

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YAVAŞ SALIM UYGULAMASINA YÖNELİK SICAKLIĞA DUYARLI HİBRİT
HİDROJEL GELİŞTİRİLMESİ

Kübra ÖZMAYA KILINÇ

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YAVAŞ SALIM UYGULAMASINA YÖNELİK SICAKLIĞA DUYARLI HİBRİT HİDROJEL GELİŞTİRİLMESİ

Kübra ÖZMAYA KILINÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Serap DURKUT

Bu çalışmada, sentetik poli (N vinil kaprolaktam) (PNVCL), biyouyumluluğu ve vücut sıcaklığına yakın düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) nedeniyle, sıcaklığa tepkili hibrit hidrojel sentezi için özellikle tercih edilmiştir. Mekanik ve biyoaktif özellikleri geliştirmek için sıcaklığa tepkili PNVCL ile yarı sentetik polimer karboksimetil selüloz (CMC) kullanılarak iki farklı hibrit hidrojel oluşturulmuştur: PNVCL/CMC fiziksel çapraz bağlı hidrojel harmanlanma (blend) ile iç içe geçmiş polimerik ağ yapısı ve PNVCL-g-CMCNH₂ kimyasal çapraz bağlı aşı hidrojel. Bu hibrit hidrojellerden ilaç salımı için kullanılmak üzere disk şekilli iskeleler oluşturulmuştur. Yeni sentezlenen hibrit hidrojellerin kimyasal yapıları (ATR-FTIR, HNMR, LCST, TGA/DSC, SEM) ve disk şeklindeki iskelelerin bazı özellikleri (su tutuculukları, biyobozunurluk, ilaç salınımı, biyouyumluluk) incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her iki hibrit hidrojel sentezlemede, çapraz bağlama yöntemleri (fiziksel ve kimyasal) başarılı olmuştur ve elde edilen hidrojeller sıcaklığa tepkilidirler. PNVCL/CMC fiziksel harmanlanma ve PNVCL-g-CMCNH₂ kimyasal çapraz bağlı aşı hidrojelleri, sırasıyla 32°C ve 39°C'de belirgin bir faz geçiş sıcaklığı sergilemiştir. Özellikle, PNVCL-g-CMCNH₂ hidrojel, sıcaklığa bağlı lidokain salımı göstermiştir. Bu nedenle, PNVCL-g-CMCNH₂ hibrit sistemi, kontrollü salım dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda potansiyel kullanıma sahiptir.

Eylül 2023, 89 sayfa

Anahtar Kelimeler: Sıcaklık tepkili polimer, poli(N-vinil kaprolaktam), karboksimetil selüloz (CMC), hibrit hidrojel, iç içe geçmiş ağ yapılı hidrojel (IPN), ilaç salım

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF A THERMO-SENSITIVE HYBRID HYDROGEL FOR SLOW RELEASE APPLICATIONS

Kübra ÖZMAYA KILINÇ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc.Prof. Serap DURKUT

In this thesis, synthetic poly (N vinyl caprolactam) (PNVCL) is particularly preferred for temperature-sensitive hybrid hydrogel synthesis because of its biocompatibility and low critical solution temperature (LCST) close to body temperature. Thermoresponsive PNVCL were combined with the semi synthetic polymer carboxymethyl cellulose (CMC) and formed two hybrid hydrogels: Interpenetrating (IPN) PNVCL/CMC physical crosslinked blend hydrogel and PNVCL-g-CMCNH₂ chemical crosslinked graft hydrogel to enhance mechanical and bioactive properties. Disc-shaped scaffolds were formed the hybrid hydrogels for drug release. The chemical structure of hydrogels (ATR-FTIR, HNMR, LCST, TGA/DSC, SEM) and some properties of scaffolds (water uptake, biodegradation, drug release, biocompatibility) were investigated. According to the results, crosslinking methods (physical and chemical crosslinking methods) to synthesize of both the hybrid hydrogels were successful and showed thermal sensitivity. The PNVCL/CMC blend and PNVCL-g-CMCNH₂ graft hydrogels exhibited a distinct phase transition temperature at 32 and 39°C, respectively. PNVCL-g-CMCNH₂ graft hydrogel exhibited temperature-dependent lidocaine release. Thus, PNVCL-g-CMCNH₂ may have potential use in various biomedical applications, including controlled release.

September 2023 , 89 pages

Key Words: Thermosensitive polymer, poly(N-vinylcaprolactam), carboxymethyl cellulose (CMC), hybrid hydrogel, interpenetrating (IPN) hydrogel, drug release

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösterip destek olan, araştırmalarım ve laboratuvar ortamında çalışmam süresince yapılması gereken deneyler için gerekli tüm imkanları sunarak yardımlarını esirgemeyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Serap DURKUT'a (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı) teşekkür ederim.

Tezimin hazırlığında ve yürütülmesinde bilgi ve önerilerini esirgemeyen, bu süreçte laboratuvar imkanlarını kullanmamda sonsuz destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı), hücre kültürü çalışmalarımındaki yardımları için Sayın Doç. Dr. Mahmut PARMAKSIZ'a (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü) ve Elçinlab üyelerine teşekkür ederim. Kimyasal karakterizasyon için gerekli analizlerde destekleri için Prof.Dr.Orhan ATAKOL'a teşekkür ederim.

Her kararında yanımda olan, bugünlere gelmemi sağlayan, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen annem Canan ve babam Ahmet'e; her sıkıntıda beni dinleyip destek olan sevgili ablam Cansu'ya; sevgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan yol arkadaşım Koray'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Kübra ÖZMAYA KILINÇ
Ankara, Eylül 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Hidrojeller.....	4
2.2 Hidrojellerin Sınıflandırılması.....	4
2.2.1 Kaynaklarına göre sınıflandırma	5
2.2.1.1 Doğal polimerler.....	6
2.2.1.2 Sentetik polimerler.....	7
2.2.1.3 Hibrit hidrojeller	8
2.2.2 Sentetik polimerlerin yapılarına göre sınıflandırma	8
2.2.2.1 Homopolimer hidrojeller	8
2.2.2.2 Kopolimer hidrojeller	9
2.2.2.3 İç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller (IPN).....	9
2.2.3 Çapraz bağlanma durumuna göre sınıflandırma	10
2.2.3.1 Fiziksel hidrojeller	10
2.2.3.2 Kimyasal hidrojeller	11
2.2.4 Bozunabilirliğine göre sınıflandırma	12
2.2.5 Hidrojellerin yüklerine göre sınıflandırma	12
2.2.5.1 Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller	13
2.2.5.2 Anyonik hidrojeller	13
2.2.5.3 Katyonik hidrojeller	13
2.2.6 Fiziksel durumuna göre sınıflandırma.....	14
2.3 Uyarı-Cevap Hidrojelleri	14
2.3.1 Sıcaklığa duyarlı hidrojeller.....	16

2.3.2 pH'a duyarlı hidrojeller	17
2.3.3. Elektrik alana duyarlı hidrojeller.....	18
2.3.4 Manyetik alana duyarlı hidrojeller	18
2.3.5 Glikoza duyarlı hidrojeller	19
2.4 Poli N Vinil Kaprolaktam (PNVCL)	19
2.5 Karboksimetil Selüloz (CMC).....	21
2.6 Çapraz Bağlayıcılar ile Hidrojel Sentezi.....	22
2.6.1 Metallerle çapraz bağlama	23
2.6.2 Radyasyonla çapraz bağlama	23
2.6.3 Polimerlerle çapraz bağlama-Hibrit hidrojel sentezi	24
2.6.4 Küçük çapraz bağlayıcı ajanlar	25
2.6.5 Çoklu (Çift) çapraz bağlı hidrojeller.....	27
2.7 Hidrojellerin Su Tutuculuğuna Etki Eden Faktörler	27
2.8 Uyarı-Cevap Hidrojellerinin Kullanım Alanları	28
2.8.1 Hidrojellerin ilaç salım sistemlerinde kullanımı	28
2.8.2 Hidrojellerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanımı	31
3. KAYNAK ÖZETLERİ	33
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	38
4.1 Materyal	38
4.2 Yöntem	38
4.2.1 Hidrojellerin sentezi.....	38
4.2.1.1 Karboksimetil selüloz (CMC)	39
4.2.1.2 Fonksiyonel CMC-NH ₂ sentezi.....	39
4.2.1.3 Fonksiyonel PNVCL-COOH sentezi	40
4.2.1.4 Harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojelinin fiziksel çapraz bağlanması	40
4.2.1.5 Kimyasal çapraz bağlı PNVCL-g-CMCNH ₂ hibrit hidrojel sentezi	41
4.2.1.6 Hidrojellerden disk şeklinde üç boyutlu (3D) iskele elde edilmesi	41
4.2.2 Polimerlerin kimyasal ve termal karakterizasyonu	42
4.2.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	42
4.2.2.2 Proton Nükleer Manyetik Rezonans (1H NMR)	42
4.2.2.3 Alt Kritik Çözelti Sıcaklığı (LCST)	42
4.2.2.4 Termogravimetrik Analiz (TGA)	43
4.2.2.5 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM).....	43
4.2.2.6 Su tutuculuk.....	43

4.2.2.7 Biyobozunurluk.....	44
4.2.2.8 İlaç salımı	44
4.2.2.9 Hemoliz- kan uyumluluğu	45
4.2.2.10 İndirekt biyouyumluluk testi	45
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
5.1 Fonksiyonel PNVCL-COOH ve CMC-NH2 Sentezi	47
5.2 Harmanlanmış PNVCL/CMC Hidrojel Sentezi	47
5.3 PNVCL-g-CMC-NH2 Hibrit Hidrojel Sentezi	48
5.4 Hidrojellerden Üç Boyutlu (3D) İskele Eldesi	48
5.5 Fonksiyonel CMC-NH2 İçeren Hidrojellerin Genipinle Çapraz Bağlanması ..	50
5.6 ATR-FTIR	51
5.7 ¹ H NMR	54
5.8 Faz Geçiş Sıcaklığı	56
5.9 Termogravimetrik (TGA) Analizler	59
5.10 SEM Analizler	62
5.11 Su Tutuculuk	64
5.12 Biyobozunurluk	66
5.13 İlaçYükleme ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi	67
5.14 Hemoliz	69
5.15 İndirekt Hücre Canlılığı	70
TARTIŞMA VE SONUÇ	75
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER DİZİNİ

AA	Akrilik asit
ADH	Adipik asid dihidrazid
AIBN	2,2'-Azobisbütironitril
Al ₂ (SO ₄) ₃	Alüminyum sülfoksit
CHZ	Açıl hidrazid
CMC	Karboksimetil Selüloz
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
ECM	Hücre dışı matris
EDA	Etilen diamin
EDC	1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) karbodiimid
EDTA	Etilendiamintetraasetik asidin
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Gıda ve ilaç idaresi (A.B.D)
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi
GA	Gluteraldehit
HA	Hyaluronik asid
HNMR	Proton nükleer manyetik rezonans
HOBt	1-Hidroxybenzotriazole hydrate
IPN	İç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller
LCST	Alt kritik çözelti sıcaklığı
MPA	Merkaptopropiyonik asit
NK	Negatif kontrol
NHS	N-hidroksisüksinimit
NVCL	N-vinil kaprolaktam
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCL	Polikaprolaktan
PE	Polietilen
PK	Pozitif kontrol
PNIPAAm	Poli (N- izopropil akrilamit)
PNVCL	Poli (N- vinilkaprolaktam)
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktik-glikolik asit
SEM	Taramalı elektro mikroskopu
SG	Süksinoglikan

TBHP

TGA

UCST

Tersiyer-bütöl hidroperoksit

Termogravimetrik analiz

Üst kritik çözelti sıcaklığı



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Hidrojellerin sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.2 Kopolimer türleri	9
Şekil 2.3 İç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller (IPN).....	10
Şekil 2.4 Hidrojellerde fiziksel etkileşim türleri	11
Şekil 2.5 Kimyasal ve fiziksel hidrojellerin oluşumu	12
Şekil 2.6 Fiziksel/kimyasal uyaranlara karşı hidrojellerin davranışları	15
Şekil 2.7 Sıcaklığa duyarlı sentetik poli(N-vinilkaprolaktam)	20
Şekil 2.8 Karboksimetil selüloz	22
Şekil 2.9 CMC'nin metal iyonları ile jel oluşumu	23
Şekil 2.10 EDC/NHS ile kovalent amid bağı oluşumu	26
Şekil 2.11 Çapraz bağlayıcı genipin ile tepkime ve renk oluşumu	26
Şekil 2.12 İlaç salım sistemleri	29
Şekil 2.13 Uyarı cevap hidrojellerinden ilaç salımı	30
Şekil 4.1 Fonksiyonel CMC-NH ₂ sentezi.....	40
Şekil 4.2 Hidrojellerin üç boyutlu iskele yapılarının eldesi.....	41
Şekil 5.1 Fonksiyonel a)PNVCL-COOH ve b) CMC-NH ₂ sentezi.....	47
Şekil 5.2 Harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojel sentezi	48
Şekil 5.3 PNVCL-g-CMC-NH ₂ hibrit kopolimer sentezi	48
Şekil 5.4 Liyofilize edilmiş CMC, CMC-NH ₂ , PNVCL/CMC VE PNVCL-g- CMC-NH ₂ hidrojellerinden hazırlanan üç boyutlu iskeleler.....	49
Şekil 5.5 Liyofilize edilmiş CMC, harmanlanmış PNVCL/CMC üç boyutlu iskelelerin Al ₂ (SO ₄) ₃ ve FeCl ₃ çözeltileri ile iyonik çapraz bağlanması.....	49
Şekil 5.6 Çözücü ortamında, CMC, CMC-NH ₂ , harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMC-NH ₂ hidrojellerinden hazırlanan üç boyutlu iskeleler	50
Şekil 5.7 Serbest amino grupları içeren örneklerin genipin ile tepkimesi	51
Şekil 5.8 CMC FTIR spektrumu	51
Şekil 5.9 Fonksiyonel CMC-NH ₂ FTIR spektrumu	52
Şekil 5.10 Fonksiyonel PNVCL-COOH FTIR spektrumu	53
Şekil 5.11 Harmanlanmış PNVCL-CMC FTIR spektrumu	53
Şekil 5.12 PNVCL-g-CMC-NH ₂ kopolimeri FTIR spektrumu.....	54
Şekil 5.13 NVCL ve PNVCL-COOH ¹ H NMR spektrumları.....	55
Şekil 5.14 PNVCL-g-CMC-NH ₂ ¹ H NMR spektrumları	56

Şekil 5.15 CMC, CMC-NH ₂ , harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojel ve PNVCL-g-CMC-NH ₂ kopolimerinin faz geçiş sıcaklığı.....	58
Şekil 5.16 TGA eğrileri a) CMC b) CMCNH ₂	59
Şekil 5.17 PNVCL-COOH TGA eğrisi.....	60
Şekil 5.18 Harmanlanmış PNVCL/CMC TGA eğrisi.....	61
Şekil 5.19 PNVCL-CMCNH ₂ kopolimeri TGA eğrisi.....	61
Şekil 5.20 a ve b) CMC hidrojellerinin ve c ve d) CMCNH ₂ hidrojellerinin 200X ve 500X de yüzey morfolojileri	62
Şekil 5.21 a ve b) Harmanlanmış CMC hidrojellerinin ve c ve d) PNVCL-g-CMCNH ₂ kopolimer hidrojellerinin 200X ve 500X de yüzey morfolojileri	63
Şekil 5.22 CMC temelli hidrojellerin su tutuculukları.....	64
Şekil 5.23 Hibrit hidrojellerin sıcaklığa bağlı su tutuculukları	65
Şekil 5.24 CMC temelli hidrojellerin sıcaklığa bağlı biyobozunurlukları.....	66
Şekil 5.25 Standart lidokain grafiği	67
Şekil 5.26 Hibrit hidrojellerden sıcaklığa duyarlı kümülatif ilaç salımı.....	68
Şekil 5.27 Hidrojellerin kan uyumluluklarının değerlendirilmesi için in vitro hemoliz testi	70
Şekil 5.28 İndirekt in vitro sitotoksikite testindeki hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri a) NK b) CMC c) CMCNH ₂ d) harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH ₂ ile etkileştirilmiş hücrelerin 4X ve 10X görüntüleri	72
Şekil 5.29 İndirekt in vitro sitotoksikite testinde a) NK b) CMC c) CMCNH ₂ d) harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH ₂ ile etkileştirilmiş hücrelerin canlılıklarının alamar mavisi testi ile belirlenmesi	73
Şekil 6.1 Sıcaklığa duyarlı PNVCL-g-CMCNH ₂ hibrit hidrojel sentezi.....	74
Şekil 6.2 CMC temelli hidrojellerin toplu FTIR grafiği	75
Şekil 6.3 CMC temelli örneklerin toplu TGA grafikleri.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan doğal ve sentetik polimerler	5
Çizelge 2.2 Doğal polimerler ve uygulamaları	6
Çizelge 2.3 Doğal ve sentetik polimerlerin avantajları/ dezavantajları	7
Çizelge 2.4 Hibrit hidrojellerin sentezi ve hücresel davranışları	8
Çizelge 2.5 Uyarı-cevap hidrojellerinin sınıflandırılması.....	15
Çizelge 2.6 pH'a duyarlı hidrojellerdeki fonksiyonel gruplar	17
Çizelge 6.1 Üç boyutlu hidrojel iskeleler ile etkileştirilen adipoz mezankimal hücrelerinin Alamar mavisi ile belirlenen hücre canlılıkları (%)	80

1. GİRİŞ

Biyomalzemelerin bir sınıfı olan hidrojel, yapıları içinde büyük miktarda su ve biyolojik sıvıları absorplayabilen, üç boyutlu, çözünmeyen, çapraz bağlı hidrofilik polimerlerdir. Yüksek su içeriği, şişme davranışı, gözeneklilik, kullanım kolaylığı, biyoyumluluk vb. özelliklere sahip olması nedeniyle hidrojel, kontrollü ilaç salım sistemleri, yapay deri, biyosensörler, kontakt lensler gibi biyomedikal uygulamalar için geniş kullanım alanı olan benzersiz malzemelerdir. Hidrojel, biyolojik çalışmalardan endüstriyel çalışmalara kadar büyük ilgi görmekte ve giderek önem kazanmaktadır.

Çalışmalar doğal, sentetik ya da gelişmekte olan hibrit (doğal-sentetik) hidrojel üzerinde. Ancak son yıllarda, sıcaklık, pH ve elektrik alanı gibi dış uyaranlara yanıt olarak bir faz geçişi gösteren, uyarıya duyarlı polimerik sistemler çok ilgi çekmektedir (Zhang vd. 2009). Uyarı-cevap hidrojelleri olarak adlandırılan bu hidrojel, çevresel uyarılara (pH, iyonik güç, sıcaklık vb.) bağlı olarak şekillerinde, hacimlerinde, fazlarında (sıvı, jel, katı vb.) değişim sonucunda farklı davranışlar (şişme, sol-jel geçişi, ağ yapısı veya mekanik dayanım vb.) gösterebilme yeteneğine sahiptirler (Mantha vd. 2019). Uyarı-cevap hidrojellerinden pH ve sıcaklığa duyarlı polimerik sistemler en çok çalışılan hidrojellerdir. Özellikle patolojik durumlarda, hasarlı doku çevresinde pH ve sıcaklık değişiminin gerçekleşmesi ve *in vivo* ve *in vitro* koşullarda ortam pH ve sıcaklığının dışarıdan kolayca kontrol edilebilir olması bu gruptaki polimerlerin sentezi ve geliştirilmesinde önemli avantajlardır.

Poli (N-vinilkaprolaktam) (PNVCL), toksik olmayan, sentetik ve sıcaklığa duyarlı bir polimerdir. PNVCL'nin en karakteristik özelliği, vücut sıcaklığına yakın (30-50 °C) alt kritik çözelti sıcaklığı (LCST) sahip olmasıdır (Vihola vd. 2002). PNVCL'in tersinir hidrofilik-hidrofobik faz geçişleri, kontrollü ilaç salım uygulamaları için oldukça kullanışlıdır (Cortez-Lemus vd. 2016, Sanoj Rejinold vd. 2011).

Doğal polisakkaritlerden hidrojel olarak kullanılabilen selüloz ve türevleri, biyoyumluluk ve biyobozunur özelliklere sahip oldukları için, ilaç salımı vd. medikal uygulamalarda yaygın olarak çalışılmaktadır. Karboksimetil selüloz (CMC), hidroksil

gruplarının karboksimetil grupları ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) ile değiştirildiği eter türevi bir selüloz yapısındadır. Hidrofilik bir anyonik polimer olan karboksimetil selüloz (CMC), aynı zamanda yapısındaki çok sayıdaki fonksiyonel hidroksil ($-\text{OH}$) ve karboksilik asit grupları ($-\text{COOH}$) sayesinde yüksek su bağlama kapasitesine sahiptir (Rahman vd. 2021) ve çözünürlüğü ile kararlılığı artırılmıştır. Biyobozunur, yüksek kimyasal dayanıma sahip ve ekonomik olması, toksik ve alerjik olmaması önemli avantajlarıdır.

Biyomedikal klinik ve araştırma uygulamalarında son yıllarda yenilikçi hidrojel grubu olarak, hibrit hidrojellerin (hem sentetik hem de doğal polimerleri içeren) kullanımı artmıştır. Bu yeni yaklaşımla iki farklı hidrojel grubunun sahip olduğu istenilen özellikler, tek bir polimerik yapıda biraraya getirilebilmektedir (Cai vd. 2021). Ayrıca her iki gruba ait önemli dezavantajlar (kimyasal, fiziksel, biyolojik, mekanik vb.), malzeme sentez-üretim-tasarım aşamalarında çok çeşitli kimyasal modifikasyonlar ile azaltılabilmekte ya da tamamen önlenebilmektedir. Hibrit hidrojeller çeşitli yöntemler kullanılarak (polimerizasyon, çapraz bağlama ve fonksiyonlandırma vb.) büyük miktarlarda üretilabilir ve moleküler yapıları, molekül ağırlıkları, fiziksel ve kimyasal özellikleri istenildiği şekilde ayarlanabilir. Hibrit hidrojellerin sahip olduğu ya da sentez sırasında kazanabildiği özellikler tıbbi uygulamalar için kritik önem taşımakta ve bu nedenle eşsiz bir çalışma alanı oluşturmaktadır (Palmese vd 2019).

Bu çalışmanın amacı, monomerlerinden (NVCL) serbest radikalik tepkime ile polimerleştirilerek ve merkaptopropiyonik asit (MPA) ile fonksiyonlandırılarak elde edilen sentetik fonksiyonel PNVCL-COOH ile, etilen diamin (EDA) ile fonksiyonlandırılan doğal polimer CMC-NH₂ ile hibrit hidrojel sentezidir. Çalışmada kullanılacak polimerlerin çeşitli fonksiyonel gruplara sahip olması ve farklı kimyasal ve fiziksel yöntemler ile de fonksiyonlandırılmaya yatkın özellikte olmaları araştırma için geniş bir potansiyel çalışma alanı sağlamaktadır.

Bu çalışmada, yeni fonksiyonel PNVCL-COOH ile fonksiyonel CMC-NH₂ çözeltilerinin EDC/NHS ile kimyasal çapraz bağlanmasıyla hazırlanan PNVCL-g-CMC-NH₂ hibrit hidrojinin özellikleri, fonksiyonel PNVCL-COOH ile CMC çözeltilerinin harmanlanması ile hazırlanan hidrojin özellikleri ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

Sentezlenen polimerlerden elde edilen bu hibrit hidrojellerin kimyasal karakterizasyonu yapılmış ve termal davranışları incelenmiştir. Elde edilen iskelelerin yüzey morfolojileri belirlenmiş ve su tutuculuk, biyobozunurluk, termal bozunma, ilaç salım gibi özellikleri belirlenmiştir. Sentezlenen hibrit biyomalzemelerin, biyouyumluluğu hemoliz ve indirekt hücre toksisitesi çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, geliştirilen sıcaklığa duyarlı PNVCL-g-CMCNH₂ hibrid hidrojel yapılarının biyoaktif madde taşıyıcı ve/veya salımına uygun biyomalzeme olarak kullanımın da çeşitli alternatifler sağlayacağı düşünülmektedir.



