388.
- Yui, N., Ichi, T., Watanabe, J., Ooya, T., 2001, Controllable erosion time and profile in poly(ethylene glycol) hydrogels by supramolecular structure of hydrolyzable polyrotaxane, *Biomacromolecules* 2, 204–210.

Zhang, Y., Won, C.Y., Chu, C.C., 2000, Synthesis and characterization hydrogels,of biodegradable hydrophobic-hydrophylic hydrogel networks with a controlled swelling property, J. Polym. Sci., Part A Polym. Chem. 38, 2392–2404.



5. EKLER

EK 1.

Şişme Parametrelerinin Hesaplanması

Hidrojellerin pH-duyarlılığının ve şişme kinetiğinin belirlenmesi amacıyla yapılan şişme deneylerinde, 0.04055 ± 0.0001 g kuru ağırlığında disk formunda hidrojel örnekler kullanılmış ve tampon çözelti kayıplarını önlemek amacıyla beherlerin ağzı kapalı tutulmuştur. Örnek hesaplama olarak, ağırlıkça %50 ECH içeren Dx-ECH+etanol hidrojellerinin, pH=7,4'de şişme parametrelerinin hesabı aşağıda sunulmuştur.

Rezervuar hacmi = 25 ml

t = 30 dakika

Hidrojin başlangıçtaki kuru ağırlığı (m_0) = 0.04055g

Tampon içerisinde şişmiş hidrojin t anındaki (30 dakika) ağırlığı (m_t) = 0.1343 g

Şişmiş hidrojin denge durumunda ağırlığı (m_e) = 0,256 g

Hidrojin, 30 dakika sonunda kuru hidrojel temelinde şişme oranı (S);

$$S = (0.1343 - 0.04055)/0.04055 = 2,31$$

$$t/S = 30/2,31 = 12,98$$

Çizelge EK 1.1'de sunulan t/S değerleri t'ye karşı grafiğe geçirilmiş (Şekil EK 1.1) ve doğrusallaştırma sonucunda aşağıdaki denklem elde edilmiştir.

$$y = 0.178x + 5,6334, R^2 = 0.9949$$

Bu denklem Eşitlik 4.1'a göre düzenlenerek, S_{eq} ve başlangıç şişme hızı $((dS/dt)_0)$ değerleri hesaplanmıştır.

$$S_{eq} = 1/0.178 = 5,618 \text{ su/g jel}$$

$$(dS/dt)_0 = 1/(5,6334) = 0.1775 \text{ g su/g jel)/dak.}$$

Hidrojin denge şişme değeri (EWC) Eşitlik 3.1'a göre;

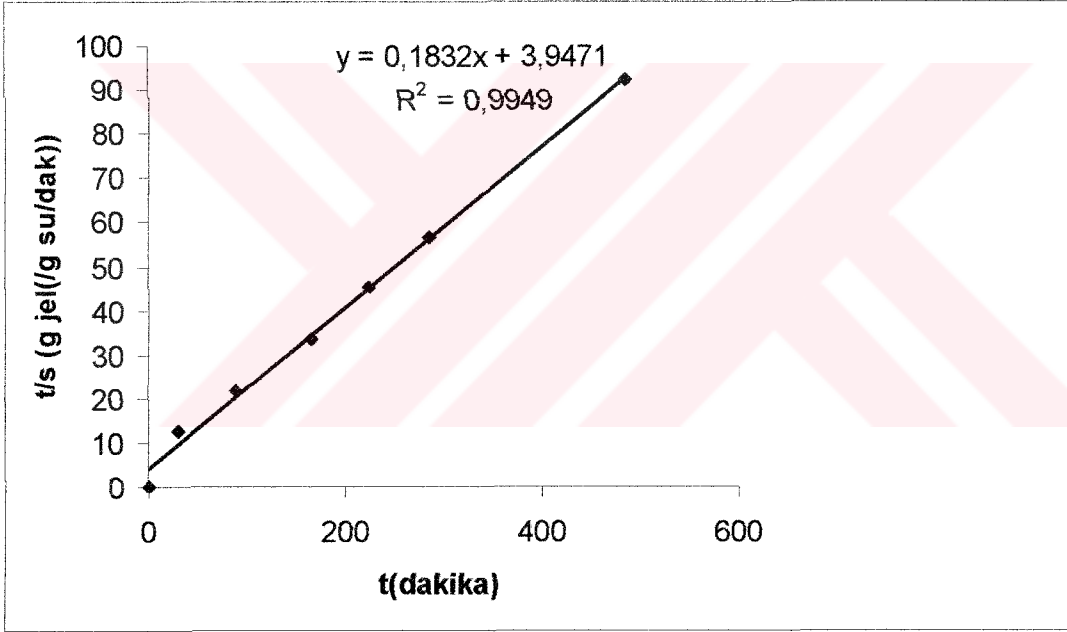
$$EWC = (0,253 - 0.04055)/0.04055 \times 100 = 525.$$

EK 1.1

Şişme Kinetik Çalışmaları ile İlgili Veriler

Çizelge EK 1.1. Dx-ECH+etanol hidrojellerinin, 37°C'daki şişme kinetik çalışmaları ile ilgili veriler

| Zaman (dakika) | m_t | S | t/S |
|----------------|--------|------|--------|
| 30 | 0,1343 | 2,34 | 12,976 |
| 90 | 0,2104 | 4,16 | 21,64 |
| 165 | 0,243 | 4,9 | 33,67 |
| 225 | 0,2446 | 4,95 | 45,45 |
| 285 | 0,2487 | 5,05 | 56,44 |
| 485 | 0,256 | 5,25 | 92,38 |



Şekil EK 1.1. Dx-ECHetanol hidrojellerinin 37°C'daki t/s-t eğrisi

EK 2.

Çapraz Bağlar Arası Molekül Ağırlığının (M_C) Hesaplanması

Dekstran hidrojellerin M_C değerlerinin hesaplanmasına yönelik olarak ilgili literatürden alınan sabitler (De Jong ve ark., 2001), piknometrik yöntemle her bir hidrojel için hesaplanan yoğunluk değerleri ve Eşitlik 1.3 yardımıyla M_C değerleri hesaplanmıştır. Örnek hesaplama olarak, ağırlıkça %50 MBAm içeren Dx-MBAm hidrojelinin M_C değerinin hesabı aşağıda sunulmuştur.

Flory ve Rehner tarafından geliştirilen denge şişme teorisine göre şişme çalışmalarından M_C değerleri tayin edilebilir (Flory ve Rehner 1943).

$$M_C = -\{V_1 d_P (\phi_P^{1/3} - \phi_P/2)\} / \{[\ln(1 - \phi_P) + \phi_P + \chi\phi_P^2]\} \quad (\text{EK 2.1})$$

Burada;

V_1 : çözücünün (su) molar hacmi

d_P : polimerin yoğunluğu

ϕ_P : polimerin şişmiş jeldeki hacim kesri

χ : polimer ile çözücü molekülleri arasındaki Flory termodinamik etkileşim parametresidir.

Flory-Rehner teorisine göre hesaplanan M_C değeri, Eşitlik 1.2'de yerine konularak çapraz bağ yoğunluğu hesaplanabilmektedir (Ding ve ark., 1995).

$$\rho = M_0/M_C \quad (\text{EK 2.2})$$

Burada;

M_0 : Polimerin tekrar eden birimlerinin molekül ağırlığı

M_C : Flory Rehner teorisine göre hesaplanan, çapraz bağlar arası ortalama molekül ağırlığıdır.

Peppas ve Merrill tarafından, Flory-Rehner denge şişme teorisinin modifikasyonu ile türetilen Eşitlik 2.3 ile yüksek şişme derecesine sahip polimerik ağ yapılar için M_C değeri tayin edilebilmektedir (Peppas ve Merrill, 1976-a). Çapraz bağlar arası tekrarlanan birim sayısı yeterli büyüklükte olduğu için zincirler Gaussian dağılımla temsil edilebilirler.

EK 2. (devam ediyor)

$$1/M_C = 2/M_n - \frac{(v/V_1) [\ln(1-v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi_1 v_{2,s}^2]}{v_{2,s} [(v_{2,s}/v_{2,r})^{1/3} - 1/2(v_{2,s}/v_{2,r})]} \quad (\text{EK 2.3})$$

Bu eşitlikte;

M_n : çapraz bağlı olmayan polimerin sayıca ortalama molekül ağırlığı

v : polimerin özgül hacmidir.

Flory-Rehner eşitliği, Lucht ve Peppas tarafından izotropik ve yüksek dereceden çapraz bağlı polimerik ağ yapılar için modifiye edilerek (1.4) numaralı eşitlik elde edilmiştir (Lucht, 1981).

$$1/M_C = 1/M_n - \frac{(v/V_1) [\ln(1-v_{2,s}) + \chi v_{2,s}^2] [1 - (1/N)v_{2,s}^{2/3}]^3}{[v_{2,s}^{1/3} - (1/2)v_{2,s}] [1 + (1/N)v_{2,s}^{1/3}]^2} \quad (\text{EK 2.4})$$

Benzer yaklaşımlar kullanılarak, Eşitlik 1.4 modifiye edilmiş ve yüksek dereceden çapraz bağlı, ortalama şişme özelliği gösteren polimerik yapılar için 1.5 numaralı eşitlik türetilmiştir (Peppas, 1976-b; Lucht, 1983).