2. KURAMSAL TEMELLER

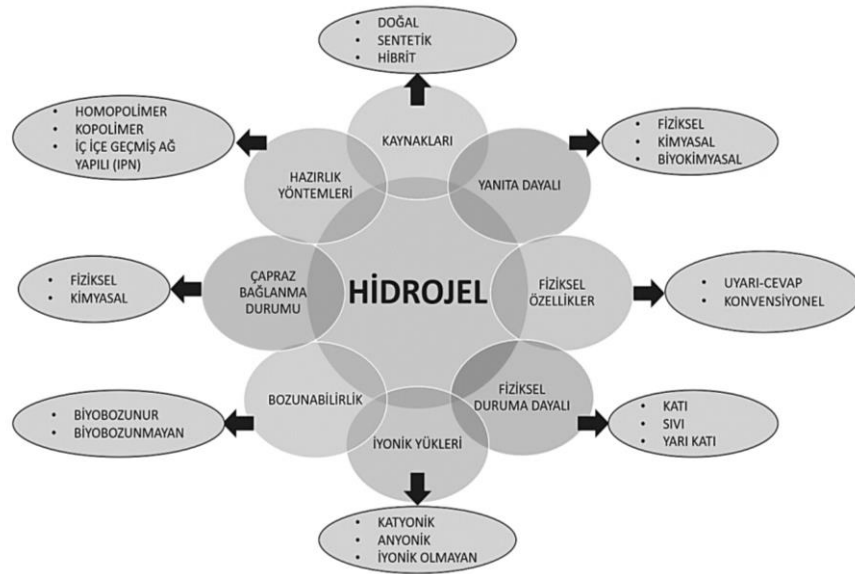
2.1 Hidrojeller

Hidrojeller, su veya biyolojik sıvılarla etkileştiklerinde çözünmeyen, çok miktarda suyu yapısına alarak şişebilen, üç boyutlu yapıdaki polimerlerdir. Hidroksil (-OH), karboksil (-COOH), amid (-CONH₂) gibi hidrofilik grupların varlığı onlara su tutuculuk özelliği kazandırmaktadır (Mahinroosta vd. 2018). Hidrojellerin suda çözünmemelerinin nedeni, yapısında çok sayıda kimyasal ya da fiziksel çapraz bağların bulunmasıdır. Hidrojellerin üç boyutlu yapısını ise bu çok sayıdaki etkileşimler oluşturur. Hidrojellerin hidrofilik karakteri ve üç boyutlu ağ şeklindeki yapısı nedeniyle doğal dokuya benzer yapılardır. Mekanik kararlılıklarını koruyarak kendi ağırlıklarının %20-100 kadar suyu absorblayabilirler. Süperabsorban hidrojeller, %100'lük şişme kapasitesinin üstüne çıkabilirler (Byrne vd. 2002).

Hidrojel zincirleri arasındaki çapraz bağlanma fiziksel (H-bağları, iyonik ya da hidrofobik) veya kovalent (ester, amid, imin vb) çapraz bağlama ile yapılmaktadır. Hidrojeller için birçok farklı makromoleküler yapı vardır (Hoffman 2012). Hidrojeller, ihtiyaca ve kullanım amacına göre, nanopartiküller, mikropartiküller, tabakalar, levhalar, filmler gibi çok çeşitli formlarda hazırlanabilir.

2.2 Hidrojellerin Sınıflandırılması

Hidrojeller, kaynaklarına, hazırlanma yöntemlerine, iyonik yüklerine, çapraz bağlanma durumlarına göre çok çeşitli sınıflandırılabilir (Şekil 2.1) (Barik 2019).



Şekil 2.1 Hidrojellerin genel sınıflandırılması

2.2.1 Kaynaklarına göre sınıflandırma

Hidrojellerin hazırlanmasında, doğal ve sentetik kaynaklı polimerler kullanılmaktadır. Farklı doğal kaynaklardan (bitki, hayvan, insan, bakteri vb. elde edilen) protein-peptit yapılı, polisakkarit yapılı ya da nükleik asit yapılı (DNA, RNA) ve çeşitli monomerlerden polimerleştirilerek elde edilen sentetik hidrojellere örnekler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan doğal ve sentetik polimerler (Lin vd. 2006)

Doğal polimerler	Sentetik monomerler
- Anyonik polimerler: Hyaluronik asit Pektin Jelatin - Katyonik polimerler: Polilisins Kitosan - Amfifilik polimerler: Kollajen Fibrin - Nötr polimerler: Dekstran Agaroz	- Akrilik asit (AAc) - Metakrilik asit (MAAc) - Hidroksietil metakrilat (HEMA) - N-izopropil akrilamid (NIPAAm) - N-(2-hidroksi-propil) metakrilat(HPMA) - Etilen glikol akrilat / metakrilat (EGA / EGMA) - N-vinil-2-pirolidon (NVP)

Son yıllarda yenilikçi hidrojel grubu olarak hem sentetik hem de doğal polimerleri birlikte içeren hibrit kaynaklı hidrojeller kullanılır.

2.2.1.1 Doğal polimerler

İlk olarak canlı sistemde tanımlanan doğal polimerler, biyouyumlu ve biyobozunur olduğu için önemli bir avantaj sağlar. Biyouyumludurlar, çeşitli hücresel aktiviteleri (adhezyon, yayılma, göç vb.) destekleme özelliklerine sahiptirler ve ayrıca doğal dokuları taklit eden fibriler yapı (hücre dışı matris (ECM)) gibi davranabilirler, böylece, hücreler tarafından yeniden şekillenmelerine ve zamanla hücre tarafından salgılanan ECM'in oluşumuna yardımcı olurlar.

Ancak yeterli mekanik özelliklere sahip olmamaları önemli bir dezavantajdır. Doğal hidrojellerden protein peptit yapılı ve polisakkarit yapılı hidrojellere örnekler ve uygulama alanları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Doğal polimerler ve uygulamaları (Willerth vd. 2019).

	Biyomateryalin Türü	Uygulamaları
Protein-bazlı biyomalzemeler	Kollajen	Kemik, kıkırdak, kalp, sinir, damar, bağ doku
	Fibrin	Kıkırdak, sinir, damar
	İpek	Kemik, kıkırdak, karaciğer
Polisakkarit-bazlı biyomalzemeler	Agaroz	Kıkırdak, kalp, sinir
	Aljinat	Kıkırdak, karaciğer, sinir, damar
	Hyalüronan	Adipoz, sinir, kıkırdak, deri, damar
	Kitosan	Kemik, kıkırdak, sinir, deri

2.2.1.2 Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, doğal polimerler gibi biyolojik özellikleri bulunmamakla birlikte, önemli avantajlara sahiptirler (Çizelge 2.3). Monomerlerin sayılarının ve sentez yöntemlerinin artması ve ayarlanabilir mekanik ve kimyasal yapıları nedeniyle tercih edilen biyomalzemeler sınıfını oluştururlar.

Çizelge 2.3 Doğal ve sentetik polimerlerin avantajları/ dezavantajlar

	DOĞAL POLİMERLER	SENTETİK POLİMERLER
AVANTAJLARI	1. Biyouyumlu 2. Biyobozunur 3. Hücrel aktiviteleri destekler	1. Yapısında doğal biyoaktif özellikler bulunmaz. 2. Ayarlanabilir mekanik özelliklere sahip.
DEZAVANTAJLARI	1. Yeterli mekanik özelliklere sahip değil. 2. Patojen içerebilir. 3. Bağışıklık ve iltihaplı yanıtlara neden olabilir.	1. Biyobozunur değil. 2. Toksik
ÖRNEKLER	➤ Kolajen ve jelatin gibi proteinler ➤ Aljinat ve agaroz gibi polisakkaritler	➤ Akrilik asit (AAc), Akrilamid (AAm) ➤ Hidroksietil metakrilat (HEMA) ➤ Metakrilik asit (MAA) ➤ Metil metakrilat (MMA)

Biyomalzeme olarak kullanılabilen sentetik polimerler; polietilen (PE), polimetilakrilamit, poliesterler, poliamidler, poliüretanlar, poliasetal vb. (Park vd. 2002). Bu polimerler genellikle biyobozunur değildirler yani vücutta doğal olarak bozunmaz bu yüzden genellikle doku ortamının modellenmesinde veya implant yüzeylerin kaplanması için kullanılmaktadır. Polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polilaktik-glikolik asit (PLGA) ve polikaprolaktan (PCL) biyobozunurdur ancak vücutta toksik etki oluşturmaz.

2.2.1.3 Hibrit hidroojeller

Biyomedikal, klinik ve araştırma uygulamalarında karşılaşılan zorluklar ve ihtiyaçlar nedeniyle yeni yaklaşımlar geliştirilmiş, sentetik ve doğal polimerlerin birlikte kullanıldığı hibrit hidroojeller ile yapılan çalışmaların artmasına yol açmıştır. (Çizelge 2.4) Hibrit hidroojeller, kimyasal, fonksiyonel ve morfolojik açıdan farklı yapı bloklarının, fiziksel veya kimyasal yollarla senteziyle elde edilen nano ya da mikro yapıları içerir (Palmese vd. 2019).

Çizelge 2.4 Hibrit hidroojellerin sentezi ve hücresel davranışları

HİDROJEL İÇERİĞİ	KULLANILAN NANOPARTİKÜL	HÜCRE TİPİ	SONUÇ
Jelatin <u>Metakrilat</u>	Altın nanopartikül	Adipoz kökenli kök hücre	Osteogenezin artışı
Jelatin Metakrilat	Grafen oksit	Kalp hücreleri (H9c2, HUVEC)	VEGF geninin hücrelere kontrollü aktarımı
<u>Kolajen</u>	İşlevsel <u>biyoaktif cam nanopartikül</u>	Mezenkimal kök hücre	Enzimatik degradasyonun ve hücrelerin büzülme davranışının kararlı hale gelmesi
Kolajen/polivinil alkol	Nano hidroksiapatit	Osteoblastik hücreler (MC3T3)	Hücre yapışmasının, çoğalmasının ve farklılaşmasının artışı
Oligo-poli (etilen glikol) fumarat	Grafen oksit	Kardiyomiyosit	<u>Miyokard</u> enfarktüsüne, <u>implantasyondan</u> sonra hücre elektriksel sinyalleşmesinin artışı

2.2.2 Sentetik polimerlerin yapılarına göre sınıflandırma

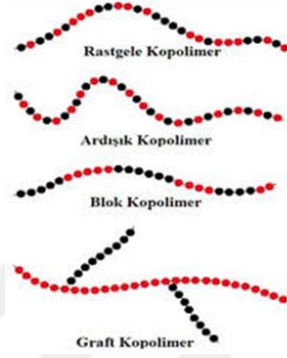
Sentetik polimerlerin yapılarına göre homopolimer, kopolimer ve iç içe geçmiş ağ yapılı hidroojeller (IPN) olmak üzere üçe ayrılır.

2.2.2.1 Homopolimer hidroojeller

Homopolimer, tek tip monomerden çıkılarak sentezlenen, ağ yapılı çapraz bağlı hidroojellerdir (Lizawa vd. 2007). Örneğin, polietilen, polistiren, politetrafloretilen, poli (vinil klorür) polimerleri birer homopolimerdir.

2.2.2.2 Kopolimer hidroojeller

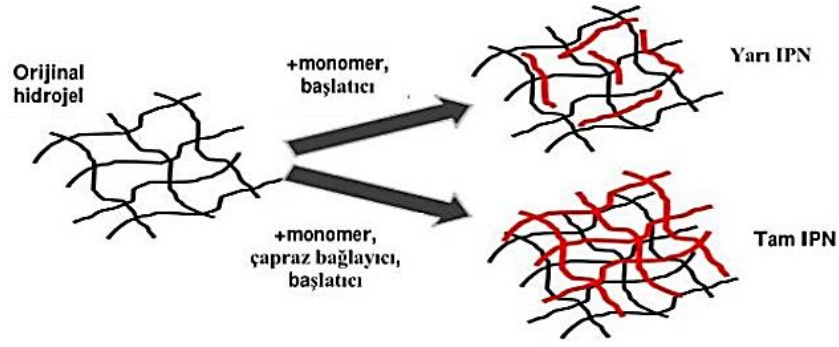
Kopolimer, birden fazla monomer birimi bulunan hidroojellerdir (Yang vd, 2002). Monomerler, rasgele, ardışık, blok veya aşılı (graft) konfigürasyon şeklinde polimer ağının zinciri boyunca dizilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Kopolimer türleri

2.2.2.3 İç içe geçmiş ağ yapılı hidroojeller (IPN)

İç içe geçmiş ağ yapılı hidroojeller (IPN), çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel kombinasyonundan (alaşım) oluşur. Polimerler arasında kimyasal bağ bulunmadığından her iki bileşende kendi özelliklerini korur. Bu yapılardan en az biri, diğerinin varlığında sentezlenir veya çapraz bağlanır (Lipatov 2002). İki polimerik örgünün birbiriyle uyumlu olması sonucunda IPN oluşumu artar. Polimerlerden birinin çapraz bağ içerdiği hidroojeller, yarı-IPN tipi hidroojellerdir (Maolin vd. 2000). Bu yapılar kimyasal bağlar kırılmadığı sürece birbirinden ayrılmazlar. IPN hidrojel sentezinde protein, polisakkarit gibi doğal polimerler ve yapısında hidrofilik fonksiyonel grup bulunduran sentetik polimerler kullanılır (Hoffman 2002). Bu özelliklerinden dolayı IPN yöntemi çok avantajlıdır ve Şekil 2.2’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.3 İç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller (IPN)

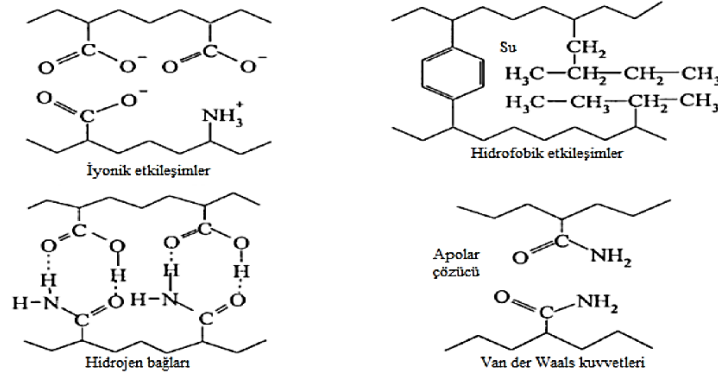
IPN hidrojeller, yeni ilaç uygulama sistemlerinin geliştirilmesine öncülük etmiştir ve bu polimer sisteminin uygulamaları da giderek artmaktadır. Özellikle ilaç salım sistemlerinde IPN'ler çok önemli bir yere sahiptir.

2.2.3 Çapraz bağlanma durumuna göre sınıflandırma

Hidrojeller, çapraz bağ türlerinin doğasına göre fiziksel ve kimyasal çapraz bağlı hidrojeller olmak üzere ikiye ayrılır.

2.2.3.1 Fiziksel çapraz bağlı hidrojeller

Hidrojeller, iyonik etkileşim ve hidrojen bağları veya hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel etkileşimlerin neden olduğu çapraz bağlanmalar sonucu oluşuyorsa bu hidrojeller fiziksel jeller olarak adlandırılır (Şekil 2.3) (Maolin vd. 2000). Fiziksel hidrojeller, sıcaklık, pH ya da çözücü bileşiminin değişmesi ile homojen bir çözelti oluştururlar ve başlangıç koşullarına döndüğünde yeniden jelleşirler. Bu davranışları nedeniyle fiziksel jeller, tersinir jeller olarak da bilinirler. Kitosan, aljinat ve jelatin iyonik etkileşimlerle çapraz bağlanan polimerlere örnek olarak verilebilir.

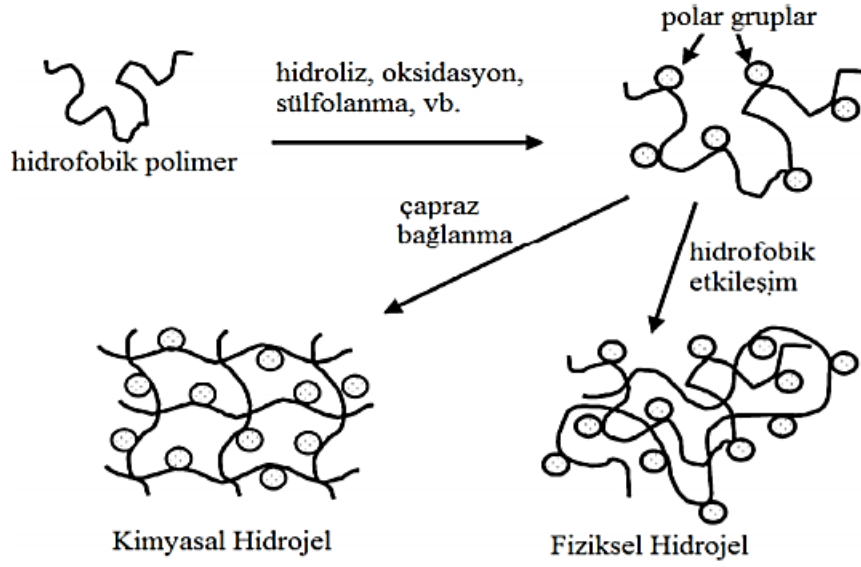


Şekil 2.4 Hidrojellerde fiziksel etkileşim türleri

2.2.3.2 Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller

Bu grupta yer alan hidrojeller, zincirleri arasında kuvvetli kimyasal bağlarla (kovalent) çapraz bağlanmanın gerçekleştiği jeller olup sıcaklık, pH ya da çözücü bileşiminin değişmesi ile tekrar çözünmedikleri için tersinmez olarak adlandırılırlar. Kimyasal çapraz bağlı ağlar kalıcı birleşim noktalarına sahiptirler. pHEMA, akrilik asit veya akrilamid kimyasal hidrojellere örnek olarak verilebilir. Kimyasal çapraz bağlı hidrojellerin oluşması için iki yöntem kullanılır.

İlk yöntem de suda çözünebilen monomerin uygun miktarda çapraz bağlayıcı varlığında polimerizasyonu ile gerçekleşir. Diğer yöntem de ise yine çapraz bağlayıcı ajan kullanılarak hidrofilik polimerin çapraz bağlanmasıdır. Her iki yöntem de genel reaksiyon mekanizmalarına uyar ve çeşitli şekillerde uygulanabilir. Şekil 2.4'te kimyasal ve fiziksel hidrojellerin oluşumu gösterilmiştir (Hoffman vd. 2012).



Şekil 2.5 Kimyasal ve fiziksel hidrojellerin oluşumu (Hoffman vd. 2012).

2.2.4 Bozunabilirliğine göre sınıflandırma

Hidrojeller, biyolojik olarak bozunabilen/parçalanabilen veya biyolojik olarak bozunamayan hidrojeller olarak ikiye ayrılır. Mikroorganizmaların etkisiyle, basit bir hidrolizle veya çözündürerek zararsız ürünlere ayrıldığı için biyolojik olarak bozunabilir hidrojeller, farmasötik ve biyomedikal alanlarda yaygın bir şekilde kullanılırlar. Biyolojik olarak bozunamayan hidrojeller ise parçalanamadığı için dış tedavilerinde kullanılır (Barik 2019).

2.2.5 Hidrojellerin yüklerine göre sınıflandırma

Hidrojeller, yüklerine göre nötral (iyonik olmayan), anyonik ve katyonik olmak üzere üç sınıfa ayrılabilir.

2.2.5.1 Nötral (iyonik olmayan) hidroojeller

Yapılarında iyonik grup bulundurmayan, yüksüz, homopolimerik veya kopolimerik nötr hidroojellerdir. Genellikle hidroksietil metakrilat, akrilamid, etilen oksit ve etilen glikol esaslıdır (Siepmann vd. 2012). Bu sınıfa giren hidroojeller fonksiyonel grup taşımadıkları için şişme ortamının pH'ına duyarlı değildir. Çözücünün osmotik basıncı ile yan zincirin gerilme enerjisi dengelendiğinde, hidroojeller denge değerine kadar şişerler. Çevre sıcaklığındaki değişimin sonucu olarak nötral hidroojellerin şişmesi ve büzülmesi gerçekleşir.

2.2.5.2 Anyonik hidroojeller

Karboksilik (-COOH) veya sülfonik (-SO₃H) asit gibi gruplar içeren negatif yüklü hidroojellerdir. Asidik veya anyonik monomerlerin homopolimerinden ya da bir anyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimerinden oluşurlar. Dış ortamın pH'ına bağlı olarak denge şişme davranışlarında ani değişimler gösterirler. Zayıf asidik gruplar içeren (karboksilik asit gibi) hidroojeller asidik pH'da iyonize olmayan anyonik gruplardan dolayı büzülürler. Bazik pH'larda ise iyonize olan asidik gruplar arasında gerçekleşen elektrostatik itme sebebiyle şişerler (Mocanu vd. 2011).

2.2.5.3 Katyonik hidroojeller

Amin (-NH₂) gibi bazik gruplar içeren pozitif yüklü hidroojellerdir. Bazik veya katyonik monomerlerin homopolimerlerinden ya da bir katyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimerinden oluşurlar. Katyonik hidroojellerin şişmesi, düşük pH ortamında iyonlaşmanın artması ve elektrostatik itme kuvvetlerinin artması sonucu gerçekleşir (Peppas vd. 2000).

2.2.6 Fiziksel Durumuna Göre Sınıflandırma

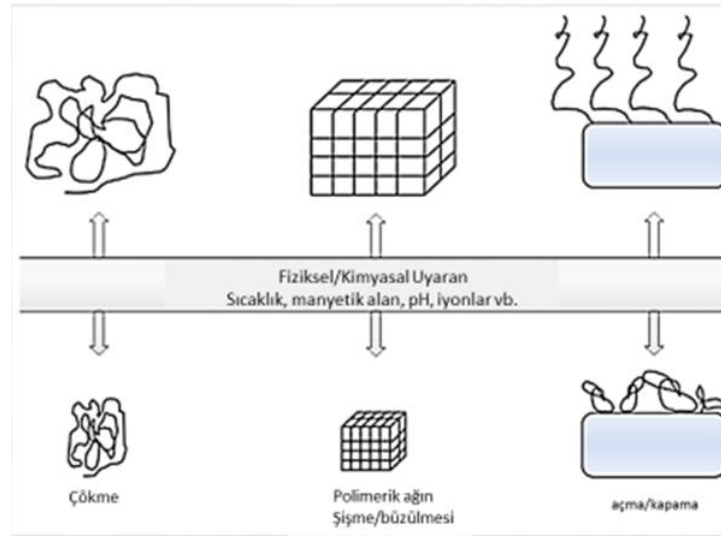
Hidrojeller, fiziksel durumlarına göre katı, sıvı ve yarı katı hidrojeller olarak sınıflandırılır. Normal sıcaklıkta katı halde olan hidrojeller, güçlü bir çapraz bağlı ağ yapısına sahiptirler. Ancak biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan biyolojik sıvılarda, su ve tampon çözeltilerinde şişebilirler (Barik 2019).

Sıvı hidrojeller, normal sıcaklıkta sıvı haldedirler ancak belirli bir sıcaklıkta yumuşak doku benzeri elastik bir faza sahiptirler (Loh vd. 2007). Gözenek boyutlarının kendiliğinden ayarlanabilme özelliği, biyouyumluluk ve iyi işlevsel özellikleri olduğu için biyomedikal uygulamalarda kullanımını uygun hale getirir. Ayrıca sıvı hidrojellere proteinlerin, ilaçların ve hücrelerin katılması kolay bir işlemdir ve enjeksiyon ile canlı sistemlere uygulanabilirler (Barouti vd. 2016).

Yarı katı hidrojeller, arayüzey kuvvetleri ve yumuşak doku ile çok güçlü etkileşimlere sahiptir. Biyo-yapışkan özelliğe sahip olduğu için, muko-yapışkan veya biyo-yapışkan hidrojeller olarak da tanımlanmaktadırlar (Nep vd. 2011).

2.3 Uyarı-Cevap Hidrojelleri

Uyarı-cevap hidrojelleri (uyarıya duyarlı, akıllı vb.), çevrelerinde meydana gelen herhangi bir uyarıya karşı yapısal değişime uğrayarak tersinir özellikler gösteren hidrojellerdir (Lin vd. 2006). Uyarılara cevap olarak şekillerini, hacimlerini, fazlarını (sıvı, jel, katı vb.) değiştirerek cevap verirler. Örneğin pH, iyonik güç veya sıcaklıktaki değişikliklere yanıt olarak şişme davranışı, sol-jel geçişi, ağ yapısı veya mekanik mukavemetlerinde değişiklik gösterebilirler (Mantha vd. 2019). Uyarı- cevap hidrojelleri ışık, sıcaklık, elektrik alan, manyetik alan, ultrason gibi fiziksel uyarılara; pH, redoks, iyonik güç, CO₂, glikoz gibi kimyasal uyarılara ve enzimler, antijenler, glutatyon ve DNA gibi biyolojik uyarılara karşı hassastır Çizelge 2.5 (Rizwan vd. 2017).