$$1/M_C = 2/M_n - \frac{(v/V_1) [\ln(1-v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi v_{2,s}^2] [1 - (1/N)v_{s,r}^{2/3}]^3}{v_{2,r} [v_{s,r}^{1/3} - (1/2)v_{s,r}] [1 + (1/N)v_{s,r}^{1/3}]^2} \quad (\text{EK 2.5})$$

Bu eşitliklerde N , zincirdeki bağlantı sayısını gösterir ve Eşitlik EK 2.6 ile tanımlanır.

$$N = 2 M_C / M_r \quad (\text{EK 2.6})$$

Dekstran'ın sayıca ortalama molekül ağırlığı, $M_n = 46800$ Da

Dekstran'ın spesifik hacmi, $v = 0.62$ cm³/g

Suyun molar hacmi, $V_1 = 18$ cm³/mol

Dekstran/su sistemi için, Flory polimer-çözücü etkileşim parametresi, $\chi_1 = 0.473$

Dx-MBA hidrojelinin piknometrik yöntem ile belirlenen yoğunluk değerleri;

Çapraz bağlanma sonrası (relaxed) polimerin yoğunluğu, $\rho_{p,r} = 1.2099$ g/cm³

Şişme sonrası polimerin yoğunluğu, $\rho_{p,s} = 1.0454$ g/cm³

Kuru polimerin yoğunluğu, $\rho_{p,d} = 1.7816$ g/cm³

EK 2. (devam ediyor)

Kuru polimerin kütlesi, $w_{p,d} = 0.0253$ g

Şişen polimerin kütlesi, $w_{p,s} = 0.4653$ g

Relaxed durumda polimerin kütlesi, $w_{p,r} = 0.0754$ g

Polimerlerin; çapraz bağlanma sonrası, şişmiş durumda ve kuru haldeki hacim değerleri sırasıyla Eşitlik 3.2, 3.3 ve 3.4'den hesaplanarak, Eşitlik EK 2.5 ve EK 2.6'dan aşağıdaki parametrelere geçilmiştir.

Kuru polimerin hacmi, $V_p = 0.0253/1.7816 = 0.0142$ cm³

Relaxed durumdahacim kesri, $v_{2,r} = 0.0142/(0.0754/1.2099) = 0.2278$

Şişme sonrası hacim kesri, $v_{2,s} = 0.0142/(0.4653/1.0454) = 0.0319$

Bu değerler Eşitlik 1.3'e göre düzenlenirse; $M_c = 7385$ g/mol

Şişme sonrası hacim kesri ve M_c değerleri Eşitlik 4.16'da yerine konularak, elek boyutu (ζ);

$\zeta = 19.23$ nm

EK 3.

Kümülatif Salım Değerlerinin Hesaplanması

Oligosakkarit salım kinetiğinin belirlenmesi amacıyla yapılan in-vitro salım deneylerinde, salım ortamı belirli aralıklarla taze tampon ile değiştirilerek örneğiyle salım ortamı arasındaki sürücü güç (derişim) farkının sabit tutulması hedeflenmiştir. Örnek hesaplama olarak, pH=7.4 PBS ortamındaki 0,0282 g Dx-ECH hidrojeline ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur

Rezervuar hacmi = 5 ml

Yenilenen hacim = 1 ml

t = 2,5. saat

C =0,000426 g/ml

Salınan oligosakkarit miktarı $0,000426 \times 5 = 0,00213$ g

Atılan oligosakkarit miktarı = 0,000862 g/ml

Toplam salınan oligosakkarit miktarı = $0,00213 + 0,000862 = 0,002992$ mg/ml

t = 20,22. saat

C =0,000653

Salınan oligosakkarit miktarı = $0,000653 \times 5 = 0,003265$ mg/ml

Atılan oligosakkarit miktarı = 0,000426 mg/ml

Toplam oligosakkarit miktarı = $0,000426 + 0,003265 = 0,004553$

EK 3.1

Çizelge EK 3.1.1 Dx-ECH Hidrojeli'nin BSA (1mg/ml) Ortamındaki Salım Verileri

| T(saat) | Absorbans | Konsantrasyon(g/ml) | Salinan glukoz(g) | Atılan glukoz(g) | Toplam salinan glukoz(g) |
|---------|----------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------------|
| 2,2 | 0,065 | 0,000381 | 0,00381 | | |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 21,4 | 0,053 | 0,000272 | 0,00272 | 0,000381 | 0,003101 |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 45,13 | 0,076 | 0,000481 | 0,00481 | 0,000508 | 0,005971 |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 54,14 | 0,105 | 0,000744 | 0,00744 | 0,000481 | 0,009042 |