Şekil 2.6 Fiziksel/kimyasal uyarılara karşı hidrojenlerin davranışları (Şeker vd. 2014)

Çizelge 2.5 Uyarı-cevap hidrojenlerinin sınıflandırılması

Fiziksel Olarak Duyarlı	Biyolojik Olarak Duyarlı	Kimyasal Olarak Duyarlı
Sıcaklığa Duyarlı	Antijene Duyarlı	pH'a Duyarlı
Basınca Duyarlı	Enzime Duyarlı	İyonik Güce Duyarlı
Işığa Duyarlı	DNA Duyarlı	CO ₂ Duyarlı
Elektrik Alana Duyarlı	Glutatyona Duyarlı	Glikoza Duyarlı
Manyetik Alana Duyarlı		Redoks Duyarlı
Ultrasona Duyarlı		

Uyarı-cevap hidrojenlerinde, pH ve sıcaklığa duyarlı olanlar en çok araştırılan hidrojenlerdir. Çünkü insan vücudunda farklı dokularda vücut sıvılarının pH değeri 1-9 arasında değişir. Ayrıca birçok patolojik durumda, doku çevresinde pH ve sıcaklık değişimi gerçekleşmektedir. İn vivo ve in vitro koşullarda pH ve sıcaklık dışarıdan kolayca kontrol edilebilir oldukları için tercih edilmektedirler. Uyarı-cevap hidrojenleri kontrollü biyoaktif moleküllerin salımında (ilaç, büyüme faktörü vb. yüklenmesi ve salınması), biyomedikal uygulamalarda (şekil hafızasına yerleştirilebilir cihazlar, mikroakışkanlarda kaplama ve biyo ayırma), doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta (hücrelerin ve büyüme faktörlerinin verilmesi için enjekte edilebilir sistemler, hücre

yapışmasını kontrol etmek için uyaran duyarlı yüzeyler veya hücre infiltrasyonunu sağlayan hidrojel) yaygın bir şekilde kullanılır (Mantha vd. 2019).

2.3.1 Sıcaklığa duyarlı hidrojel

Sıcaklığa duyarlı hidrojel, bulundukları ortamın sıcaklık değişimine bağlı olarak şişme ya da büzülme davranışı gösterirler. Sıcaklığa bağlı değişimleri, ağıdaki hidrofilik/hidrofobik dengeye bağlanmıştır (Lim vd. 2014, Moon vd. 2012). Şişme kontrolü kolay olduğu için ilaç salım sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Bromberg vd. 1998). Bu hidrojel sahip olduğu en karakteristik özelliği metil, etil, propil gibi hidrofobik grupların varlığıdır. Sıcaklığa duyarlı poli (N-izopropil akrilamid) (PNIPAM), en yaygın kullanılan polimerdir (Zhang vd. 2000). Sıcaklığa duyarlı hidrojel oluşturan bileşenlerin, belli bir sıcaklığın altında veya üstünde çözünmez olması gerekir. Bu sıcaklıklara sırasıyla alt kritik çözelti sıcaklığı (lower critical solution temperature, LCST) ve üst kritik çözelti sıcaklığı (upper critical solution temperature, UCST) denir (Bromberg vd. 1998). Sıcaklığa duyarlı hidrojel, negatif ve pozitif olarak sıcaklığa duyarlı hidrojel olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

Negatif olarak sıcaklığa duyarlı hidrojel, düşük LCST değerine sahiptirler. LCST, sıcaklık yükseltildiğinde polimer çözeltisinin çözünür halden çözünmez hale dönüştüğü kritik sıcaklık olarak tanımlanabilir ve bu sıcaklıkta polimer tersinir bir faz geçişi gösterir. Polimer, LCST'nin altında hidrofilik karakterdeyken, LCST'nin üzerinde hidrofobik karakterde olur.

Bu kritik sıcaklığın altında polimer ve su molekülleri arasındaki hidrojen bağları polimerin şişmesini sağlarken, sıcaklığın üstünde hidrofobik etkileşimler ortaya çıkar ve polimer büzülme. Poli (N-izopropil akrilamid), poli (N-etil metakrilamid) ve poli (metil vinil eter) sıcaklığa duyarlı hidrojel hazırlanmasında kullanılabilir (Zrinyi vd. 1998). LCST'si insan vücut sıcaklığından daha düşük olan polimerler, enjekte edilebilir polimer uygulamalarda kullanılabilir (Prabaharan vd. 2006).

Pozitif olarak sıcaklığa duyarlı hidrojeller, UCST değerine sahiptirler. Bu hidrojeller, UCST'nin üstünde şişerken, UCST'nin altına soğutulularak büzülürler. Poliakrilik asit ve poliakrilamid polimerlerin ağları pozitif sıcaklığa duyarlılık gösterebilirler (Gil vd. 2004).

Çalışmalarda sıcaklığa duyarlı sentetik hidrojeller, poli (etilen glikol), kitosan, hyalüronik asit, kondroitin sülfat, aljinat, selüloz ve dekstran gibi çok sayıda polisakkarit ile konjuge edilerek birarada kullanılmaktadır. Bu kombinasyonlar da yeni hidrojeller geliştirmek için olanak sağlamaktadır (Klouta 2015, Koetting vd. 2015).

2.3.2 pH'a duyarlı hidrojeller

pH'a duyarlı hidrojellerin yapısında, asidik (karboksilik asit, sülfonik asit gibi) veya bazik (amonyum tuzları gibi) gruplar bulunmaktadır. Sulu ortamda ve uygun pH değerinde proton alınmakta veya verilmektedir. Yapısındaki gruplar sayesinde, ortamın pH değişimine bağlı olarak şişme ya da büzülme davranışı gösterirler (Peppas vd. 2000).

pH'a duyarlı hidrojeller, kontrollü salım uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, katyonik hidrojeller, mide pH'ında şişme davranışı gösterdikleri için, mideye hedeflenmiş olan etkin madde salımında tercih edilirler. Anyonik hidrojeller ise yüksek pH'ya sahip alt sindirim bölgesine etkin maddeyi hedeflemek için kullanılmaktadır.

Çizelge 2.6 pH'a duyarlı hidrojellerdeki fonksiyonel gruplar

Tür	Monomer	pH'a duyarlı grup
Anyonik	Akrilik asit, Metakrilik asit	- COOH
	Sodyumstirenstülfonat	- SO ₃ Na ⁺
	Sülfoksietilmetakrilat	-SO ₃ H ⁺
Katyonik	Aminoetilmetakrilat	-NH ₂
	N,N'-dimetilaminoetilmetakrilat	-N(CH ₃) ₂
	N,N'-dietilaminometakrilat	-N(CH ₂ CH ₃) ₂
	Vinilbenziltrimetilamonyumklortür	-N(CH ₃) ₃ ⁺ Cl ⁻
	Vinilpiridin	-N(CH=CH ₂)

2.3.3 Elektrik alana duyarlı hidroojeller

Elektrik alana duyarlı hidroojeller, elektrik akımına tepki olarak özelliklerini değıştirirler. Bu sistemler şişen ve büzülen hidrojel türü olarak araştırılmıştır (Mantha vd. 2019). Elektrik alana duyarlı hidroojellerde, pH'a duyarlı hidroojeller gibi polielektrolitler kullanılmaktadır. Elektroaktif hidroojellerin geliştirilmesi için polivinil alkol veya akrilik asit/sülfonik asit gibi sentetik polimerler; aljinat, hyalüronik asit ve kitosan gibi doğal polimerler yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda elektrik alana uyarlı doğal ve sentetik polimerler birlikte kullanılabilir (Ghadban vd. 2016, Satarkar vd. 2008).

2.3.4 Manyetik alana duyarlı hidroojeller

Manyetik alana duyarlı jellere 'ferrojel' denir. Ferroojeller, hem manyetik hem de elektrik alana duyarlıdır. Manyetik alan, hareket eden elektrik yükleri tarafından veya temel parçacıklar tarafından üretilmektedir ve en genel şekilde hareket eden elektrik yüküne etki eden Lorentz kuvveti ile tanımlanmaktadır. Oluşan manyetik alan ise hidroojelin hareketini ve şeklini kontrol etmektedir (Filipcsei vd. 2000).

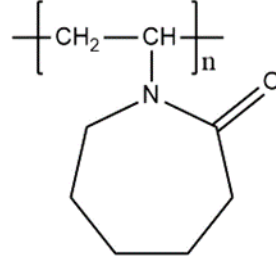
Manyetik alana duyarlı hidroojeller, yapılarında nano boyutta manyetik partiküller içerirler ve bunlarda pek çok yolla sentezlenebilmektedirler. En yaygın kullanılan nanoparçacıklar ise demir içeriğı olanlardır. Sentezlenen nanoparçacıklar, uyarı-cevap hidroojellerinin içerisine yerleştirilirler ve çalışmalarda taşıyıcılar olarak kullanılırlar. Hedeflenen bölgeye manyetik alan uygulandığında, nanoparçacığın içinde yüklü olan biyomoleküllerin salımı, açma/kapama sistemi ile gerçekleştirilmiş olur. Manyetik alana duyarlı hidroojeller içerdikleri nanoparçacıklardan dolayı avantajlıdırlar ve çalışmalarda tercih edilmektedirler. Çünkü nanoparçacıklar, terapötik ilaçların hedef dokulara daha iyi geçmesini sağlar. Aynı zamanda içerdikleri etkin maddenin salımını kontrol altında tutarak uzun süreli etki sağlamaktadırlar. Bu hidroojeller uygulanan manyetik alana karşı şişme, büzülme veya bükülme/eğilme davranışı gösterebilirler. Kontrollü ilaç salım sistemleri, manyetik ayırma, enzim immobilizasyonu ve yapay kas gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır (Heim vd. 2008).

2.3.5 Glikoza duyarlı hidrojeller

Glikoza duyarlı hidrojeller, insülin salım sistemleri olarak kullanılmaktadır (Chu vd. 2004). Bu amaçla kullanılan enzimlerden biri glikoz oksidazdır ve glikozun oksidasyonunu katalizler (Eslahi vd. 2016). Diyabetik hastalarda kan şekeri seviyelerinin daha iyi kontrol edilebilmesi için bu alandaki araştırmalar artmıştır (Mantha vd. 2019). İndirgenmiş durumdaki anyonik yük, hidrojelde osmotik basıncı indükler ve sonuç olarak hidrojelin şişmesine neden olur (Podual vd., 2000). İnsülin salımı sonrası şeker seviyeleri düştüğü için pH artışı gözlenir ve buna bağlı olarak insülin salımı durur (He vd. 2011).

2.4 Poli N Vinil Kaprolaktam (PNVCL)

Sıcaklığa duyarlı polimerlerden, son yıllarda biyouyumlu olması nedeniyle tercih edilen poli(N-vinilkaprolaktam) (PNVCL)'dir. PNVCL'nin karakteristik özelliği, vücut sıcaklığına yakın (30-50°C) düşük faz geçiş sıcaklığına (LCST) sahip olmasıdır. Bu sıcaklığın üstündeki sıcaklıklarda, polimerin mikroyapısında hidrofilik durumdan hidrofobik duruma hızlı bir faz geçişi gerçekleşir (sol-jel) ve uyarıya bağlı tersinir davranışlar (şişme/büzülme, açma/kapama vb.) gösterir (Marsili vd. 2021). LCST'nin üzerinde polimerle çevresindeki çözücü arasındaki hidrojen bağları kırılır ve etkin hidrofobik etkileşimler sonucu jel yapı oluşur. Sıcaklık düşürüldüğünde polimerin hidrofilik karakteri baskın olur ve hidrojen bağları tekrar oluşur, sıvı forma tersinir geçiş sağlanır (Ramos vd. 2012). Sıcaklığa duyarlı enjekte edilebilir hidrojel olarak PNVCL'nin ayarlanabilir mekanik özelliklere ve hızlı yanıtı sahip olduğunu, kırıldak doku onarımı için uygulama potansiyeline sahip bir polimer olduğu belirtilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı PNVCL'nin ılıman koşullarda hücre enkapsüle edilebilmesi ve vücut sıcaklığında enjekte edilebilir ideal bir biyomalzeme olabileceği çalışmada gösterilmiştir (Sala vd. 2017).



Şekil 2.7 Sıcaklığa duyarlı sentetik poli(N-vinilkaprolaktam)

Son yıllarda PNVCL'nin, farklı polimerlerle konjugasyonu ve hibrit hidrojel yapıları üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Yapılan bir çalışmada, karboksimetil selüloz (CMC) ve sentetik sıcaklığa duyarlı poli(N-vinil kaprolaktam) (PNVCL) hibrit hidrojeli, monomeri olan N vinil kaprolaktam (NVCL)' dan, radikalik reaksiyonla tersiyer-bütill hidroperoksit (TBHP) başlatıcısı kullanılarak elde edilmiştir (Kumar vd. 2018). Ancak yaygın olarak kullanılan radikalik sentez yönteminin bazı dezavantajları bulunmaktadır, bunlardan bazıları monomerin (NVCL) polimerleşmesi, karboksimetil selüloz üzerine konjugasyonu aynı anda gerçekleşmesi nedeniyle çok farklı moleküler ağırlığa sahip hibrit yapıların oluşabilmesi ve bunların belirlenmesi için de ayrı bir ayırma ve saflaştırma yöntemi kullanımının gerekmesidir. Ayrıca, konjuge polimerizasyon (hibridizasyon) olmadan, ortamda sadece homopolimerlerin de bulunabilmesi ihtimali bulunmaktadır ve sentez boyunca ortamda kalan fazla miktardaki radikalik yapıdaki monomerler toksik özellikte olabileceği gibi, yapıdan uzaklaştırılmaları içinde birden fazla saflaştırma tekniğine ihtiyaç duyulabilmektedir. Artan karboksimetil selüloz konsantrasyonunda aktif radikallerin hareketinin kısıtlandığı ve artan NVCL konsantrasyonun çapraz bağlanmayı artırmasına karşın, radikalik tepkimenin hızlı sonlanması nedeniyle monomerin polimere dönüşüm yüzdesinin azaldığı belirlenmiştir (Kumar vd. 2018). Bu durumda hibrit hidrojin sentezinde, çeşitli parametrelerin ve ürünlerin kontrolünün yapılmasının gerekliliği açıktır. Bu nedenlerle, son yıllarda literatürde PNVCL'ye dayalı hibrit hidrojel geliştirilmesi için sentez yöntemlerinde klasik radikalik sentezden farklı uygulamalar tercih edilmektedir.

Radikalik tepkimelere alternatif olarak, polimerik yapıları fonksiyonlandırarak (-COOH, -NH₂, -SH vb.) ve çeşitli kimyasal sentez yöntemleri kullanarak, sıcaklığa duyarlı

hidrojel ve biyouyumlu malzeme geliştirilmesi ile ilgili çalışmaların sayıları artmaktadır. Prabakaran ve grubu ilaç salım sistemi olarak sıcaklığa duyarlı PNVCL'yi kitosan üzerine aşılayarak PNVCL-g-kitosan kopolimerini sentezlemişlerdir. Bu konjugasyon için öncelikle fonksiyonel karboksilik asit grubuna sahip PNVCL-COOH polimerini sentezlemiş ve doğal polimer kitosana ait NH₂ gruplarını kullanarak konjugasyon (NHS/EDC) sağlanmıştır. Elde edilen biyomalzemeden kitosan/sıcaklığa duyarlı PNVCL küreleri oluşturulmuş ve hem ortamın pH derecesine, hem de ortam sıcaklığına duyarlı salım gerçekleştirilmiştir. İnsan endotel hücre dizilerine karşı sitotoksikite göstermediği MTT testi ile kanıtlanmıştır (Prabakaran vd. 2008). Liu ve arkadaşları, fonksiyonel sıcaklığa duyarlı PNIPAAm-COOH polimerini sentezlemiş ve etilendiamin (EDA) ile polimerde fonksiyonel amino grubu (PNIPAAm-NH₂) oluşturmuştur. Sonrasında ise doğal alginat polimerine ait -COOH grupları arasında konjugasyonla (EDC/NHS) Alg-g-PNIPAAm kopolimerini sentezlemiştir (Liu vd. 2017).

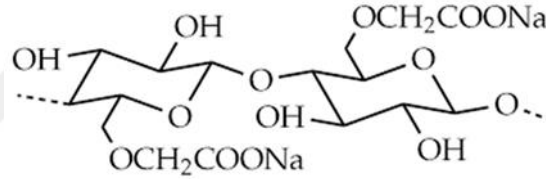
Fonksiyonlandırılan PNVCL'ye dayalı çeşitli hibrit hidrojel çalışmaları çalışma grubumuz tarafından gerçekleştirilmiş ve sonuçlar bilimsel dergilerde yayınlanmıştır (Durkut vd. 2020; Durkut 2019; Durkut vd. 2017). Sentezlenen hibrit hidrojellerden önceden hazırlanan iskeleler (membran, disk, mikroküre vb. yapılar) oluşturulmuştur.

2.5 Karboksimetil Selüloz (CMC)

Karboksimetil selüloz (CMC), FDA (Reza vd. 2010) onaylı, selülozun suda çok iyi çözünebilen anyonik eteridir (Şekil 2.8). Karboksimetil selüloz (CMC), hidroksil gruplarının H atomlarının karboksimetil grupları (-CH₂COOH) ile değiştirildiği eter türevi bir selülozdur ve D-glukoz ve D-glukopiranoz-2-O-(karboksimetil)-monosodyum tuzunun beta-1,4-glukozidik bağlarla bağlanmasıyla oluşturulmuş yarı sentetik bir polimerdir (Pushpamalar vd. 2006). CMC, alkali-katalizli bir reaksiyonla, selüloz ve kloroasetikasit arasında kontrollü koşullar altında elde edilmektedir (Dahlan vd. 2018). Selülozun yapısındaki hidroksil gruplarının (-OH), karboksimetil gruplarıyla (-CH₂COOH) yer değiştirmesi ile, çözünürlüğü ve kararlılığı artmıştır. Ayrıca hidrofilik anyonik polimer olan karboksimetil selüloz (CMC), yapısındaki hidroksil ve karboksilik asit grupları nedeniyle diğer polimerlerle tepkime vermeye yatkındır ve su molekülleriyle

hidrojen bağı verme arttığı için su tutma kapasitesi de yüksektir (Li vd. 2009). Karboksimetil selüloz (CMC) doğada bol bulunabilmesi, ekonomik, suda çözünürlüğü yüksek ve biyouyumlu olması sayesinde çeşitli alanlarda (gıda, kağıt, kozmetik, tekstil, ilaç boya vb.) büyük kullanım potansiyeline sahiptir (Rahman vd. 2021)

CMC karakteristik yüzey özellikleri, mekanik mukavemeti, ayarlanabilir hidrofilikliği ve viskozluğu, ucuz ve bol bulunurluğu ile kolay ve düşük maliyetli sentez süreci nedeniyle çalışmalarda son yıllarda daha da önem kazanmıştır. Biyomalzeme olarak CMC'nin viskoelastik, reolojik, mekanik vb. özellikleri, diğer hidrojeller ile konjugasyonla ve sentez yöntemleriyle ayarlanabilir. Biyomedikal alanda CMC ve kompozitleri, özellikle ameliyat sonrası yapıştırıcı olarak ya da doku mühendisliği gibi alanlarda kullanılmaktadır (Verma vd. 2021, Sharmila vd. 2020).



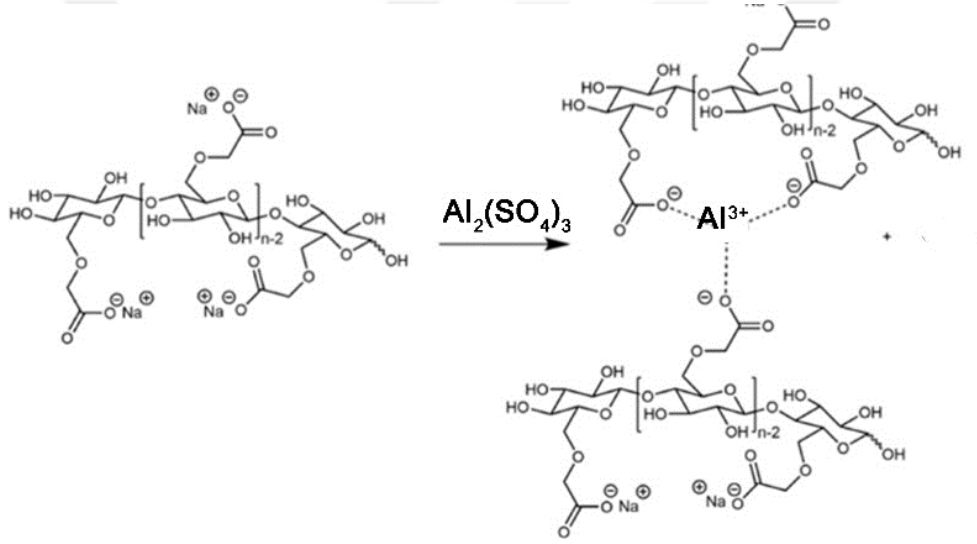
Şekil 2.8 Karboksimetil selüloz (Michaelis vd. 2023)

2.6 Çapraz Bağlayıcılar ile Hidrojel Sentezi

Hidrojellerinin sentezinde, fiziksel ya da kimyasal çapraz bağlanma yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmalarda yaygın olarak kullanılan yöntemler, metal iyonlarla çapraz bağlama (Zhang 2021), radikalik tepkimeler (Park vd. 2018) polimer-polimer konjugasyonu ve küçük çapraz bağlayıcı moleküllerin eklenmesidir (Varma vd. 2014). Bu yöntemlerde çapraz bağ oluşumu, kimyasal bağlarla olmakta tersinmez olarak kalıcı hidrojeller elde edilmektedir.

2.6.1 Metallerle çapraz bağlama

Hidrojellerin hazırlanmasında en çok kullanılan yöntemlerden biri metal iyonlar ile çapraz bağ oluşumudur ve genellikle çok değerlikli metal iyonları kullanılır (Zhang 2022). Polimer zincirlerinin çapraz bağlanmasında metal-ligand koordinasyon bağları veya kompleksleri oluşturulur. Özellikle demir (Fe^{3+}) ve alüminyum (Al^{3+}) gibi 3+ değerlikli katyonik metal iyon türleri, CMC'ye ait anyonik karbonik asit (COO^-) grupları ile aralarında bol miktarda çapraz bağlanma bölgeleri oluşturularak hidrojel yapıları oluşturulur (Şekil 2.9). Oluşan hidrojel suda çözünmez ve su molekülleri ağ yapısı içerisinde tutuklanır.



Şekil 2.9 CMC'nin metal iyonları ile jel oluşumu

2.6.2 Radyasyonla çapraz bağlama

Radyasyon çapraz bağlanmasında, gama (γ) ışınları, çözücü ve monomer tarafından absorpsiyonu ile radikaller oluşturur ve doğrusal polimerlerin ana zincirleri arasında kimyasal bağların oluşumunu ifade eder. Bu yöntem polimer zincirlerinin çapraz bağlanmasında ve modifiye edilmesinde kullanılır.

Radyasyonun türü ve şiddeti önemlidir. Bu yöntemde, bir çapraz bağlama maddesinin eklenmesini önleyerek, yalnızca reaksiyonun karmaşıklığını ve yan ürünlerin üretimini

azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda elde edilen hidrojinin toksik olmamasını da sağlar. Bununla birlikte, radyasyon çapraz bağlama yöntemi, birkaç dezavantajı (malzemelerin bazı fizyolojik özelliklerini bozabilir veya diğer kontrol edilemeyen faktörler vb.) olduğu için yaygın olarak kullanılmamaktadır.

Modifiye CMC ve akrilik asiti kullanarak serbest radikalik kopolimerizasyon yöntemiyle, pH-duyarlı (CMC-g-AA) hidrojinini sentezlemiştir. Geliştirilen bu hidrojelden, farklı pH zeltiilerinde in vitro insülin salımı araştırılmıştır (Li vd. 2020).

2.6.3 Polimerlerle apraz bağlama- hibrit hidrojel sentezi

CMC hidrojinlerinin başka polimer (doğal ya da sentetik) ile çapraz bağlanma ile ayarlanabilir biyobozunurluk ve kontrol edilebilir reaksiyon koşulları oluşturulabilir. Bu yaklaşım CMC hidrojinleri için en ideal ve gelecek vaat eden sentez yöntemi olarak kullanılmaktadır.

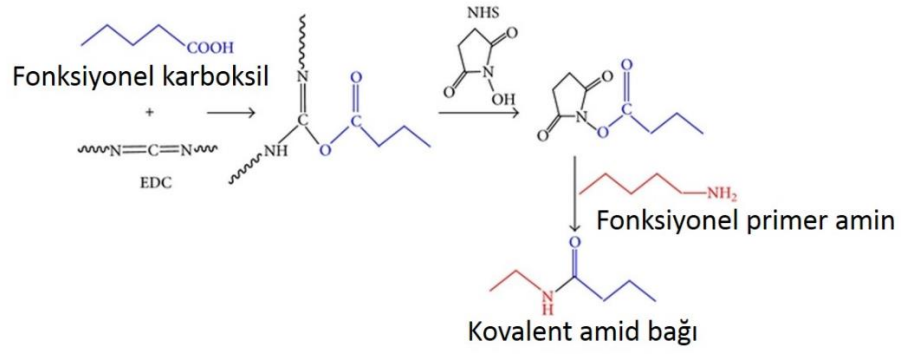
evre dostu, toksik olmayan polimerlerin kullanımı ile yapılan polimerler arası çapraz bağ oluşumu (polimerlerin kopolimerleştirilmesi) kullanılarak elde edilen CMC hidrojinleri, hem kullanılan polimerlere ait istenilen özelliklere sahip olup hem de iyi bir biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahiptir ve gelecekteki biyomedikal biyomalzeme uygulamalarında potansiyele sahiptir.

CMC hidrojinleri genellikle süper emicidir ve biyogvenliği yüksektir. Ancak mekanik dayanımlarının düşük olması nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Bu eksikliklerin üstesinden gelmek için Shin ve ark. Çift apraz bağlama stratejisi yoluyla yeni inter-penetrant polimer ağ (IPN) hidrojinlerini sentezlemek için biyoyumlu bir doğal polisakkarit, bakteriyel sksinoglikan (SG) kullanılmıştır. Bu yeni SG/CMC IPN hidrojinleri, CMC hidrojinlerinin süper emici özelliğini korurken yüksek mekanik güç sergiledi. Ayrıca, SG/CMC hidrojinleri pH tepkili ilaç salımı sergiledi ve HEK-293 hücrelerine sitotoksosite göstermediği belirtilmiştir (Shin vd. 2021).

2.6.4 Küçük çapraz bağlayıcı ajanlar

Hibrit hidrojel sentezinde, küçük molekül ağırlıklı çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak kimyasal konjugasyon yaygın olarak kullanılmaktadır. Çapraz bağlayıcılar, en az iki fonksiyonel gruba (örneğin, birincil sağlayan aminler, sülfhidriller, karboksilik asitler vb.) sahip moleküllerdir ve polimerik zincirler arasında kovalent bağları oluştururlar (Parhi 2017). Çapraz bağlama için yaygın olarak kullanılan kimyasallara örnek olarak, glutaraldehid, oksalik asit, formaldehid, glioksal ve genipin verilebilir (Sapula vd. 2023). Bu tür çapraz bağlayıcılar kullanılarak, hibrit hidrojin bazı fiziksel özellikleri (mekanik dayanım, termal duyarlılık ve su tutuculuk vb.) geliştirilebilir. En çok kullanılan çapraz bağlayıcı olan glutaraldehid ve glioksal, dialdehid yapısındadır ancak toksik olması ya da mutasyon gibi önemli dezavantajlara sahiptirler.

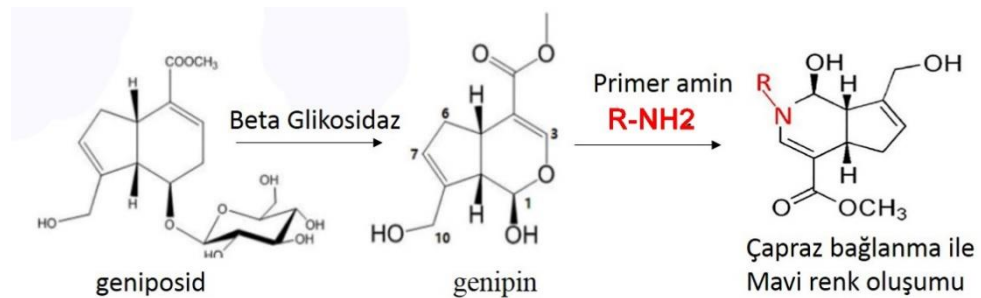
Hibrit hidrojel sentezinde, oldukça etkili, sıfır uzunluklu çapraz bağlayıcı olan 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), yaygın olarak kullanılmıştır. Konjugasyonlar için en uygun sıfır uzunluklu çapraz bağlayıcıdır ve yapılarında $C=N=C$ fonksiyonel grup olarak bulunur. Suda kolay çözünür olması, ılıman koşullarda çapraz bağ yapması, biyouyumlu ve ucuz olması önemli avantajlarıdır. Fonksiyonel karboksil gruplarını ($-COOH$) birincil aminlere ($R-NH_2$) bağlamak ve kovalent amid bağı ($O=C-NH_2$) oluşturmak için doğrudan ve etkili konjugasyon tekniğidir. EDC önce serbest karboksil grupları ile aktif bir ester ara ürünü oluşturur, daha sonra birincil amin gibi güçlü bir nükleofil ile konjugasyon gerçekleşir. N-hidroksisüksinimit (NHS), karboksilik asit gruplarını etkinleştirmek için EDC ile birlikte kullanılır ve hidrolizi önleyerek çapraz bağlama reaksiyonunun etkinliğini artırır (Adamiak ve Sionkowska 2020).



Şekil 2.10 EDC/NHS ile kovalent amid bağı oluşumu

Karboksimetilselüloz (CMC) ile sentetik karboksimetil poli(vinil alkol) (CMPVA) ile adipik dihidrazit çapraz bağlayıcı kullanılarak hibrit hidrojel sentezlenmiş ve ilaç salım sistemi ve doku mühendisliğinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Dahlan vd. 2018).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, doğal bir çapraz bağlayıcı olan genipin kullanımı yaygınlaşmıştır. Genipin, *Genipa americana* L. meyvelerinde bulunan geniposid'in ekstraksiyonu ve sonrasında enzimatik hidrolizi ile elde edilen doğal bir çapraz bağlayıcıdır (Chiono vd. 2008). Düşük toksistiteye sahip olması ve spesifik çapraz bağlama yeteneği sayesinde günümüzde önemli bir molekül haline gelmiştir. Genipin yapısında serbest birincil amino grupları taşıyan polimerler ile (kitosan, kollajen, jelatin vb.) reaksiyona girer ve mavi renkli hidrojel oluşturur (Dimida 2015).



Şekil 2.11 Çapraz bağlayıcı genipin ile tepkime ve renk oluşumu

Genipin özellikle doku mühendisliği alanında kolajen bazlı biyomalzemelerin sentezinde, kontrollü ilaç salım sistemlerinde biyomedikal malzemelerin üretiminde, enzim immobilizasyon uygulamalarında çapraz bağlayıcı olarak kullanılmaktadır (Oustadi vd. 2020, Kaufmann vd. 2022).

2.6.5 Çoklu (Çift) çapraz bağlı hidrojeller

Hidrojellerin kararlılık ve mekanik mukavemetini artırmak için, hidrojellerin hazırlanmasında, iki ya da daha çok çapraz bağlanma yöntemlerinin kullanılmasıyla oluşturulan biyomalzemeler üzerine çalışmalar artmıştır (Gong vd. 2003). Hidrojel oluşumunda kullanılan metallerle iyonik çapraz bağlama ile hızlı jelleşme sağlanır, ancak oluşan çapraz bağlanma genellikle tersiniridir ve kovalent bağlardan daha az kararlıdır. Bu dezavantajın üstesinden gelmek ve daha kararlı polimerik ağ yapısı oluşturmak için kovalent çapraz bağlanmaya ihtiyaç duyulabilir. Kovalent çapraz bağlanma için ise polimerik yapıların kimyasal olarak fonksiyonlandırılması gerekir (Jeon vd. 2009). Hidrojel sentezi sırasında kullanılan çoklu iyonik ve kovalent bağların oluşumu ile biyoboznurluk, jelleşme süresi, sertlik, gözenek büyüklüğü ve mukavemet ayarlanarak kontrol edilebilir (Choi vd. 2021, Trujillo vd. 2021).

2.7 Hidrojellerin Su Tutuculuğuna Etki Eden Faktörler

Çapraz bağlanma oranı hidrojellerin şişme özelliğini etkileyen en önemli faktörlerdendir. Çapraz bağlanma oranı yükseldikçe daha sıkı ve az gözenekli hidrojel yapıları oluşur. Sonuç olarak oluşan polimer ağ yapısı içerisindeki su moleküllerinin hareketi engellenir ve hidrojelin şişme oranı düşer.

Hidrojellerin su tutuculuğunu, ağ yapısını oluşturan polimerin kimyasal yapısı da etkilemektedir. Hidrofilik grupların bulunduğu hidrojeller, hidrofobik grup içerenlerle kıyaslandığında daha yüksek oranda şişerler. Hidrofobik polimerler, suyun bulunduğu ortamlarda bir araya gelip su moleküllerinin polimerik ağ yapısına girmesine engel olurlar.

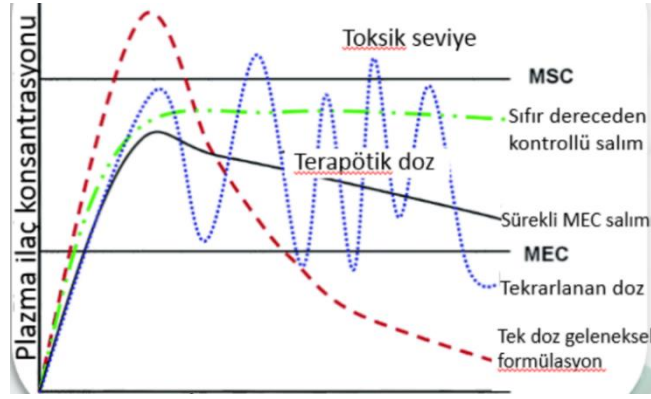
Uyarı-cevap hidrojelleri, çevresel uyarılardan etkilenecek genellikle geri dönüşümlü su tutuculuk göstermektedir. Örneğin, sıcaklığa duyarlı hidrojeller sıcaklık değişimlerinden etkilenir ve sıcaklık faz geçiş sıcaklığının üzerine çıktığında hidrofobik karakter baskın olur ve agregatlaşma nedeniyle su tutuculuk azalır. Faz geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda hidrofilik karakter baskın olur ve molekül içi ve moleküller arası daha fazla su molekülü ile etkileşerek su tutuculukları artar. pH'ya duyarlı hidrojeller ortamına bağlı olarak anyonik ya da katyonik yüke sahip olacakları ve benzer iyonik yüklerin birbirini itmesi sonucunda su tutuculuk özelliklerini değiştirirler (Peppas vd. 2000).

2.8 Uyarı-Cevap Hidrojellerinin Kullanım Alanları

Uyarı-cevap hidrojelleri, sahip olduğu özelliklerinden dolayı ve dış çevre koşullarındaki değişimlere kontrollü bir şekilde cevap verdikleri için biyoteknoloji, biyomühendislik, biyomedikal, biyotıp, eczacılık gibi birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomalzeme ve biyouyumlu özelliğe sahip hidrojeller kontrollü salım sistemlerinde, ilaç taşıyıcı sistemlerde, yapay organlarda, kontakt lenslerde, yara örtülerinde, ameliyat ipliklerinde ve benzer daha pek çok uygulamada kullanılırlar. (Vigata vd. 2020, Dreis 2020, Khan vd. 2018, Municoy vd.2020).

2.8.1 Hidrojellerin ilaç salım sistemlerinde kullanımı

Hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar, çeşitli yollardan (oral, nazal, oküler vb.) vücuda alınmaktadır. Klasik ilaç kullanım yollarında çok çeşitli problemler vardır ve bu problemlerin giderilmesi için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bir ilaç salım sistemi, aktif ilacın doğru zamanda, uygun konsantrasyonda ve yerinde etkili salımını kontrol edebilmelidir (Şekil 2.12) . İlacın kontrollü bir şekilde verilmesi, düşük toksisite, üstün verimlilik, daha iyi hasta uyumu ve geleneksel dozajlara kıyasla uygunluk gibi farklı avantajlar sağlar ve bu nedenle multidisipliner bir yaklaşım içerir (Barik vd. 2019). Hidrojeller, biyoaktif moleküllerin difüzyonunu kontrol edebildikleri için ve sahip olduğu birçok benzersiz özellikleri sebebiyle ilaç salım uygulamalarında tercih edilmektedir.



Şekil 2.12 İlaç salım sistemleri

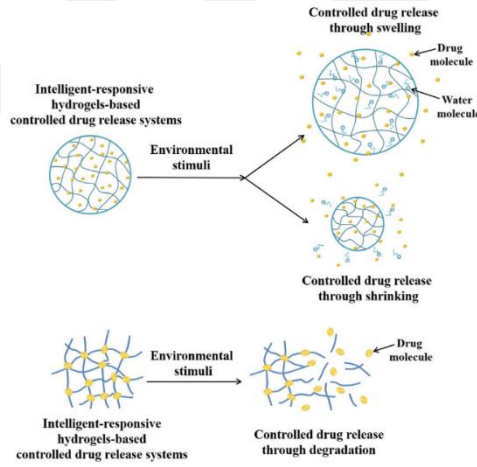
İlaç salımı için en yaygın kullanılan yöntem olan oral uygulama, zayıf hedefleme ve hızlı yıkıma uğraması nedeniyle kısa dolaşım süreleri ile sınırlıdır. Çoğu durumda da ilacın sadece küçük bir kısmı etkilenen organa ulaşır. Örneğin, kemoterapide alınan ilaçların kabaca %90'ı etki etmesi istenilen organa ulaşmaz (Barik vd. 2019).

Hidrojellerin boyut, yapı ve fonksiyon bakımından farklı olmaları, onların ilaç salım sistemlerinde nasıl kullanılacağını belirler. Hidrojel salım sistemleri büyüklüklerine göre, makroskopik hidrojeller, mikrojeller ($\sim 10 \mu\text{m}$) ve nanojeller ($10-100 \text{ nm}$) olmak üzere sınıflandırılabilir. Makroskopik hidrojeller, transepitelyal salım ve vücut içine yerleştirme için kullanılırken, mikrojeller oral ve pulmoner salım için uygundur. Nanojeller ise ilaçların sistemik uygulaması için uygundur (Li vd. 2016). Hidrojelden ilaçların yüklenmesi ve salınması, hidrojin doğasına bağlı olan bir mekanizma içerir. Hidrojin çapraz bağ yoğunluğu ayarlanarak, jelin gözenekli yapısı değiştirilebilir ve ilaçlar da bu gözeneklere yüklenebilir (Barik 2019).

Hidrojellere ilaç yüklemesi genel olarak iki yöntemle yapılabilir. Birincisi; hidrojin polimerizasyonu sırasında, monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve ilacı beraber karıştırarak yükleme yapılır. Böylece, ilaç hidrojel matriksine iyice yerleşmiş olur (Song vd. 1981). İkinci yöntem ise, oluşturulmuş hidrojel uygun bir ilaç çözeltisinde dengeye gelinceye kadar şişmeye bırakılır ve sonrasında ilaç yüklenmiş hidrojel kurutulmaktadır. Uygulandığında ise, vücut sıvılarıyla karşılaşarak tekrar şişmekte ve yüklenen ilaç salımı

gerçekleştirilmektedir. Polimerizasyon koşulları ilacın özelliklerini etkileyebileceğinden, ikinci yöntem daha avantajlıdır (Kim vd. 1992).

Hidrojellerden ilaç salım mekanizmaları difüzyon kontrollü, kimyasal kontrollü ve şişme kontrollü sistemler olarak üçe ayrılabilir. Difüzyon kontrollü sistemler en kabul edilebilir ve ilaç salımını açıklamada en yaygın kullanılan mekanizmadır. Bu sistem Fick'in difüzyon yasasını takip eder (Rizwan vd. 2017). İlaç moleküllerinin salımı çapraz bağlı polimer zinciri tarafından engellenir ve sonuçta difüzyon katsayısı azalır. Kimyasal kontrollü sistemlerde, kütle ve yüzey bozulması olaylarıyla meydana gelir ve ilaç difüzyonla dış çevreye salınır. Bu sistemin avantajı, salımdan sonra hidrojelın kaldırılması gerekli değildir (Ranade vd. 1990). Bir diğer yol ise, ilaç polimer zincirine enzimatik bağ ile bağlanmıştır ve ilacın salımı bağın bozulma oranı ile kontrol edilir.



Şekil 2.13 Uyarı cevap hidrojellerinden ilaç salımı

Şişme kontrollü sistemlerde, ilacın difüzyonu hidrojelın şişmesinden hızlı olduğunda salım gerçekleşir (Siepmann vd. 2012). Şişme davranışı sıcaklık, pH, iyon gücü, ışık ve elektrik alanları dahil olmak üzere çeşitli dış koşullara duyarlı olabilir (Li vd. 2016).

Sürekli salım, gecikmeli/ geciktirilmiş salım ve tekrarlanan salım en yaygın ilaç salım formülasyonlarıdır. Geciktirilmiş salım sistemlerinde, etkin maddenin salımı belirli bir

bölgede olmaktadır. Bu sistem enterik kaplı tabletler için kullanılır. Örneğin, asidik mide ortamında ilaç salınmaz, hafif bazik bağırsak ortamında ilaç serbest bırakılır. Sürekli salım sistemlerinde, ilaç taşıyıcı matrikse tutunur ve bunun küçük bir kısmı midede salınır, geri kalan kısmı da bağırsakta kontrollü bir şekilde salınır. Tekrarlanan salım sistemlerinde ise, uygulanan dozaj içerisinde etkin maddenin birden fazla dozu bulunmaktadır ve bu dozlar belirli zaman aralıklarında salınırlar.

Sıcaklığa duyarlı polimerlerden kontrollü ilaç salım sistemleri etkin şekilde gerçekleştirilebilir. Hastalık (üşütme, iltihaplanma vb.) durumunda, hasta vücut sıcaklığında artma ya da azalma gerçekleşebilir. Bu sıcaklık değişimi ilaç salımını tetikleyici güce sahiptir. Eğer hidrofilik bir ilaç sıcaklığa tepkili bir hidrojel içerisine yüklenmişse, LCST sıcaklığının altında ilacın hidrojel yapıdan diffüzlenererek, salımını artıracığı, eğer hidrofobik bir ilaç yüklenmişse, LCST sıcaklığının üzerinde yapının büzülmesi sonucu ani bir ilaç salımının gerçekleşeceği rapor edilmiştir (Mano 2008).

2.8.2 Hidrojellerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanımı

Uyarı-cevap hidrojelleri, dokulara benzerlikleri, dokular için iskele oluşturma yetenekleri, fiziksel ve mekanik özelliklerinin uygulamaya göre ayarlanabilir olması nedeniyle sağlık ve biyomedikal alanında kullanılmaktadır. İskele, biyomoleküllerin adsorpsiyonu ve protein, büyüme faktörü gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin immobilizasyonu için fiziksel bir yüzey sağlayan üç boyutlu gözenekli katı biyomalzemelerdir.

Bu iskeleler, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta, iskele yapısına biyoaktivite ve özgüllük sağlamada büyük potansiyel gösterir (Mantha vd. 2019).

Doku mühendisliğinde, hastanın hücrelerini yeni dokular oluşturmak için bir iskele ile birleştirerek hasarlı doku veya organların işlevlerini eski haline getirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Hench vd. 2005).

Hastanın hücreleri, in vitro olarak kültürlenebilir ve basit kalıplama tekniği veya biyoyazıcı prosedürleri ile üretilen 3D iskele oluşturmak üzere hidrojel matriksi ile

birleştirilebilir (Sood vd. 2014). Şekil 2.6’da hidrojellerin, doku mühendisliğinde hücre dışı matriks olarak kullanımının akış şeması gösterilmektedir.

Hidrojeller, hücre çoğalmasını ve dokunun yeniden büyümesini destekleyen doğal bir hücre dışı matriks görevi görmektedir. Hücre dışı matriks görevi gören hidrojel, büyüme faktörleri, metabolitler ve diğer materyallerden oluşmaktadır. Görevi ise hücreleri biraraya getirmek ve kaybolan veya hasar gören doğal dokunun yerini almak amacıyla doku yapısını oluşturmaktır.

Doku mühendisliği alanı son 20 yılda önemli ilerlemeler kaydetmiş olsada, iskele tabanlı yöntemlerin sınırlamaları nedeniyle doku ve organların yeniden oluşturulmasında hala önemli bir zorluk bulunmaktadır. Sıcaklığa duyarlı akıllı yüzeyler kullanan ve çeşitli hücre yoğun dokular tasarlayabilen hücre tabaka mühendisliği, geçmişte konvansiyonel yaklaşımları sınırlı olan birçok sorunun üstesinden gelmeli ve rejeneratif tıp için yeni bir temel oluşturmalıdır (Ottenbrite vd. 2010).

Hidrojeller biyomalzeme olarak ilk kez kontakt lens yapımında kullanılmıştır. Poli (hidroksietilmetakrilat), poli (N-vinil pirolidon), poli (metakrilik asit), poli (bütil metakrilat) ve poli (metil metakrilat) kontakt lens yapımında kullanılan polimerlere örnektir (Rizwan vd. 2017).

Sıcaklığa duyarlı hidrojeller, deri doku mühendisliğinde; pH’a duyarlı hidrojeller, ilaç ve protein salımında; glikoza duyarlı hidrojeller, immünoizolasyon cihazlarında ve enjekte edilebilir hidrojeller ise kemik, kırık ve menisküs doku mühendisliğinde kullanılan uyarı-cevap hidrojellerinin uygulamalarına örnek olarak verilebilir (Mantha vd. 2019). Kontrollü ilaç salım sistemlerinde, poli (vinil alkol), poli (metakrilat), poli (N-izopropil akrilamid), selüloz ve kitosan kullanılmaktadır. Poli (vinil alkol), aynı zamanda yapay böbrek, deri ve kırık uygulamalarında kullanılmaktadır (Rizwan vd. 2017).

3. KAYNAK ÖZETLERİ

Yavaş biyoaktif ajan (ilaç, büyüme faktörü vb.) salım uygulamasına yönelik, uyarı cevap hibrit hidrojellerin sentezinde kullanılan yöntemler ve malzeme karakterizasyonu (faz geçiş sıcaklığı, biyobozunuluk, biyoyumluluk vb.) ile ilgili yapılan önemli çalışmalar kısaca özetlenmiştir.

Biyobozunur, biyoyumlu ve nispeten ucuz polisakkarit yapılı polimerler, biyomalzeme kaynağı olarak dikkat çekici yapılardır. Ancak vücut sıvılarında mekanik dayanımlarının zayıf olması nedeniyle geliştirilmelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Biyomalzeme üzerinde yapılan kimyasal modifikasyonlar, diğer polimerlerle aşırı kopolimerleri ve uygun çapraz bağlama teknikleri ile, biyomalzemelere istenilen özellikler (şişme, mekanik dayanım, biyobozunurluk, gözenek büyüklüğü, çevreye duyarlılık vb.) kazandırılabilir. (Nuisin vd. 2022).

CMC hidrojel elde etmede kullanılan fiziksel çapraz bağlama (iyonik ve hidrofobik etkileşimler, agregatlaşma, kompleksleştirme vb.) yöntemleri, ılıman koşullarda, oda sıcaklığında, fizyolojik pH'de yapılmaktadır. Suda çözünen CMC anyonik yapılı $-COO^-$ grupları nedeniyle negatif yüklü bir polimerdir. CMC zinciri üzerindeki iki ya da üç değerlikli katyonlarla (Ca^{+2} , Al^{+3} , Fe^{+3} vb.) fiziksel çapraz bağlı hidrojel oluşturur. Fiziksel çapraz bağlanmaların zayıf mekanik özellikleri nedeniyle yeni strateji daha etkin ve kararlı hibrit hidrojel sentezi yöntemlerinin geliştirilmesidir (Nuisin vd. 2022).

Polisakkarit temelli hidrojel sentezinde, tez kapsamında, CMC, biyobozunur, biyoyumlu olması, su tutuculuğunun yüksek olması, düşük maliyet ve yapısındaki çok sayıda fonksiyonel grupların ($-OH$ ve $-COO^-$) modifikasyonlara uygun olması nedeniyle özellikle seçilmiştir. Ancak CMC'nin zayıf mekanik dayanımını artırmak için, çeşitli çapraz bağlama yöntemleri ve polimerler kullanılarak CMC temelli biyomalzemelerin geliştirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar literatürde yer bulmuştur (Javanbakht vd. 2019)

Uyarı cevap hibrit hidrojellerinin sentezinde mekanik dayanımı nispeten düşük doğal polimerlerin, özellikle ilaç salımı sistemlerinde kullanılmak amaçlı olarak, çevresel tepkilere cevap vermesini sağlayacak sentetik yapılı hidrojellerle çapraz bağlanmaları üzerine çalışmalar son yıllarda önem kazanmıştır. Çapraz bağlanmaları artırmak için etkin yöntemlerden birisi polimerlerin modifiye edilmesidir (Qureshi vd. 2019).