Çizelge EK 3.1.2. Dx-ECH-etanol hidrojelinin BSA (1mg/ml) ortamındaki salım verileri

| T(saat) | Absorbans | Konsantrasyon(g/ml) | Salinan glukoz(g) | Atılan glukoz(g) | Toplam salinan glukoz(g) |
|---------|----------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------------|
| 5,2 | 0,056 | 0,000299 | 0,00299 | | |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 28,3 | 0,105 | 0,000744 | 0,00744 | 0,000299 | 0,007739 |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 45,13 | 0,127 | 0,000944 | 0,00944 | 0,000744 | 0,010483 |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 49 | 0,117 | 0,000853 | 0,00853 | 0,000944 | 0,010517 |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 54 | 0,127 | 0,000944 | 0,00944 | 0,000853 | 0,01228 |

Çizelge EK 3.1.3. Dx-ECH+etanol hidrojelini'nin IgG (0,5 mg/ml) ortamındaki salım verileri

| T(saat) | Absorbans | Konsantrasyon (g/ml) | Salinan glukoz (g) | Atılan glukoz (g) | Toplam salinan glukoz (g) |
|---------|----------------|----------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|
| 0,25 | 0,026 | 0,0000263 | 0,000315 | | |
| | 1 ml yenilendi | | | | |
| 174,49 | 0,498 | 0,004315 | 0,021575 | 0,0000263 | 0,0216013 |

EK 3.1 (devam ediyor)**Çizelge EK 3.1.4. Dx-ECH hidrojelini'nin IgG (0,5 mg/ml) ortamındaki salım verileri**

| T(saat) | Absorbans | Konsantrasyon(g/ml) | Salinan glukoz(g) | Atılan glukoz(g) | Toplam salinan glukoz(g) |
|----------------|-----------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------------|
| 0,25 | 0,118 | 0,000862 | 0,00431 | | |
| 1 ml yenilendi | | | | | |
| 2,5 | 0,070 | 0,000426 | 0,00213 | 0,000862 | 0,002992 |
| 1 ml yenilendi | | | | | |
| 20,22 | 0,095 | 0,000653 | 0,003265 | 0,000426 | 0,004553 |
| 1 ml yenilendi | | | | | |
| 42,22 | 0,224 | 0,002007 | 0,010035 | 0,000653 | 0,0011976 |
| 1 ml yenilendi | | | | | |
| 93,17 | 0,360 | 0,003061 | 0,015305 | 0,002007 | 0,019253 |
| 1 ml yenilendi | | | | | |
| 174,49 | 0,355 | 0,003016 | 0,01508 | 0,003061 | 0,022089 |

EK 4.

Hidrojellerin Biyobozunma Sonucu Ağırlık Kaybı ile İlgili Örnek Hesaplama

Dx-ECH ve Dx-ECH+etanol hidrojellerin dekstranaz varlığında biyobozunmasının incelenmesi; enzim ortamına yerleştirilen hidrojellerin, belirli aralıklarla ortamdaki uzaklaştırılarak, kuru ağırlıklarının hesaplanması şeklinde yürütülmüştür. Örnek hesaplama olarak 0.025 ± 0.0001 g kuru ağırlığa sahip Dx-ECH hidrojelinin, 0.1 U/ml enzim varlığında ağırlık kaybı hesabı aşağıda sunulmuştur.

Rezervuar hacmi = 10 ml

Enzim miktarı = 0.1 U/ml

Hidrojel diskin başlangıçtaki kuru ağırlığı (W_0) = 0.0250 g

t = 16. saat sonunda ortamdaki uzaklaştırılan hidrojel kuru ağırlığı, W_t ;

$W_t = 0.02375$ g

t=10. saat sonunda ağırlık kaybı;

$W_t/W_0 = 0.95$

elde edilir.

W_t/W_0 oranları zamana (t) karşı grafiğe geçirilerek, ağırlık kaybı eğrileri çıkarılabilir. Dx-MBAm hidrojelinin, 0.1 U/ml enzim varlığında, ölçülen W_t ve hesaplanan W_t/W_0 değerleri Çizelge Ek 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge EK 4.1

| t (saat) | W_t (g) | W_t/W_0 |
|----------|-----------|-----------|
| 0 | 0.025 | 1.0 |
| 5 | 0.025 | 1.0 |
| 10 | 0.2375 | 0.95 |
| 20 | 0.02 | 0.80 |
| 30 | 0.01625 | 0.65 |
| 40 | 0.0125 | 0.50 |
| 50 | 0.01125 | 0.45 |
| 60 | 0.01 | 0.40 |

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Murat ŞİMŞEK

Doğum Yeri : Artvin/Şavşat

Doğum Yılı : 1/6/1974

Medeni Hali : Bekar

Eğitim

Lisans : (1995-2000), Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü

Yüksek Lisans : (2001-2000) ,Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilimdalı

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi : Hacettepe Üniversitesi, Öğrenci Evleri (1999-2004)