Bu amaç doğrultusunda, tezin ilk bölümünde, polimerlerin fonksiyonlandırılması çalışmaları ile ilgili önemli literatürlerden biri sıcaklığa duyarlı PNVCL'nin karboksillendirilmesidir. Prabakaran ve grubu (2008) sıcaklığa duyarlı karboksil uçlu PNVCL polimerini, monomeri NVCL'nin serbet radikal katılma polimerizasyonu yöntemi ile, başlatıcı, 2,2'-azobisbütironitril (AIBN) ve merkaptopropiyonik asit (MPA) ile DMF çözücü içerisinde 70°C'de 8 saat karıştırarak azot atmosferinde elde etmiştir. Elde etmiş olduğu PNVCL-COOH polimerini, zincir yapısında amino grubu bulunduran kitosan polimeri ile, EDC/NHS çapraz bağlayıcıları kullanarak çapraz bağlamış ve kitosan-g-PNVCL hidrojelini oluşturmuştur. Kimyasal olarak karakterize ettiği bu hidrojelden, sıcaklığa ve pH'ya duyarlı ilaç (ketoprofen) salımını incelemiştir. İlaç yüklü kitosan-g-PNVCL kürelerden 25°C'de ($t < LCST$) daha fazla ilaç salımı gerçekleştiği, bu sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda PNVCL zincirlerinin kitosan üzerine agregatlaşması nedeniyle şişmesini azaldığı ve ilaç salımının buna bağlı düştüğü rapor edilmiştir. Çalışmada sentezlenen yapının sıcaklık ile birlikte ortam pH'sına da duyarlı oluşu, asidik ortamda protonlanan amino gruplarının elektrostatik olarak birbirini itmesi sonucunda şişmenin arttığı ve buna bağlı ilaç salımının da arttığı belirtilmiştir. Ayrıca sentezlenen hidrojin sitotoksik olmadığı insan endotel hücrelerle etkileştirilerek gösterilmiştir. Bu çalışma, sıcaklığa duyarlı polimerler ile çalışmalarda, PNIPAAm'a alternatif olarak, biyoyumlu ve fonksiyonel PNVCL ile çalışmaların artmasında öncü olmuştur.

CMC' nin fonksiyonlandırılması çalışmalarında ise, Janarthanan (2020) ve grubu, CMC zincir yapısında yer alan karboksilat grupları ile, açıl hidrazid (CHZ) grupları arasında karbodiimid çapraz bağlama yöntemi kullanarak fonksiyonel amino uçlu CMC polimerlerini (CMC-CHZ) sentezlemiştir. Fonksiyonel aldehit hiyalüronik asid (HA-mCHO) ile fonksiyonel amino uçlu CMC polimerlerini (CMC-CHZ) aralarında açıl hidrazon bağı ile kimyasal çapraz bağlanmışlardır (HA-CMC). Oluşan hidrojel yapının

oldukça elastik yapıda, mikrogözenekli, biyouyumlu olduğu belirtilmiştir. Sentezlenen HA-CMC hidrojelinden dinamik açıl hidrazon tepkimeleri ile kendiliğinden çapraz bağlanan mikrogözenekli ağ yapılar oluşturulmuş ve özellikle 3D biyoyazıcılarda kullanılmıştır.

Taubner ve grubu (2015), CMC'nin amino grupları ile fonksiyonlandırılmasında, çeşitli kimyasallar (n bütıl amin, etilenamin, etanolamin vb. primer aminler, hidrazin ve hidroksiamin) kullanmıştır. Elde edilen ürünlerin kimyasal yapıları FTIR ile kanıtlanmıştır. Fonsiyonel $-COO$ grupları yerine geçen CMC- NH_2 yapılarının molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarının oluşunu engellemesi nedeniyle daha az rijid ve daha esnek yapılara sahip olduğu rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada, Lee ve grubu (2015), CMC ile adipik asid dihidrazidi (ADH), EDC- HOBt ortamında tepkimesi sonucunda amino uçlu CMC molekülünü sentezlemiştir.

Tezin ikinci bölümünde, CMC temelli hidrojellerinin hazırlanmasında, metal iyonları ile çapraz bağlama, diğer polimerlerle kimyasal çapraz bağlanma ile hem kimyasal hem iyonik çapraz bağlanmaların birlikte kullanıldığı yöntemler literatür bilgilerine göre gerçekleştirilmiştir.

Metal iyonlarla çapraz bağlama yöntemi CMC hidrojellerinin eldesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle kullanılan $Al_2(SO_4)_3$ çözeltisi, biyomalzemelerin hazırlanmasında kullanılan etkin ve düşük toksisiteye sahip çapraz bağlayıcıdır (Bi vd. 2004, Liu vd. 2019). CMC'ye ait çok sayıda $-COO$ grupları ile Al^{+3} iyonları arasında etkin çapraz bağlanmalar olduğunu göstermiş ve iyonik çapraz bağlanan CMC filmlerin suda çözülmediği ve suyu yapısında hapsedtiği belirtilmiştir. CMC jelinin şişme derecesinin CMC konsantrasyonu ve sıcaklıkla arttığı gösterilmiştir.

Literatürde, CMC'nin diğer polimerlerle çapraz bağlanması ile ilgili olarak Lee ve grubunun (2015) yaptığı, CMC'nin, adipik asid dihidrazid (ADH) ve akrilik asid ile fonksiyonlandırılması ve fonksiyonel CMC-akrilat ile diğer fonksiyonel polimer olarak poli(etilenoksit)-tiyol grupları ile kovalent çapraz bağlayarak, CMC-PEO gözenekli

hidrojel filmleri elde edilmesi verilebilir. Sentezlenen malzeme doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere düz kas hücreleri ile etkileştirilmiştir ve hücre canlılığının önemli ölçüde korunduğu belirtilmiştir.

Jung vd. (2021) CMC jelinin mekanik dayanımını artırmak için, doğal polimer olan süksinoglikan (SG) ile iç içe geçmiş polimerik ağ yapı (IPN) hidrojelini Fe^{+3} iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanarak elde etmiştir. CMC ve SG polimer zincirleri üzerindeki hem $-OH$ hem de $-COO^-$ gruplarının Fe^{+3} iyonları ile çift çapraz bağ oluşturarak mekanik dayanımı artırdığı söylenmiştir.

He vd. (2021), çalışmalarında ilk önce alginatı kovalent çapraz bağlayıcı olan gluteralehit (GA) ile sonrasında da iyonik çapraz bağlayıcı olan Ca^{+2} iyonları ile çift çapraz bağlı polimerik ağ yapı oluşturmuşlardır (SA-GA-Ca). Yapıyı oluşturduktan sonra içerisine CMC ilave ederek malzemenin çapraz bağlanmalar nedeniyle azalan su tutuculuğunu artırmayı hem de alginatla yapacağı çok sayıda hidrojen bağları ile mekanik dayanımı artırmayı amaçlamıştır. CMC ilavesi sonucunda yapının su tutuculuğun yaklaşık %20 oranında arttığı ve su kaybının yavaşladığı belirlenmiştir.

Vasile vd. (2004) ise CMC ve sıcaklığa duyarlı poli N isopropilakrilamit (PNIPAAm) polimerlerini kullanarak, harmanlama (CMC/PNIPAAm) ve aşılama (CMC-g-PNIPAAm) yöntemleri ile yeni özelliklere sahip akıllı polimerler sentezlemiş ve özelliklerini karşılaştırmıştır. Çalışmada amino uçlu PNIPAM radikalik yöntemle (APS/AET) elde edilmiş ve hidrofilik CMC polimeri üzerine (EDC/NHS) çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak aşılansmıştır. Harmanlanmış CMC/PNIPAAm yapıları ise eşit oranda karıştırılarak elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlarda, hidrofilik bir polisakkarit olan CMC'nin sıcaklığa duyarlı olmadığı ancak sıcaklığa duyarlı polimerle birleştirildiğinde bu özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. PNIPAAm'nin LCST sıcaklığına yaklaşıldığında, viskozitenin sıcaklıkla düştüğü ve faz geçişi gözlemlendiği görülmüştür. Sıcaklığın yükselmesi ile CMC ile PNIPAM zincirleri arasında polimer içi fiziksel çapraz bağlantılar oluşturduğu belirtilmiştir. Çalışmanın TGA sonuçlarında, harmanlanmış CMC/PNIPAAm yapıların eğrilerinin saf bileşiklerin yapılarından farklı olmasını, yeni bir yapı oluşması ile açıklamışlardır. Aşılansmış örneklerin TGA eğrileri incelendiğinde, termal bozunmada bileşenlerin birbirini etkilediği ve homopolimerlere

göre daha kararsız olabileceği söylenmiştir. Hem sıcaklık artışıyla viskositenin artması hem de aşılama ile hidrojel yapıyı oluşturan her bir polimer zincirin birbirine daha yakın olması sonucunda fiziksel etkileşimlerin daha da arttığı belirtilmiştir. Fiziksel harmanlanmış örneklerde de bu özellik olduğu ancak bunların aşılama örneklerine göre yapının üzerinde etkilerinin daha az olduğu belirtilmiştir.

Bokias vd. (2001) ise, çalışmasında CMC zincirleri üzerine sıcaklığa duyarlı fonksiyonel amino uçlu PNIPAAm yan zincirlerini aşılama yöntemiyle kopolimer yapı oluşturmuştur. Aşı kopolimer CMC-g-PNIPAAm oluşumu ile CMC'ye yeni sıcaklığa duyarlılık özelliği kazandırılmıştır. CMC-g-PNIPAAm aşı kopolimerinin faz geçişinin daha yüksek sıcaklıklara çıkması, çözücü ortamı olan distile suyun iyonik şiddetinin düşük olması nedeniyle, yapıdaki -COO^- grupları arasında elektrostatik itme olduğu ve bu itme ile düzleşen CMC polimer zincirleri ile PNIPAAm zincirleri arasında fiziksel çapraz bağlanmalarının daha yüksek sıcaklıklarda olduğu ile açıklamıştır.

Kumar vd. (2018) sıcaklığa duyarlı PNVCL polimerini doğrudan CMC zinciri üzerine serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile (45°C 'de 2 saatte) kovalent olarak bağlamıştır. CMC, NVCL monomeri ve tersiyer bütill hidroperoksit (TBHP) ile azot atmosferinde doğrudan aşılama tepkimesi gerçekleştirmiş CMC zinciri üzerine PNVCL aşılama (CMC-g-PNVCL). Aşılama veriminin, tepkime ortamının viskositesine ve CMC konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir. PNVCL ile aşılamanın CMC'nin -OH grubu üzerinden gerçekleştiği kimyasal karakterizasyonla gösterilmiştir. Termal analiz sonuçlarında, PNVCL tek basamaklı bozunma eğrisi verirken, CMC-g-PNVCL aşı kopolimeri üç basamaklı bozunma göstermiş ve son basamakta ağırlığının yaklaşık %70 ağırlık kaybını, ikinci basamakta oluşan bozunma ürünleri olan heterosiklik halkanın zincir içi halkalaşan ürünlerine bağlamıştır.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Çalışmada, karboksimetilselüloz (CMC), monomer N vinil kaprolaktam (NVCL), Merkaptopropiyonik asit (MPA), Azobisisobütironitril (AIBN), Etilen diamin (EDA) Sigma'dan sağlandı. Çalışmada kullanılan diğer bütün kimyasallar Alüminyum sülfat ($Al_2(SO_4)_3$), N-hidroksisüksinimit (NHS), 1-Ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), 1-Hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt) Sigma-Aldrich'den sağlandı.

Saflaştırma işlemleri diyaliz membran (Dialysis tubing cellulose membrane flat width 43 mm 20 kD-Sigma) ile distile suya karşı yapıldı. Bütün çalışmalarda ultrasaf su (25° C 20 MΩ'luk) kullanıldı.

Hidrojellerden disk şekilli iskele eldesinde dondurularak kurutulma işlemi için liyofilizatör (Crist Alpha 1,4 LD plus, A.B.D) kullanıldı.

Hücre kültürü için kullanılan besiyerinin hazırlanmasında kullanılan DMEM, FBS ve penisilin Sigma firmasından temin edildi. Hücre canlılığını ve sitotoksitenin belirlenmesinde Alizarin mavisi testi (Sigma) kullanıldı. Hücre kültür çalışmaları 37°C'de, %5 CO₂, % 95 nem ortamını sağlayan inkübatörde gerçekleştirildi (Heracell, A.B.D).

4.2 Yöntem

4.2.1 Hidrojellerin sentezi

Hidrojellerin sentezi ve hazırlanması üç farklı aşamaya ayrılmıştır, (i) polimerlerin fonksiyonlandırılması (ii) sentezlenen fonksiyonel polimerlerin saflaştırılması ve

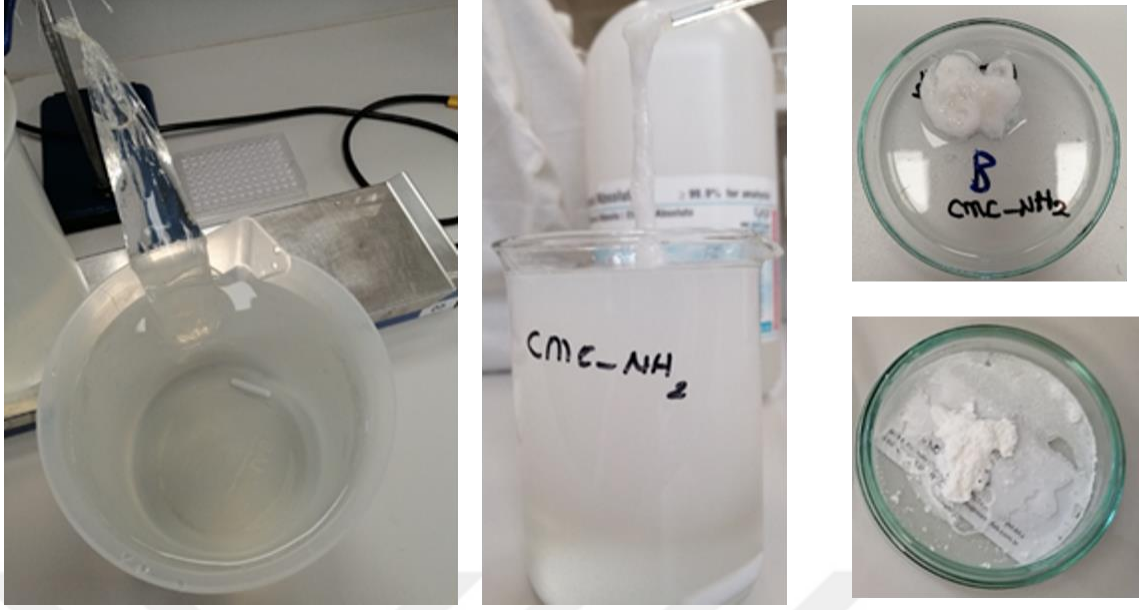
karakterizasyonu (iii) fiziksel ve kimyasal çapraz bağlayıcılar kullanılarak hibrit hidrojenlerin sentezi.

4.2.1.1 Karboksimetil selüloz (CMC)

Karboksimetil selüloz (CMC) % 2, % 2,5 ve % 3 çözeltisi distile suda hazırlandı. Tartımı alınan CMC (distile suda) çözeltisi 1 gece karıştırılarak homojen çözeltisi hazırlandı. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, %2,5 CMC çözeltisi çalışmalarda kullanıldı.

4.2.1.2 Fonksiyonel CMC-NH₂ sentezi

Fonksiyonel amino uçlu CMC (CMC-NH₂) sentezi için, hyaluronik asidin aminolanması (HA-NH₂) için kullanılan yöntemin benzeri kullanıldı (Tan vd. 2011). CMC'nin %1 'lik çözeltisi suda bir gece karıştırılarak hazırlandı. Homojen CMC çözeltisine 4 g EDA eklenerek karıştırıldı ve tamamen çözülmesi sağlandı. Çözelti pH 5 e (1 N NaOH ile) ayarlandı ve 0,8 g EDC ve 0,7 g HOBt, 10 mL DMSO:H₂O (5 mL:5 mL) karışımında çözülerek ilave edildi ve 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Elde edilen homojen çözelti 3 gün distile suya karşı diyaliz (12000 kD diyaliz membran) edildi. İlk gün diyaliz suyu iki kere değiştirilerek tepkimeye girmeyen küçük molekül ağırlıklı kimyasallar uzaklaştırılarak saflaştırıldı. Diyaliz sonunda elde edilen çözeltiye tuz (%5 NaCl) ilave edilerek etanolde çöktürme yapıldı. Çöken polimer toplandı ve distile su ile 3 defa yıkandıktan sonra donduruldu ve modifiye edilen ürün liyofilize edildi. Liyofilize edilen polimer toz haline getirildi.



Şekil 4.1 Fonksiyonel CMC-NH₂ Sentezi

4.2.1.3 Fonksiyonel PNVCL-COOH sentezi

Fonksiyonel karboksilik asit uçlu poli(N-vinilkaprolaktam) (PNVCL-COOH), serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlendi. 5,2 g monomer (NVCL) çözücüsü etanolde (50 mL) çözülüp, daha sonra 285 mikrol zincir transfer ajanı (merkaptopropiyonik asit, MPA) ve 0,05 g başlatıcı (azobisisobütironitril, AIBN) ilave edilerek inert azot gazı altında 70°C'de 8 saat tepkimeye sokularak elde edildi (Prabaharan vd. 2008). Sentezlenen PNVCL-COOH önce NaOH ile tuzu oluşturuldu su/eter karışımında ekstrakte edildi sonrasında tekrar asidik pH ya getirildi ve kurutularak deneylerde kullanıldı.

4.2.1.4 Harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojelinin fiziksel çapraz bağlanması

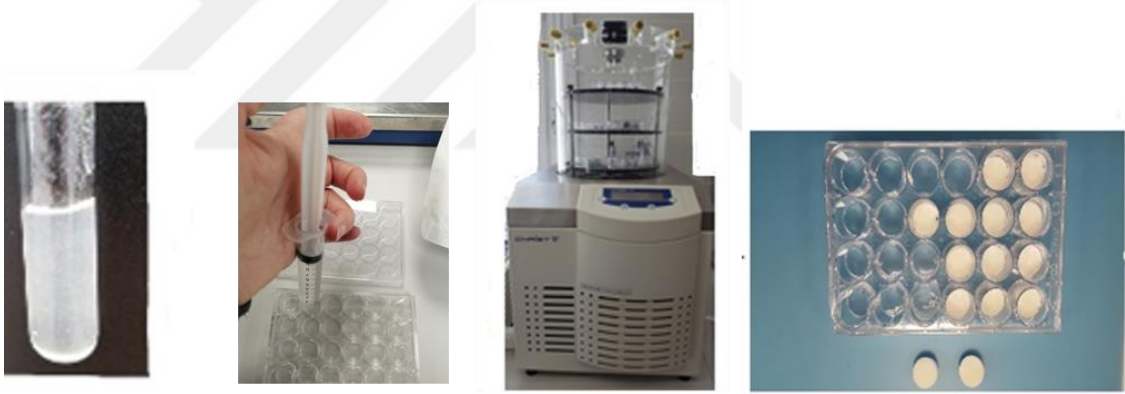
Bu çalışmada, harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojelleri için, önce CMC (küttelece %2,5) çözeltisi, distile suda oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcı ile 1 gece karıştırılarak hazırlanmıştır. Elde edilen CMC çözeltisinin 10 mL'sine 0,5 g PNVCL-COOH ilave edilerek, manyetik karıştırıcı ile 4 saat süre boyunca karıştırılması ile elde edilmiştir.

4.2.1.5 Kimyasal Çapraz Bağlı PNVCL-g-CMCNH₂ hibrit hidrojel sentezi

Fonksiyonlandırılmış CMC-NH₂ polimerinin homojen %3 lük 10 mL çözeltisi (distile suda) hazırlandı ve içerisine 0,5 g (%5) PNVCL-COOH eklenerek karıştırıldı. Homojen karışıma çapraz bağlama ajanları EDC/NHS (0,038 g/0,023 g) 100 mikrol suda çözüldükten sonra eklenerek kopolimerleşme için 4 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.

4.2.1.6 Hidrojellerden disk şeklinde üç boyutlu (3d) iskele elde edilmesi

Hazırlanan homojen hidrojel çözeltileri (CMC, CMC-NH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC, PNVCL-g-CMCNH₂), 10 mL'lik şırıngaya konularak 24 kuyucuklu plak hücre kültürü kaplarına 1 er mL olarak eklendi, -80°C'de dondurulduktan sonra liyofilize edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Hidrojellerin üç boyutlu iskele yapılarının eldesi

Liyofilize edilmiş dört farklı yapıdaki iskeleler, 0,1 M Al₂(SO₄)₃ ve 0,25 M FeCl₃ çözeltisi ile 10 dk etkileştirilip iyonik olarak çapraz bağlanarak, fiziksel çapraz bağlı hidrojel yapı oluşturuldu.

4.2.2 Polimerlerin kimyasal ve termal karakterizasyonu

4.2.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

Sentezlenen hidrojellerin kimyasal yapısı FTIR spektrumları ile aydınlatılmıştır. Bu yöntemin temeli, kimyasal molekülün yapısındaki molekül içi bağlar üzerine düşürülen kızılötesi ışınların, bağların titreşim ve dönme hareketleri ile soğurulmasına dayanır. Moleküldeki farklı bağlar, farklı enerjilerde titreşir ve bu yüzden kızılötesi radyasyonun farklı dalga boylarını emer. Bu durumda yapıdaki fonksiyonel gruplar belirlenir ve kimyasal yapı aydınlatılır. Çalışmadaki hidrojellerin moleküler analizleri Perkin Elmer Spektrum 100 (A.B.D) cihazı ile 650-4000 cm^{-1} aralığını kapsayan bölgede yapılmıştır.

4.2.2.2 Proton Nükleer Manyetik Rezonans (^1H NMR)

NMR organik bileşiklerin yapılarının belirlenmesinde kullanılan en güçlü tekniktir. Proton nükleer manyetik rezonans, moleküllerinin yapısını belirlemek için bir maddenin molekülleri içindeki hidrojen $^{-1}$ çekirdeklerine göre nükleer manyetik rezonansın uygulanmasıdır. Kendi eksenini etrafında dönen yüklü bir tanecik (proton), kendi etrafında manyetik bir alan meydana getirir. Protonların bu davranışı üzerine kurulan NMR spektroskopisine, Proton Manyetik Rezonans denir ve bir moleküldeki proton içeren grupların sayısı ve bu gruba komşu gruplar tespit edilir. ^1H NMR analizleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Lab'ında, Varian Mercury (Agilent) 400 MHz (Palo Alto, CA, USA) cihazı ile oda sıcaklığında D₂O içerisinde çözülerek yapılmıştır.

4.2.2.3 Alt Kritik Çözelti Sıcaklığı (LCST)

Saf ve sentezlenen örneklerin faz geçiş sıcaklıkları (LCST), distile suda belirli konsantrasyonda (%5) hazırlanan çözeltilerin geçirgenlik değerleri, artan sıcaklıkla (20-45°C) 480 nm'de spektrofotometrik (Spectramax M5 microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) olarak belirlendi.

4.2.2.4 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz, bir örneğin artan sıcaklık sonucu oluşan bozunması nedeniyle ağırlık değişimlerini inceleyen bir tekniktir. Sıcaklık artışı ile örnek üzerine fiziksel olarak adsorbe olmuş suyun uzaklaşması veya daha ileri kimyasal bozunmaları sırasındaki ağırlık değişimleri, zamana veya sıcaklığa bağlı olarak termogram eğrileri ile gösterilir. Bu tezde hazırlanan hidrojel yapılarının TGA analizleri, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi'nde, Perkin Elmer STA 6000 (A.B.D.) cihazı ile 30°C-600°C sıcaklık aralığında, 10°C/dk ısıtma hızı ile, hava akımında, 10-20 mg örnek kullanılarak ölçülmüştür.

4.2.2.5 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Yüzey morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla CMC, CMCNH₂, PNVCL/CMC, PNVCL-g-CMCNH₂ hibrit hidrojel iskeleleri staplara yerleştirildi ve altınla-kaplama işlemlerinden geçirildikten sonra, yüksek büyütme değerlerinde (200X ve 500X) görüntü alındı. Örnekler ODTÜ merkez lab'ında bulunan PHILIPS QUANTA 400F Field Emission SEM (A.B.D) taramalı elektron mikroskobunu ile incelendi.

4.2.2.6 Su tutuculuk

CMC, CMC-NH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH₂ disk şeklindeki iskelelerinin su tutuculukları iki farklı sıcaklıkta (4 °C ve 40 °C), önceden belirlenen süreler (1, 6, 12 ve 24 saat) sonucunda gravimetrik olarak analiz edildi. Öncelikle liyofilize edilmiş örnek iskeleler (1 mL) için kuru ağırlıkları (M_{kuru}) belirlendi. Örnekler 6 kuyucuklu kültür kaplarına alınarak 5 mL distile su ilave edildi ve belirlenen süre sonunda alınıp, üzerlerindeki fazla su filtre kağıdı ile uzaklaştırıldıktan sonra, şişmiş örneklerin su tutuculukları belirlendi. (Eşitlik 1).

$$\% \text{ Su tutuculuk} = (M_{\text{Yaş kütle}} - M_{\text{kuru kütle}} / M_{\text{kuru kütle}}) \times 100 \text{ (Eşitlik 1)}$$

Her bir deney, statik koşullar altında üçer tekrarlı gerçekleştirildi.

4.2.2.7 Biyobozunurluk

CMC, CMC-NH₂, PNVCL/CMC harman ve PNVCL-g-CMCNH₂ disk şeklindeki iskelelerinin biyobozunurlukları iki farklı sıcaklıkta (4°C ve 40°C), önceden belirlenen süreler (1, 6, 12 ve 24 saat) sonucunda gravimetrik olarak analiz edildi. Öncelikle liyofilize edilmiş örnek iskeleler (1 mL) için kuru ağırlıkları (M_{kuru}) belirlendi. Örnekler 6 kuyucuklu kültür kaplarına alınarak 5 mL distile su (4°C ve 40°C’de hazırlanmış ve %0,1 penstrep içeren distile su) ilave edildi ve belirlenen süre sonunda örnekler alınarak -80 °C de dondurularak saklandı ve liyofilize edilerek kurutuldu ve işlem sonrası kuru ağırlıkları gravimetrik olarak belirlendi. Biyobozunurlukları Eşitlik 2 ile gravimetrik olarak belirlendi.

$$\% \text{ Biyobozunma} = (M_{\text{ilk kuru kütle}} - M_{\text{bozunmadan sonraki kuru kütle}} / M_{\text{ilk kuru kütle}}) \times 100 \quad (\text{Eşitlik 2}).$$

Her bir deney, statik koşullar altında üçer tekrarlı gerçekleştirildi.

4.2.2.8 İlaç salımı

Sentezlenen uyarı cevap hibrit hidrojelere yüklenen lidokain (lokal anestezi) molekülün sıcaklığa duyarlı olarak salımını belirlemek için, disk şeklindeki iskelelere bir gece önceden 10 mg/iskele olacak şekilde ilaç yüklemesi yapıldı ve buzdolabında bekletilerek, ilaç moleküllerinin iskele içerisine homojen olarak tutuklanması sağlandı. İskeleler 1 saat 4°C ve 40°C’de bekletildikten sonra 2 mL distile su eklenip hemen alınarak yüzeyde kalan ilaç molekülleri toplandı.

Dört farklı hidrojel örneklerine 4°C ve 40°C’de önceden hazırlanmış 3 mL distile su eklendi. Sıcaklığa bağlı olarak gerçekleşen ilaç salımı, belirlenen periyotlarda (0.dk, 30.dk, 60.dk, 180.dk, 24 saat, 48 saat) ortamdan çekilen örneklerden (1 mL), 260 nm’de (Spectramax M5 microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) spektrofotometrik olarak belirlendi (ortama eşit miktarda ve sıcaklıkta distile su eklendi). Herbir örnek için statik koşullar altında üçer tekrarlı gerçekleştirildi. Lidokain standart eğri grafiği kullanılarak salınan ilaç miktarı belirlendi ve sıcaklığa bağlı kümülatif ilaç salımı grafiğe geçirildi.

4.2.2.9 Hemoliz- Kan uyumluluğu

Dört farklı hidrojel iskelelerinin kan uyumluluğu ISO 10993-5:2009 standardına göre incelenmiştir. Örnekler (yaklaşık 1cm boyutunda) öncelikle steril edilme amacıyla UV ışık kaynağında 1 saat bekletildi ve tüplere alındı. EDTA'lı tüp içerisindeki insan kanı PBS ile seyreltildi (1:20) ve her tüpe 2 mL olacak şekilde eklendi. Etkileşimsiz 200 mikrolitre seyreltik kan negatif kontrol (NK) olarak, su ile seyreltilmiş 200 mikrolitre kan pozitif (PK) kontrol olarak kullanıldı. Seyreltik kan ve örnekler 1 saat 37° C'de hafif çalkalama altında inkübe edildi. Sürenin sonunda örnekler çözücü ortamından alınarak, kalan çözelti 1500 rpm 10 dakika santrifüj edildi. Kan uyumlulukları, süpernatantdan 545 nm'de spektrofotometrik (Spectramax M5 microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) olarak belirlendi. Kan uyumlulukları Eşitlik 3 ile hesaplandı.

$$\% \text{ Hemoliz} = (\text{Örneğin Abs.}) - (\text{N.K. Abs.}) / (\text{P.K. Abs.}) \times 100$$

Her bir deney üçer tekrarlı gerçekleştirildi.

4.2.2.10 İndirekt biyouyumluluk testi

Hücre kültürü temelli çalışmalar kapsamında ticari olarak temin edilen insan adipoz mezankimal kök hücreleri kullanılmıştır. Standart besiyerinde kültüre edilen hücreler tripsin- EDTA ile etkileştirilerek pasajlanmıştır. Kültüre edildiği zeminden toplanan hücre süspansiyonu 1100 rpm'de 7 dk ile santrifüj edilerek hücre pelletinin ayrılması sağlanmıştır. 24 kuyucuklu hücre kaplarına 5000 hücre/cm² ekilerek, standart kültür ortamında (DMEM F12, %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 pen-strep) CO₂ inkübatöründe iki gün süresince yaklaşık %70-80 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır.

Örneklerin hazırlanması için, liyofilize edilen hidrojeller (CMC, CMCNH₂ ve PNVCL-g-CMCNH₂) önce 10 dk Al₂(SO₄)₃ ile polimerleştirilmiştir. İskeleler distile su ile (3X10 dk.) yıkanıp ve 4 eşit parçaya ayrılmıştır. Örnekler, içerisinde %70 EtOH bulunan 24 kuyucuklu hücre kaplarına alınarak, 1 saat UV'de bekletilmiş ve 1 gece ETOH'da bekletilmiştir. Örnekler EtOH'ın uzaklaşması için steril PBS ile 3 er kez yıkandıktan

sonra standart vasat ortamı eklenerek 24 saat bu ortamda bekletilmiştir. Örneklerin içinde bekletildiği bu vasat alınarak, hücrelerin bulunduğu hücre kaplarına eklenerek 48 saat hücrelerle etkileştirilmiştir.

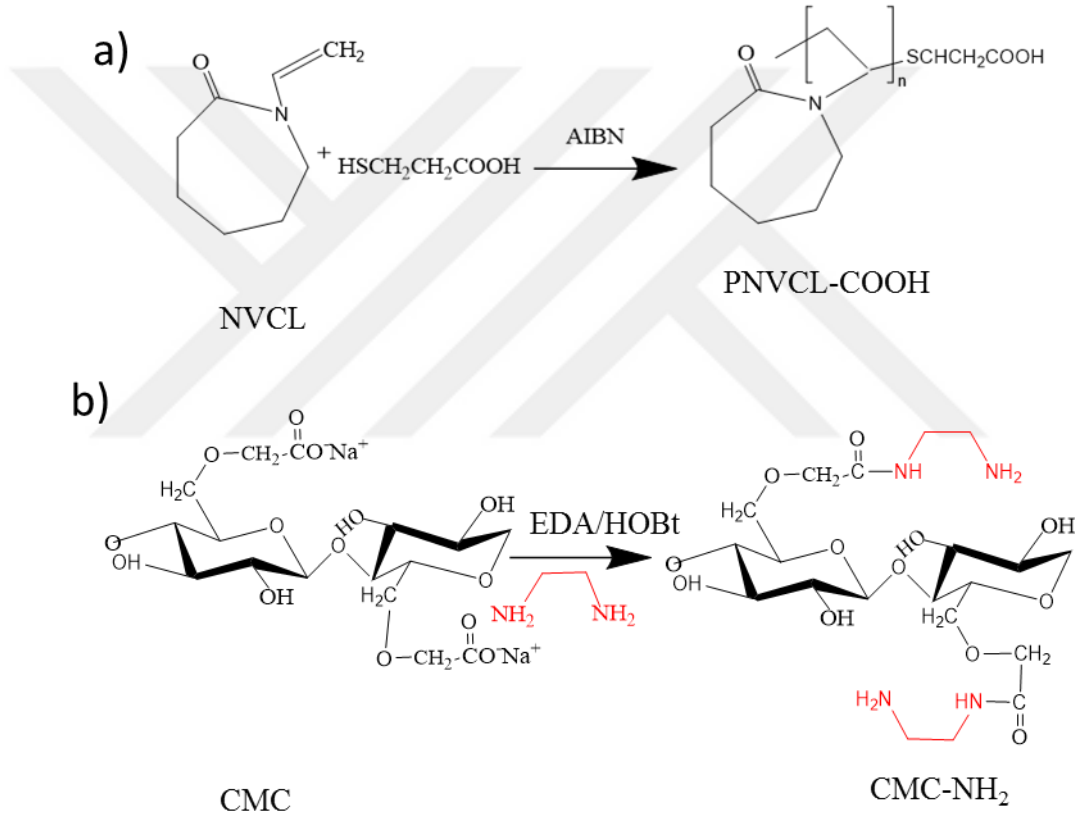
Sürenin sonunda alamar mavisi (resazurin) testi hücre canlılığı protokolleri takip edilmiştir. Alamar mavisi testi, canlı hücreler tarafından resazurin bileşiğinin, resorufin bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Resazurin, oksidatif formda bulunan koyu mavi renkte bir redoks boyasıdır. Ortama ilave edilen resazurin, canlı hücrelerin içerisine nüfuz eder ve indirgenerek floresans özellikteki pembe renkli resorufin bileşiğine dönüşür. Tepkime sonunda oluşan floresans sinyali spektrofotometrik olarak (530 nm’de bir uyarım ve 590 nm’de bir emisyon kullanılarak) tespit edilebilir. Zar yapısı bozulan ölü hücreler metabolik aktivitelerini kaybettikleri için resazurini indirgeyemez ve floresans sinyali oluşturmazlar.

Hidrojel örneklerinin içerisinde bekletildiği vasat alınıp 48 saat hücrelerle etkileştirildikten sonra, her kuyucuğa 1:10 oranında (50 mikrol: 500 mikrol) alamar mavisi (%10) ilave edilip 37°C’de 4 saat süre (37°C, %5 CO₂ ve %95 nem) ile etkileştirilmiştir. Canlı hücreler ile etkileşen alamar mavisi çözeltisi, floresans özellikteki pembe renk oluşturmuştur ve spektrofotometrik olarak ölçümler alınmıştır. Serumsuz taze vasat ortamında kültürlenmiş hücreler negatif kontrol (NK) olarak ve %1 triton X 100 ile işleme tabi tutulan ve canlılığını yitiren hücreler pozitif kontrol (PK) olarak kullanılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1 Fonksiyonel PNVCL-COOH ve CMC-NH₂ Sentezi

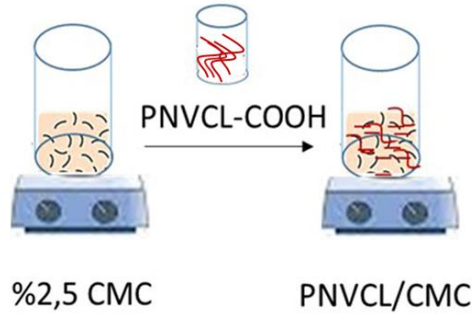
NVCL monomerinden merkaptopropiyonik asit (MPA, HSCH₂CH₂COOH) ile fonksiyonel PNVCL-COOH (Şekil 5.1a) ve CMC'den etilendiamin (EDA, H₂NCH₂CH₂NH₂) ile fonksiyonel CMC-NH₂ (Şekil 5.1b), optimum tepkime koşullarında elde edildi.



Şekil 5.1 Fonksiyonel a) PNVCL-COOH ve b) CMC-NH₂ sentezi

5.2 Harmanlanmış PNVCL/CMC Hidrojel Sentezi

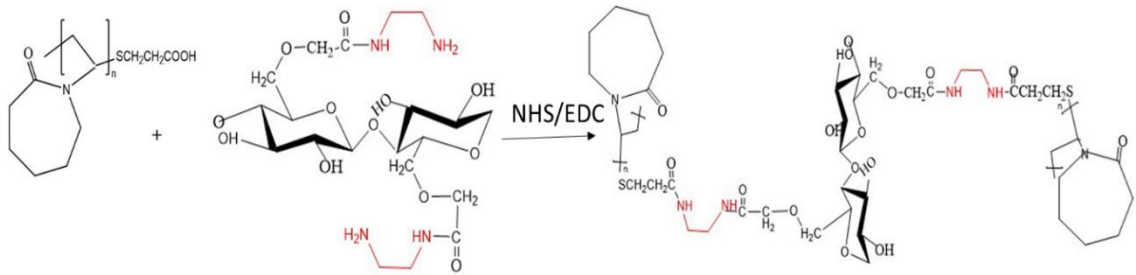
Bu çalışmada PNVCL/CMC hidrojel, 0,5 g sıcaklığa duyarlı PNVCL-COOH polimeri, 10 mL %2,5 CMC (PNVCL: CMC, 2:1) çözeltisine ilave edilerek, manyetik karıştırıcı ile 4 saat oda sıcaklığında karıştırılarak, homojen çözeltisi elde edilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 Harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojel sentezi

5.3 PNVCL-g-CMC-NH₂ Hibrit Hidrojel Sentezi

Fonksiyonel polimerlerinin EDC/NHS ile kimyasal çapraz bağlanması ile oluşturulan hidrojeller homojen yapıda olup, elde edilen iskeleler daha sert, göfret yapılı iskelelere benzer yapılar oluşturmuştur. Fonksiyonlandırılan polimerler hibrit hidrojel vermek üzere tepkimeye sokuldu (Şekil 5.3). Elde edilen fonksiyonel polimerlerin kimyasal yapıları karakterize edilerek belirlendi.



Şekil 5.3 PNVCL-g-CMC-NH₂ hibrit kopolimer sentezi

5.4 Hidrojellerden Üç Boyutlu (3D) İskele Eldesi

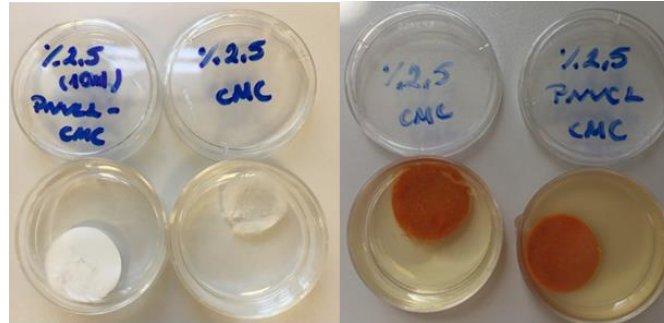
Tezde yer alan hidrojel çözeltilerinin, kalıplanma, dondurma ve sonrasında liyofilize edilmesi ile elde edilen üç boyutlu (3D) iskeleler Şekil 5.4'te verilmiştir.



İskele Türü	Çap (cm)	Yükseklik (cm)	Kuru Ağırlık (g)
CMC	13,57	4,36	~0,0249
CMC-NH ₂	13,74	5,48	~0,0253
Harmanlanmış PNVCL/CMC	13,74	4,64	~0,07
PNVCL-g-CMC-NH ₂ Kopolimer	10,48	3,89	~0,065

Şekil 5.4 Liyofilize edilmiş CMC, CMC-NH₂, PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMC-NH₂ hidrojellerinden hazırlanan üç boyutlu iskeleler

Elde edilen iskeleler iyonik çapraz bağ oluşumu için Al₂(SO₄)₃ ve FeCl₃ çözeltileri ile fiziksel çapraz bağlandı (Şekil 5.5). İskeleler 0,1 M Al₂(SO₄)₃ çözeltileri ile beyaz, 0,25 M FeCl₃ ile kahverengi turuncu renkli hidrojeller oluştu (Şekil 5.5). Daha düşük çözelti konsantrasyonunda iyonik çapraz bağlanma sağlandığı için çalışmalarda, 0,1 M Al₂(SO₄)₃ çözeltisi seçilerek kullanıldı (Nuisin vd. 2022).



Şekil 5.5 Liyofilize edilmiş CMC, harmanlanmış PNVCL/CMC üç boyutlu iskelelerin Al₂(SO₄)₃ ve FeCl₃ çözeltileri ile iyonik çapraz bağlanması

Çözücü ortamına alınan hidrojel iskelelerin biyomalzeme özellikleri (çap, yükseklik, ağırlık vb.) Şekil 5.6 da verilmiştir.



Şekil 5.6 Çözücü ortamında, CMC, CMC-NH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMC-NH₂ hidrojellerinden hazırlanan üç boyutlu iskeleler

Saf CMC ve harmanlanmış PNVCL/CMC yapıları, plastik benzeri ve sert bir yapıya sahipken, CMCNH₂ ve PNVCL-g-CMCNH₂ hidrojelleri yumuşak yapıya sahiplerdi.

5.5 Fonksiyonel CMC-NH₂ içeren hidrojellerin genipinle çapraz bağlanması

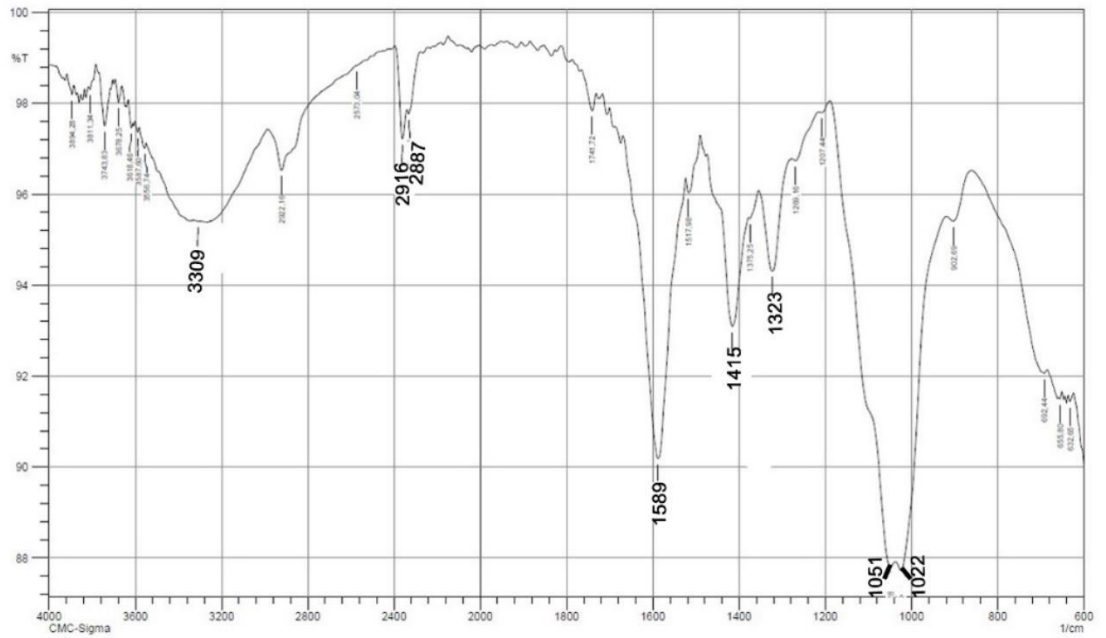
Tezin kapsamında yeni sentezlenen fonksiyonel CMCNH₂ ve PNVCL-g-CMCNH₂ kopolimer örneklerinin çapraz bağlayıcı genipinle vermiş olduğu tepkime sonucunda oluşan mavi renk oluşumu Şekil 5.7’de verilmiştir. Literatürde yapısında serbest amino grubu bulunduran moleküllerle (amino asit, protein vb.) tepkimeye giren genipin’in mavi renk oluşturacağı belirtilmektedir. Tez kapsamında elde edilen hidrojel iskeleler %0,1 genipin çözeltisi ile tepkiye sokuldu ve CMCNH₂ ve PNVCL-g-CMCNH₂ hidrojellerinde gözlenen mavi renk, CMC’nin amino grupları ile fonksiyonlandırılmasının başarılı olduğunu kanıtladı.



Şekil 5.7 Serbest amino grupları içeren örneklerin genipin ile tepkimesi

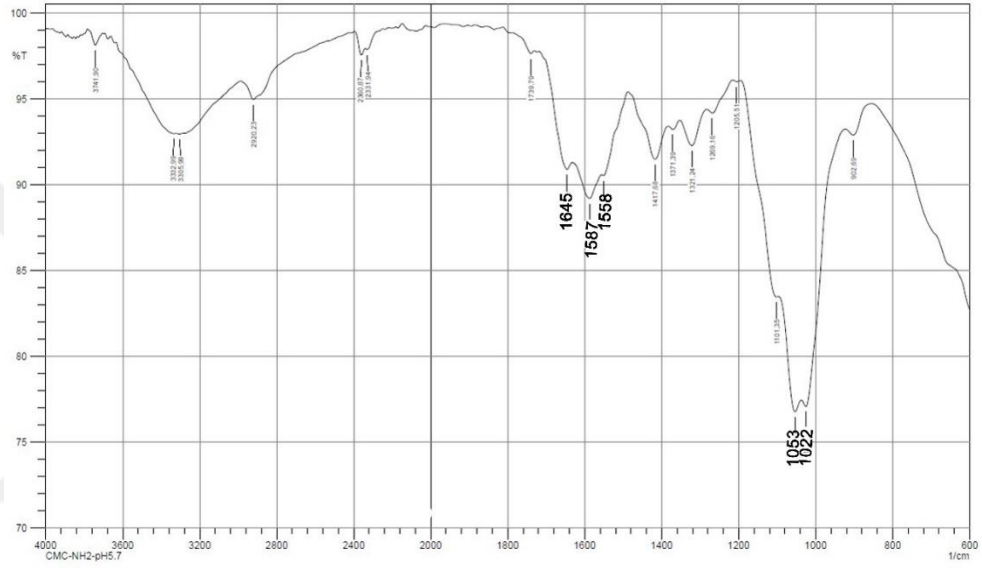
5.6 ATR-FTIR

Saf CMC, sentezlenen CMC-NH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMC-NH₂ hibrit kopolimer kimyasal yapılarının aydınlatılması için FTIR spektrumları alınmıştır. Şekil 5.8’de gözlenen CMC’ye karakteristik pikler, 3309 cm⁻¹ (O-H gerilme) bandı, alkil gruplarına ait pikler 2916-2887 cm⁻¹ (-CH₂ gerilme), 1589 ve 1323 cm⁻¹ pikleri CMC ye ait serbest karboksilat (COO-Na⁺) gruplarına ait asimetrik ve simetrik gerilime ait piklerdir, 1415 cm⁻¹ (C-CH₂ gerilme) ve 1051-1022 cm⁻¹ piranoz halkasına ait C-C ve C-O gerilme pikleridir (Leone vd. 2013, Wang vd. 2013).



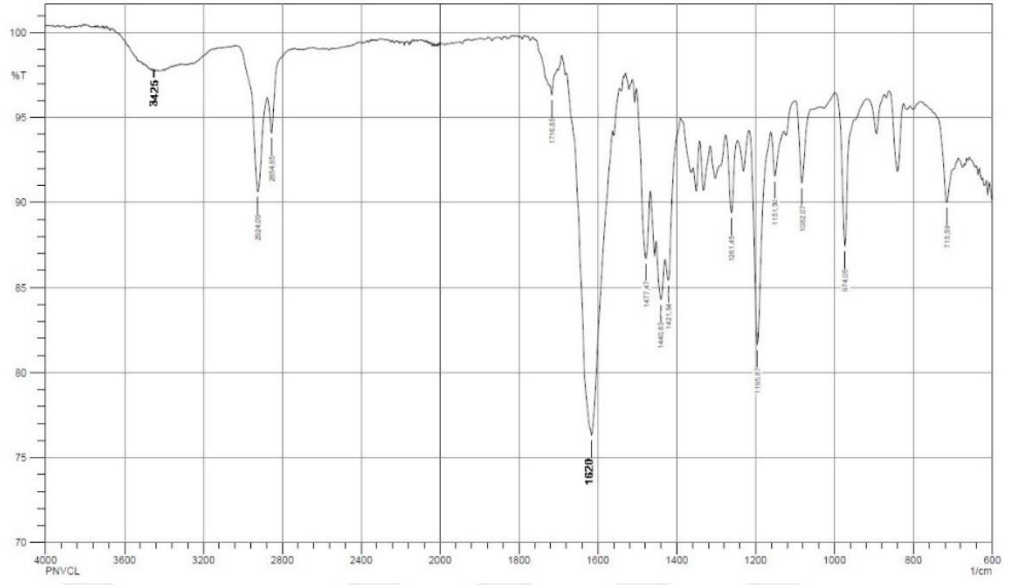
Şekil 5.8 CMC FTIR spektrumu

Yeni sentezlenen CMC-NH₂'ye ait FTIR spektrumunda (Şekil 5.9) 1546 cm⁻¹'larda gözlenen, yeni amid II piki (-CONHR), CMC polimerinin EDA (etilen diamin) ile fonksiyonlandırıldığını ve amino gruplarının başarıyla modifiye edildiğini gösterir. Ayrıca COO-Na⁺ karboksilat grubuna ait 1589 cm⁻¹ keskin pikin yerine, 1558-1645 cm⁻¹ bandının gözlenmesi, EDA ile fonksiyonlandırılması ile oluşan N-amino etil grubunun varlığını (NH₂ eğilmesi) göstermektedir (Taubner vd. 2015, Tan vd. 2011, Bulpitt vd. 1999).



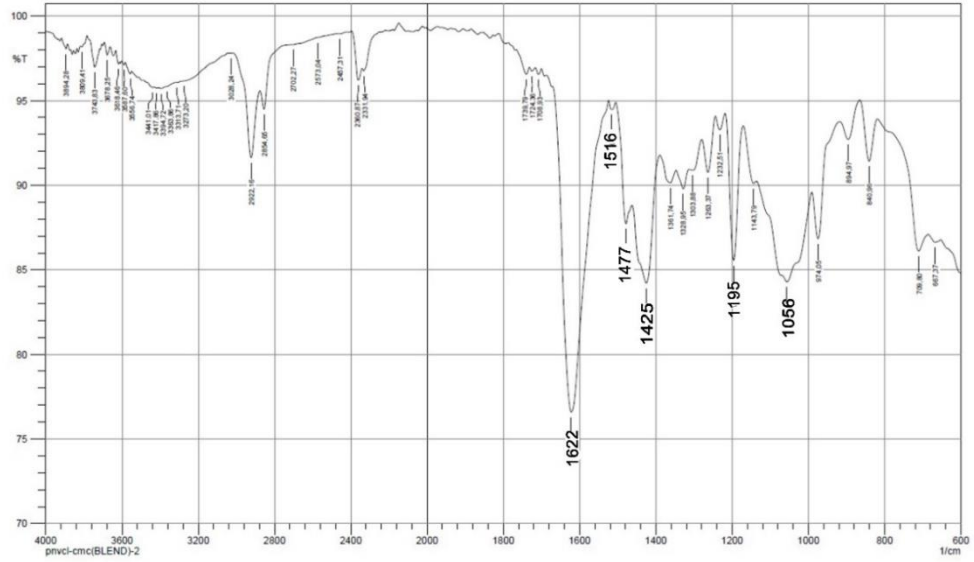
Şekil 5.9 Fonksiyonel CMC-NH₂ FTIR spektrumu

Şekil 5.10, monomer NVCL ait (C=C-) vinil gruplarına ait 1658 cm⁻¹ ve 3108 cm⁻¹ FTIR pikleri PNVCL sentezi ile kaybolduğu ve COOH grubuna ait yeni pikin 1620 cm⁻¹ ve -OH grubuna ait pikin 3425 cm⁻¹'de gözlenmesi fonksiyonlandırılmasının başarılı olduğunu gösterir (Prabaharan vd. 2008).



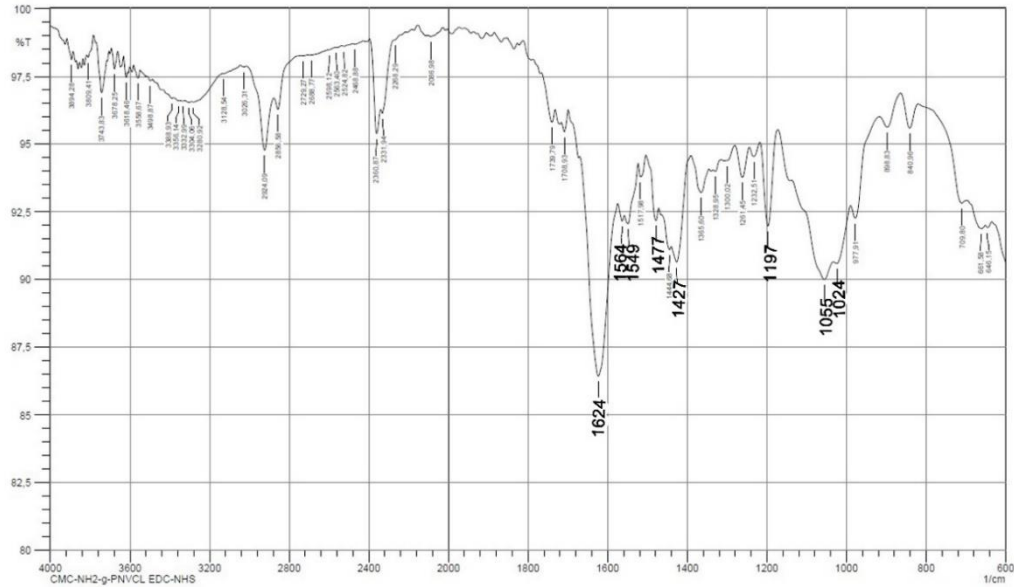
Şekil 5.10 Fonksiyonel PNVCL-COOH FTIR spektrumu

Harmanlanmış PNVCL/CMC IPN hidrojellerde, her iki polimere ait karakteristik pikler gözlemlendi (Şekil 5.11). PNVCL-COOH grubuna ait pik 1622 cm^{-1} 'de keskin olarak ve CMC'ye ait piranoz gruplarına ait pikleri 1056 cm^{-1} 'de görülmüştür.



Şekil 5.11 Harmanlanmış PNVCL/CMC FTIR spektrumu

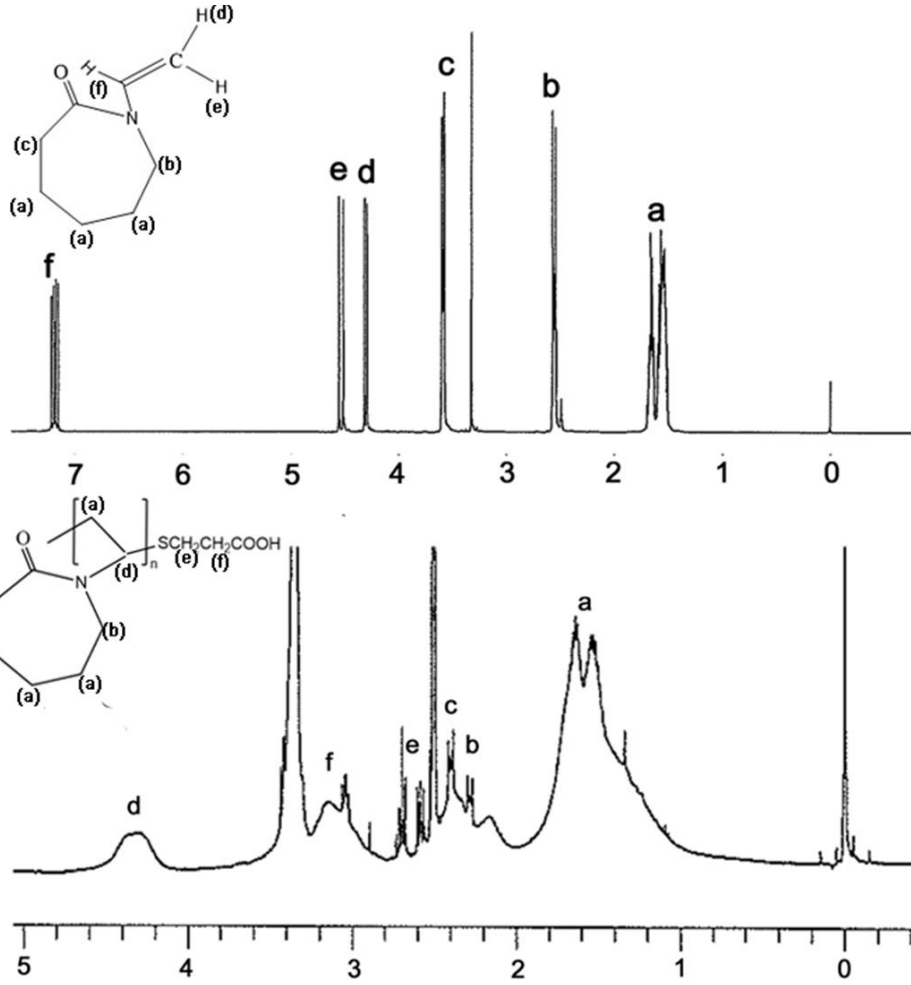
PNVCL-g-CMC-NH₂ kimyasal çapraz bağlı kopolimer, 1624 cm⁻¹'de CONH amid piki CONHR amid II piki 1564-1548 cm⁻¹'de gözlemlendi. 1057 cm⁻¹'de piranoz halkasına ait pikin ve 3309 cm⁻¹ OH piklerinde de şiddetinde azalma gözlenmiştir. Bu durum fonksiyonel PNVCL ile CMC-NH₂ konjugasyonun başarıldığının kanıtıdır (Şekil 5.12).



Şekil 5.12 PNVCL-g-CMC-NH₂ kopolimeri FTIR spektrumu

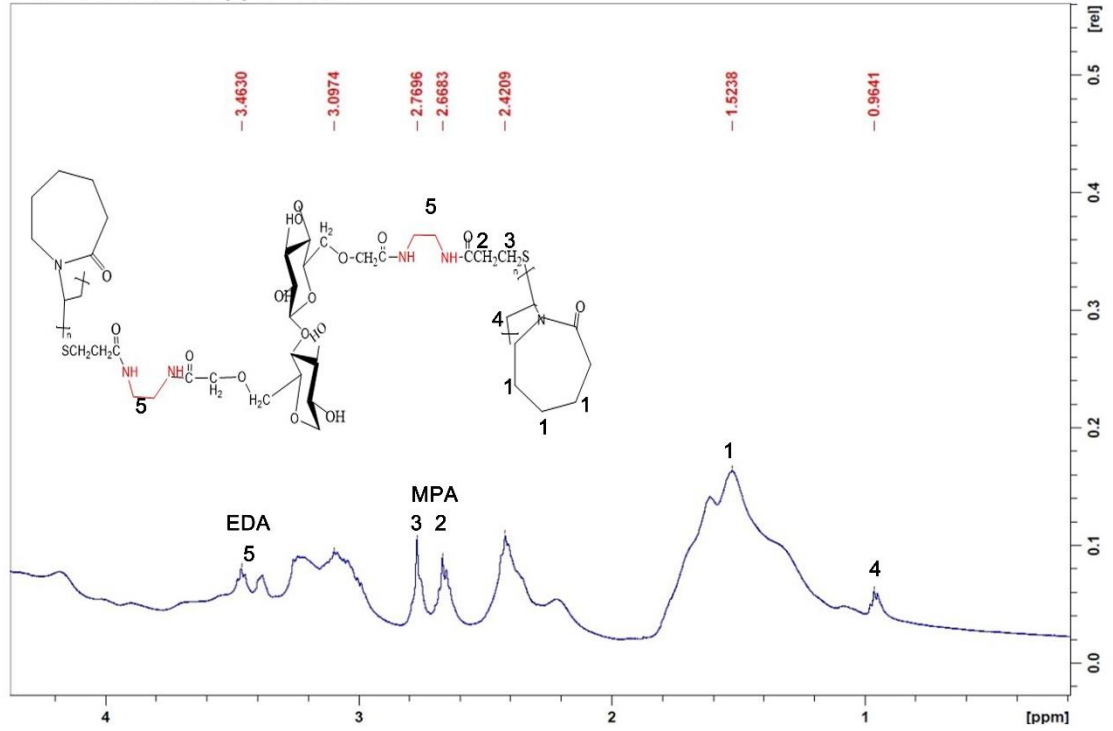
5.7 ¹H NMR

Monomer NVCL'nin radikalik polimerizasyonu ve merkaptopropiyonik asit kullanılarak fonksiyonlandırılması ile oluşan PNVCL-COOH'ın HNMR sonuçları Şekil 5.13'te verilmiştir. Monomere ait vinil pikinin (-CH=CH) 7.2 ppm'de sentez sonrası gözlenmemesi ve merkaptopropiyonik aside ait 3 lü piklerin e ve f'de triplet olarak görülmesi polimerleştirme ve fonksiyonlandırılmanın (zincir transfer ajanı) başarısını göstermektedir.



Şekil 5.13 NVCL ve PNVCL-COOH ¹HNMR spektrumları

CMC ve CMC-NH₂ suda çözünen yapıya sahip olmalarına rağmen HNMR sonuçları alınamamıştır. Ancak PNVCL-g-CMCNH₂ sentezi sonrasında alınan HNMR görüntüleri kovalent modifikasyonları ve çapraz bağlanmaları kanıtlamaktadır (Şekil 5.14). Aynı spektrum üzerinde MPA (CH₂CH₂ S-)’ya ait pikler, EDA (-CH₂-CH₂-NH)’ya ait pikler ve OCH₂-CO asetal grubuna ait pikler yer almaktadır. Sentezden sonra gözlenen 3.46 ppm’de gözlenen pikler (3) EDA’ya ait -CH₂ gruplarının triplet pikleridir. 2.6 ve 2.7 ppm’de gözlenen pikler (1 ve 2) ise MPA’da bulunan -CH₂S ve CH₂N gruplarına aittir. 2.42 ppm’de gözlenen pik ise -CH₂O gruplarına aittir.



Şekil 5.14 PNVCCL-g-CMC-NH₂ ¹H NMR spektrumları

Literatürde (Ha vd. 2017), CMC ¹H NMR pikleri ile karşılaştırıldığında 3.1 ppm'den önce piklerin bulunmaması bu aralıktaki piklerin PNVCCL ve modifiye edilmeleri sonucu oluşan yapılara ait pikler olduğunu gösterir.

5.8 Faz Geçiş Sıcaklığı

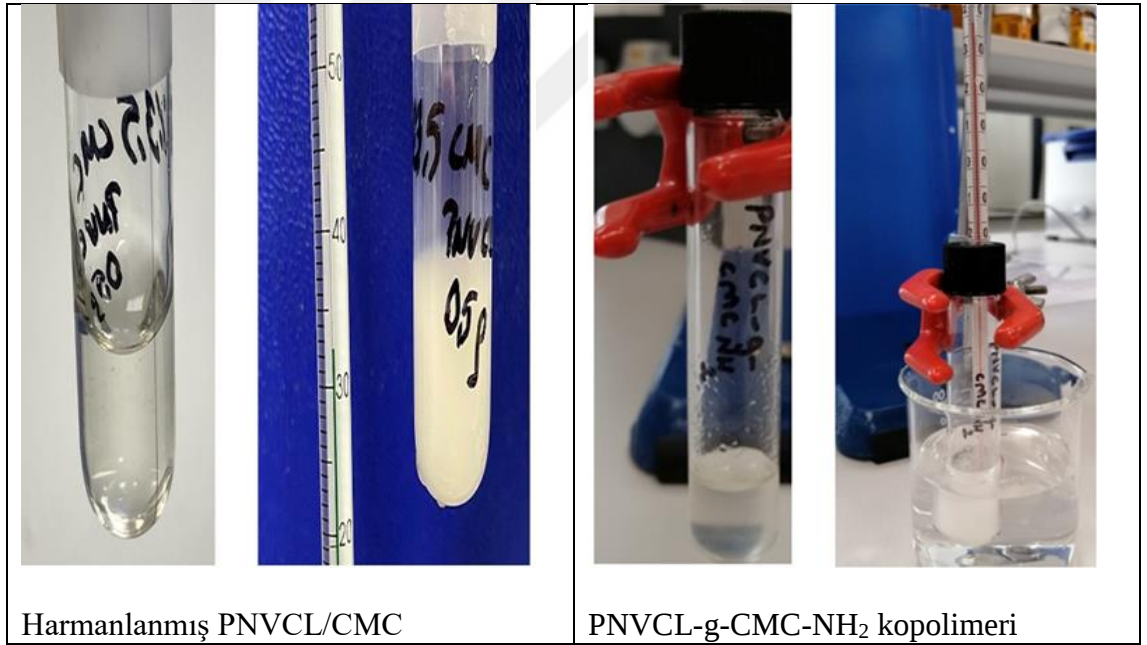
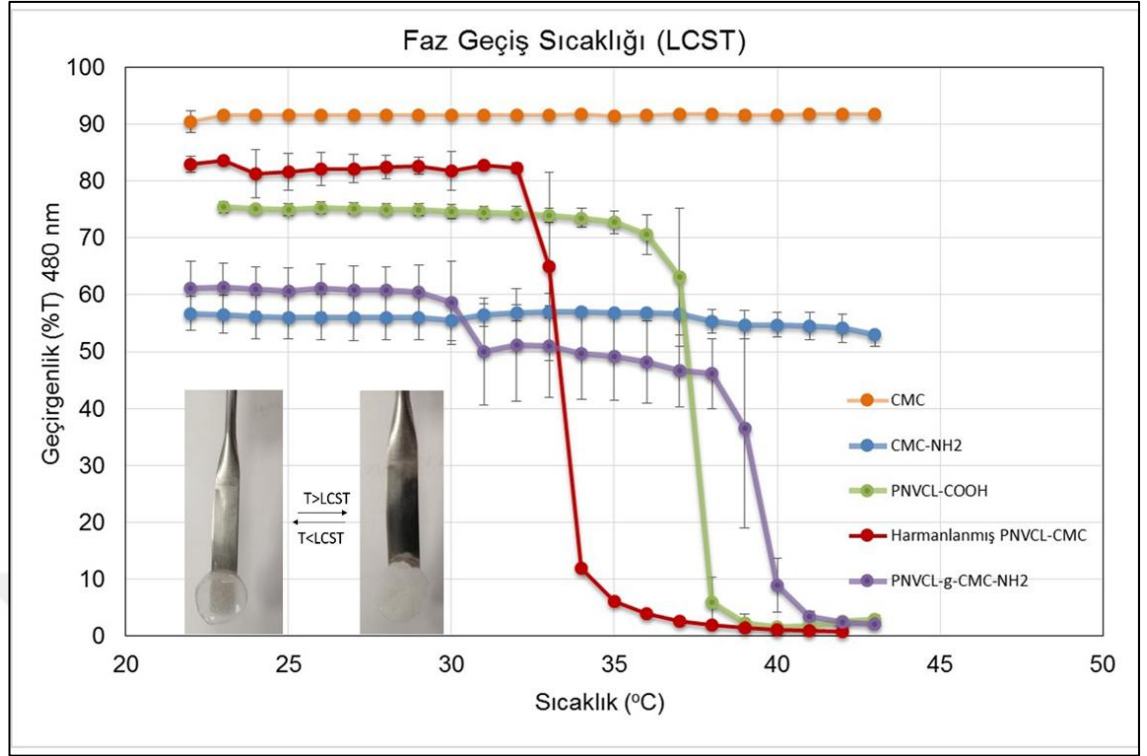
Çalışmada CMC, CMC-NH₂ polimerlerinin faz geçiş sıcaklığına sahip olmadığı, ancak sıcaklığa duyarlı PNVCCL ile hibritleştirildiğinde elde edilen çözeltilerin artan sıcaklıkla bir faz geçişi gösterdiği belirlendi.

Sıcaklığa duyarlı örnekler faz geçiş sıcaklığının altında şeffaf çözelti yapısında olduğundan yüksek geçirgenlik değerine sahipken, faz geçiş sıcaklığının üzerinde beyaz ve katı bir yapıya sahip olması nedeniyle polimerin geçirgenlik değerinde ani bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 5.15). Saf PNVCCL-COOH için geçiş sıcaklığı 36°C iken

harmanlanmış PNVCL-CMC için LCST değeri yaklaşık $\sim 32-33^{\circ}\text{C}$ 'dir. Kovalent amid bağı ile kimyasal olarak aşılanmış PNVCL-g-CMC-NH₂ çözeltisinin LCST değerinin ise yaklaşık 39°C olduğu gösterilmiştir.

Hidrofilik karaktere sahip CMC, vücut sıcaklığına yakın sıcaklıklarda sıcaklığa duyarlılık göstermediği rapor edilmiştir (Abdelrahim vd. 1994, Jain vd. 2023). Viskoz CMC çözeltisi, sıcaklığa duyarlı PNVCL ile harmanlandığında, vücut sıcaklığının altında yaklaşık $32-33^{\circ}\text{C}$ 'de faz geçişi göstermiştir. Harmanlanan hidrojel yapısında, faz geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklar, CMC' nin uzun zincirli yapısı üzerine, PNVCL'un hidrofobik zincirlerinin kümelenmesi ve CMC ve PNVCL polimer zincirleri arasındaki hidrofobik etkileşimlerin artmasına neden olabilir. Sonuç olarak, kritik sıcaklık civarında CMC zincirleri ile PNVCL zincirleri arasında fiziksel makromoleküler etkileşimle polimerik ağ yapının iç yapısında önemli bir değişikliğe ve harmanlanan karışımda daha düşük sıcaklıkta etkin bir faz ayrımı görünmesine neden olur.

PNVCL-g-CMC-NH₂ aşısı kopolimerinin faz geçiş sıcaklığı ise $38-39^{\circ}\text{C}$ olarak belirlenmiştir. Yeni sentezlenen fonksiyonel CMC-NH₂ sentezi sırasında saf CMC zincirlerine göre daha kısa zincirli olduğu viskozitesinin daha düşük olmasına neden olmuştur. Ayrıca PNVCL-g-CMC-NH₂ kopolimerinin hidrofilikliği arttığı için faz geçiş sıcaklığı da artmıştır. Sonuç olarak PNVCL-g-CMC-NH₂ çözeltisinden suyun uzaklaşması ve PNVCL zincirlerinin CMC-NH₂ üzerine kümelenmesi daha yüksek LCST değerinde zorlaşmıştır. Faz geçişi sıcaklığı ile malzemenin mikro yapısı arasında ilişki önemlidir.

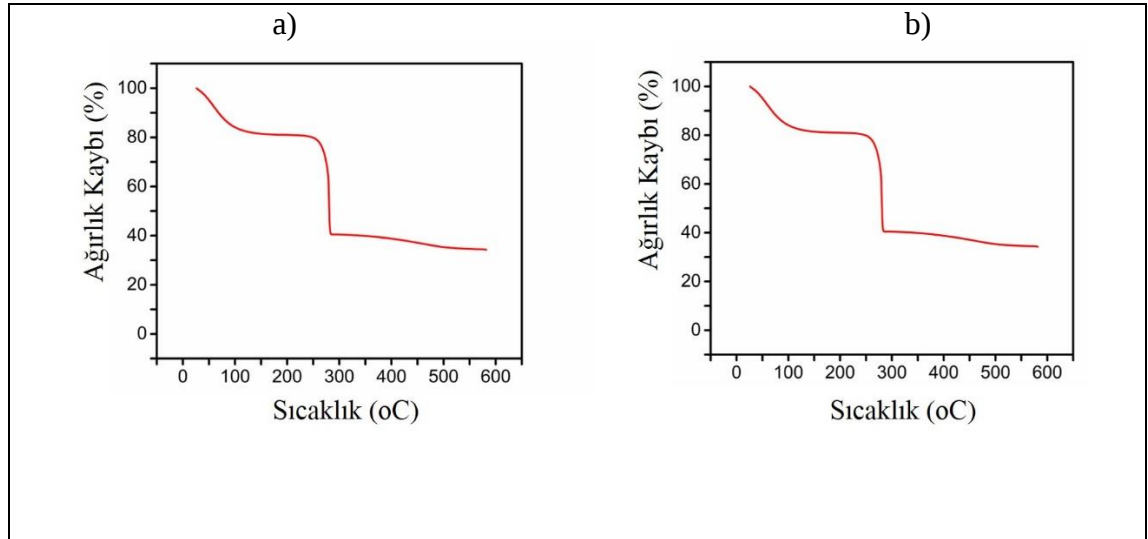


Şekil 5.15 CMC, CMC-NH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojel ve PNVCL-g-CMC-NH₂ kopolimerinin faz geçiş sıcaklığı

5.9 Termogravimetrik (TGA) Analizler

CMC, PNVCL-COOH, CMC-NH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH₂ hidrojellerine ait TGA eğrileri Şekil 5.16’da verilmektedir.

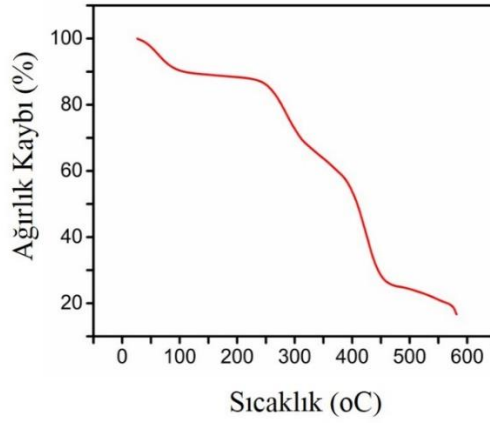
Saf CMC ve fonksiyonel CMCNH₂ iki aşamalı termal bozunma gösterirken, çapraz bağlanmanın olduğu hidrojellerde termal bozunma üç aşamalı olmuştur. Saf CMC’in termogravimetrik eğrisinde, yaklaşık 100 °C’de, adsorblanmış ve bağlı olan suyun kaybı nedeniyle %20’lik bir kütle kaybı gözlenmiştir. Sıcaklığın, 250’den 300°C’ye artması ile CMC’nin ağırlığında keskin bir düşüş (%60’dan daha fazla bir düşüş) olmuştur ve 600°C’de ise ağırlığın yaklaşık % 65’i kaybolmuştur ve bu durum CMC’nin ana iskeletinin dekarboksilasyonu sonucu bozulması sonucunda karbondioksit ve karbonmonoksit oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 5.16a) . Fonksiyonel CMCNH₂ için termal bozunma sonuçlarında önemli bir değişiklik olmamıştır (Şekil 5.16b). CMC’nin termogravimetrik analizi incelendiğinde bozunma davranışının literatür ile benzerlik içerisinde olduğu görülmektedir (Priya vd. 2019).



Şekil 5.16 TGA eğrileri a) CMC ve b) CMCNH₂

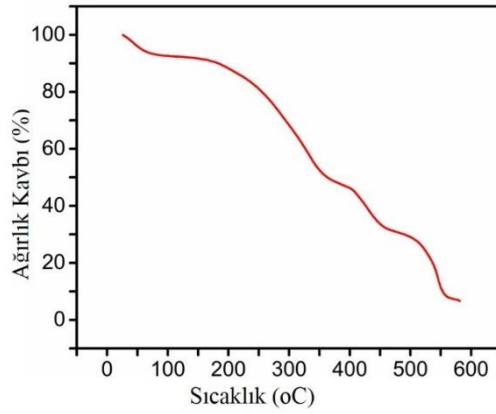
PNVCL-COOH’a ait TGA eğrisinden görüldüğü gibi (Şekil 5.17), ilk ağırlık kaybı 180 °C’de polimerik zincire üzerinde adsorblanmış ve bağlı olan serbest kalması ile

gözlendi. 350 ve 450°C arasındaki maksimum termal bozunma/karbonizasyon nedeniyle %90'lık bir ağırlık azalışı gözlendi. Yüksek karbon içeriğinden dolayı PNVCL-COOH molekülleri daha kolay karbonize olduğu düşünülmektedir.



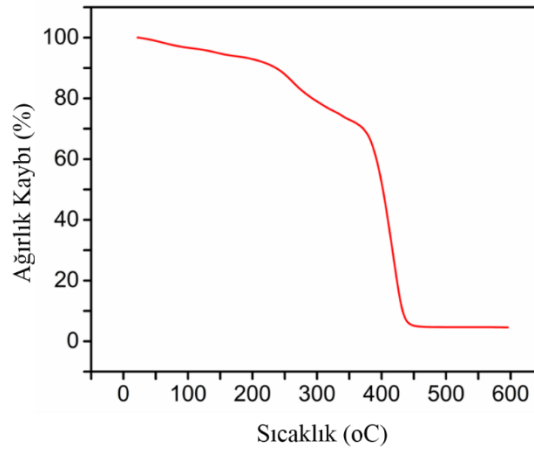
Şekil 5.17 PNVCL-COOH TGA eğrisi

Harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojelinden elde edilen iskelelerin TGA sonuçlarında, karakteristik ve keskin CMC'ye ait adsorblanmış ve bağlı olan suyun kaybını 100°C de görülür, 300°C'ye kadar %30'luk kütle kaybı CMC'ye aittir. 350 ve 450°C arasındaki maksimum termal bozunma ise PNVCL (%75) atfedilebilir. CMC'nin molekül içi ve moleküllerarası hidrojen bağları, PNVCL ile harmanlanma sonucunda azalmıştır. Yapıyı oluşturan polimer zincirleri, sıcaklık artışıyla birbirinden ayrılmıştır. Sonuç olarak harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojin TGA eğrisi ile, yapıyı oluşturan saf bileşenlerin TGA'ları karşılaştırıldığında gözlenen farklılık, yeni bir yapı oluşumunu, yani iç içe geçmiş polimerik ağ yapının (IPN) oluşumunu kanıtlamaktadır.



Şekil 5.18 Harmanlanmış PNVCL/CMC TGA eğrisi

Sentezlenen PNVCL-g-CMCNH₂ kopolimer için termal bozunma eğrisine baktığımızda, termal bozunmanın yavaşladığı, üç basamakta gerçekleştiği ve 500-550 °C’de sentetik PNVCL’nin dekarboksilasyonu ile bozulma sonucunda uçucu olmayan organik moleküllerin varlığını gösterir. Bu organik moleküller nedeniyle ağırlık kaybı %10’lara gelmiştir. Bu değişiklik kimyasal çapraz bağlanma etkisini gösterir kanıttır. Termal kararlılık artmış ve termal bozunma daha yüksek sıcaklıklara kaymıştır (Bokias vd. 2001, Marques vd. 2018).

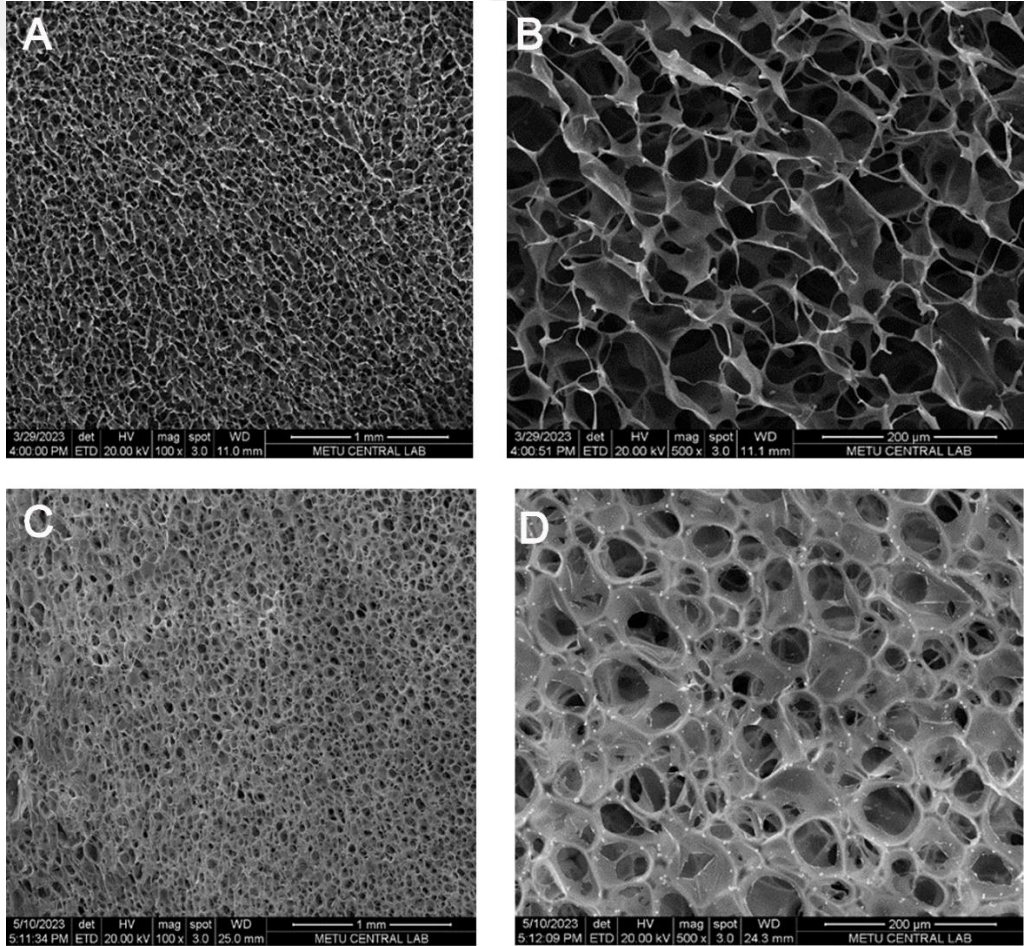


Şekil 5.19 PNVCL-CMCNH₂ kopolimeri TGA eğrisi

5.10 SEM analizleri

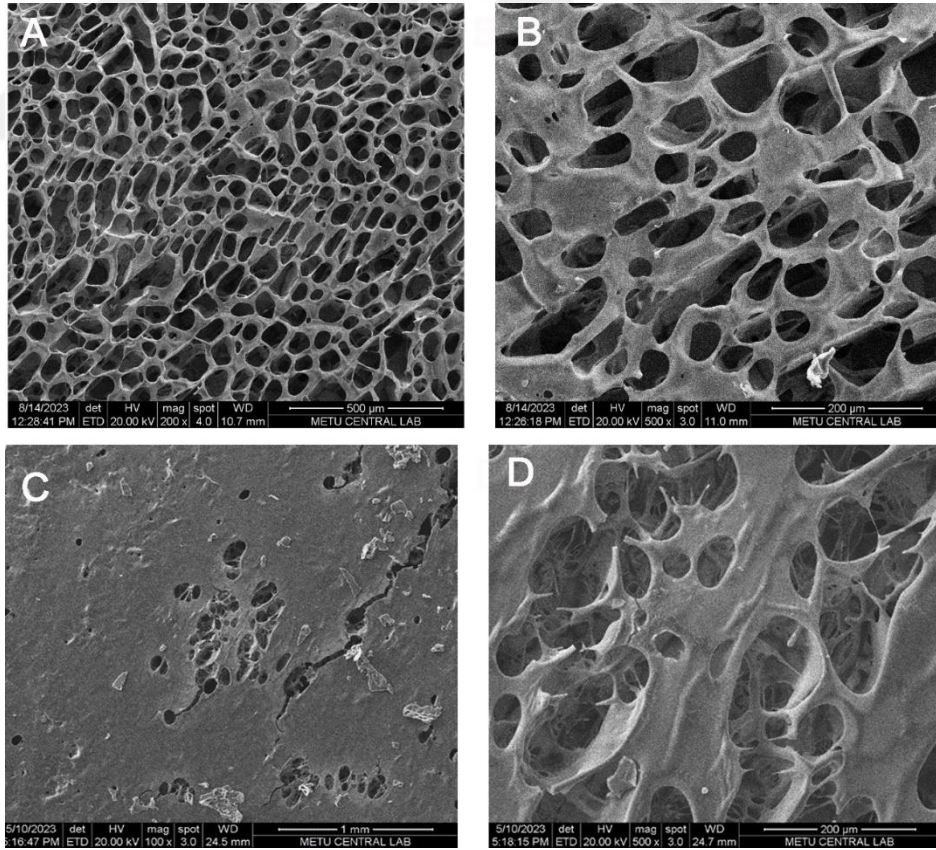
CMC, CMCNH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH₂ kopolimer iskelelerine ait örneklerin yüzey morfolojileri SEM ile incelenmiştir.

CMC ve CMCNH₂ hidrojelinin SEM yüzey görüntüsünde (Şekil 5.20) homojen, düzgün, birbiriyle bağlantılı üç boyutlu, küçük mikroskobik gözenek yapısında olduğu ve ince duvarlara sahip olduğu belirlenmiştir. CMCNH₂ hidrojelinin yüzey morfolojisindeki dağılmış beyaz benekler, sentez sırasında kalan sodyum tuzuna aittir.



Şekil 5.20 a ve b) CMC hidrojellerinin ve c ve d) CMCNH₂ hidrojellerinin 200X ve 500X de yüzey morfolojileri

Harmanlanmış PNVCL/CMC ve kimyasal çapraz bağlanmış PNVCL-g-CMCNH₂ hidrojenlerin SEM görüntüleri Şekil 5.21’de verilmiştir. Harmanlanmış örneklerin yüzey morfolojileri CMC hidrojeninin SEM görüntülerine benzemektedir. Ancak PNVCL-g-CMCNH₂ hidrojeninin sentezinde kullanılan kimyasal çapraz bağlanma sonucunda, fonksiyonel grupların birbirleriyle daha fazla temas etmesi nedeniyle malzemenin makroskopik yapısında değişiklikler olduğu belirlenmiştir. Yapının daha az gözenekli olduğu, gözeneklerin homojen dağılmadığı, daha büyük ve düzgün olmayan yapıda olduğu gösterilmiştir. Ayrıca katmanlar arasında çatlak benzeri yapılarda yer almaktadır. Sonuç olarak PNVCL-g-CMCNH₂ kopolimerinin kimyasal çapraz bağlanma ile sentezlenmesi sırasında, üç boyutlu (3D) yapıda gözenek oluşumu olsa da yapısal bütünlük ve gözenek boyutu büyüklüğünün zarar gördüğü düşünülmektedir. Kovalent çapraz bağlanarak sentezlenen PNVCL-g-CMCNH₂ kopolimer örneklerinde, PNVCL nedeniyle yapıda su miktarı azalması ve donma sırasında daha fazla büzülmenin olması gözeneklerin büyüdüğünü ve homojenliğinin azaldığı düşünülmektedir.

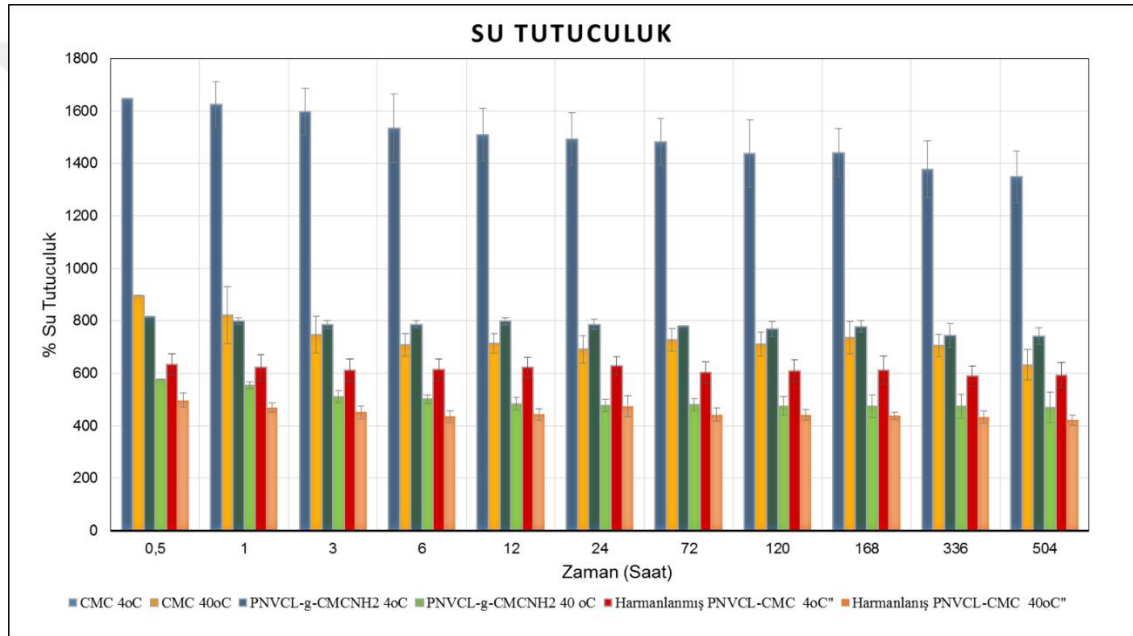


Şekil 5.21 a ve b) Harmanlanmış CMC hidrojenlerinin ve c ve d) PNVCL-g-CMCNH₂ kopolimer hidrojenlerinin 200X ve 500X de yüzey morfolojileri

CMC içeren hidrojelde su moleküllerinin donması ve hizalanması ile düzgün ve birbiriyle bağlantılı gözenekler elde edildiği ancak hidrojel içeriğinde CMC miktarının azalmasına bağlı olarak yapıda düzgün buz oluşumu ve gözeneklerin hizalanmasının azaldığı belirtilmiştir (Toledo vd. 2019).

5.11 Su Tutuculuk

Tezde hazırlanan hidrojellerin kuru örneklerinin, zamana bağlı su tutuculukları sıcaklığa bağlı olarak belirlenmiştir (Şekil 5.22).



Şekil 5.22 CMC temelli hidrojellerin su tutuculukları

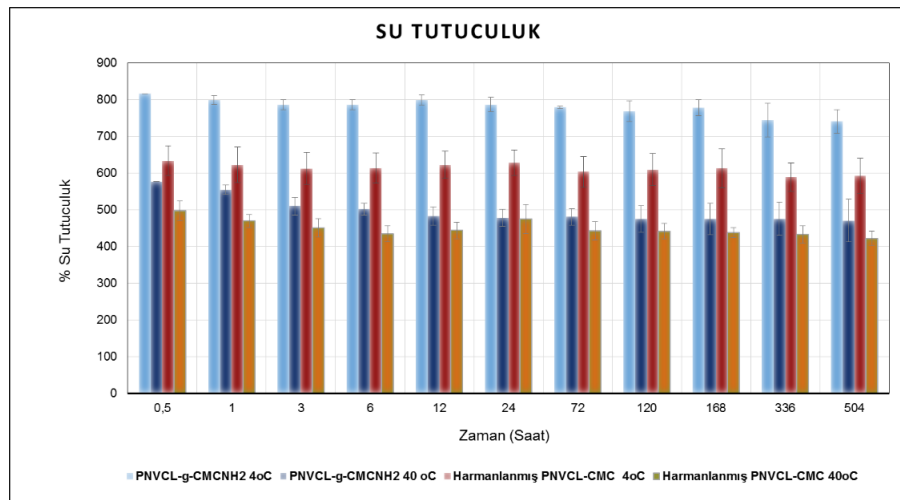
CMC hidrojel ile karşılaştırıldığında (su tutuculuk>%1600), harmanlanmış hibrit hidrojin (<%600) ve PNVCL-g-CMC-NH₂ kopolimer hibrit hidrojellerin (<%800) su tutuculuklarının önemli oranda azaldığı belirlenmiştir. Yapıya ilave edilen hidrofobik yapıli sentetik PNVCL ile, su tutuculuk yaklaşık %50 azalmıştır. CMC, harmanlanan ve kimyasal çapraz bağlanan örnekler sıcaklığa bağlı olarak benzer şişme davranışı göstermekle birlikte, faz geçiş sıcaklığının ($t < LCST$) altındaki sıcaklıklarda, su tutuculuklarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen hibrit hidrojellerin sıcaklığa bağlı su tutuculukları karşılaştırıldığında, en fazla su tutuculuğunun kimyasal

çapraz bağlanma ile hazırlanan PNVCL-g-CMC-NH₂ hibrit hidrojelinde olduğu ve 4°C’de gerçekleştiği belirlenmiştir. PNVCL-g-CMC-NH₂ hibrit hidrojelinde 40°C’de (T>LCST) su tutuculuğunun, 4°C’deki (T<LCST) su tutuculuğu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %30 azaldığı belirlenmiştir.

Harmanlanmış hibrit hidrojelinde su tutuculuğunun, kimyasal çapraz bağlı hibrit sisteme göre su tutuculuğunun LCST altında ve üstündeki sıcaklıklarda yaklaşık % 25’lik azaldığı belirlenmiştir. PNVCL-g-CMC-NH₂ hibrit hidrojelinde şişme davranışının daha fazla olması, CMCNH₂ eldesi tepkimesinde CMC zincirlerinin kısalması ile jel yapısının daha gevşek, gözenek yapısının daha büyük olmasına bağlanmıştır. Grafik incelendiğinde, ürünlerin ortalama 30 dk içinde şişme denge değerine ulaştıkları görülmektedir.

Su tutuculuk yapıda bulunan CMC miktarıyla (-COO ve -OH gruplarının sayısı) orantılıdır. PNVCL polimerik zincirleri ile, yapıda hidrofilik grupların azalması ile molekül içi ve moleküllerarası serbest -OH gruplarının su ile etkileşimi sterik olarak engellenmiştir. Ayrıca fiziksel ve kimyasal çapraz bağlanmalar su tutuculuğu ve şişmeyi azaltır (Uyanga vd. 2021).

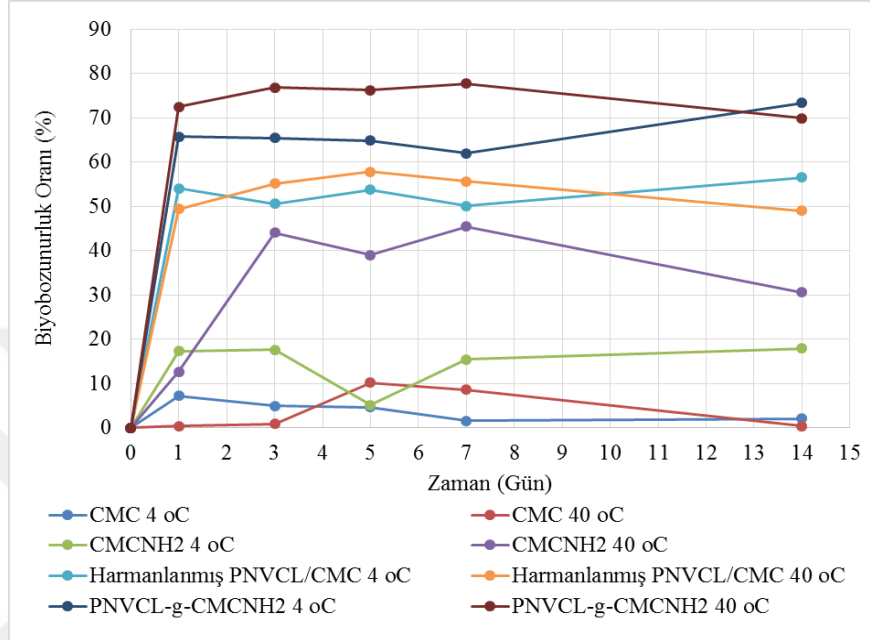
PNVCL-g-CMC-NH₂ hibrit hidrojelinde çapraz bağlanmanın hem iyonik etkileşim ve hem de kovalent çapraz bağlanma olabilir.



Şekil 5.23 Hibrit hidrojellerin sıcaklığa bağlı su tutuculukları

5.12 Biyobozunurluk

Tez kapsamında çalışmalarda kullanılan hidrojellerin sıcaklığa bağlı biyobozunurlukları Şekil 5.24'te verilmiştir.



Şekil 5.24 CMC temelli hidrojellerin sıcaklığa bağlı biyobozunurlukları

Tez çalışmasında kullanılan örnekler, belirlenen sıcaklıklarda deney süresince (14 gün) hidrojel iskele yapılarını korumuştur. Grupların ilk günlerdeki degradasyon oranı, 14. günde çok değişmemiştir. Saf iyonik çapraz bağlı CMC hidrojel ile karşılaştırıldığında (biyobozunma < %10), harmanlanmış hibrit hidrojin biyobozunurluğu daha yüksek bulunmuştur (<%60). PNVCL-g-CMC-NH₂ kopolimer hibrit hidrojellerin biyobozunurluğu ise, çalışılan iskeleler arasında en yüksek (yaklaşık < %80) olduğu bulunmuştur.

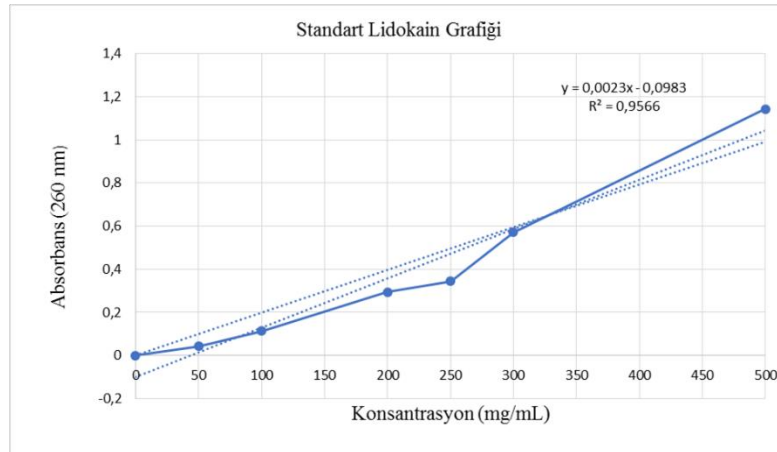
Sıcaklığa bağlı biyobozunurluklarına bakıldığında aynı gruplar arasında çok büyük fark olmamakla birlikte, birbiriyle karşılaştırıldığında örneklerin 40°C'de faz geçiş sıcaklığının üzerinde ($t > LCST$) biyobozunurluklarının daha yüksek olduğu görülmektedir.

Fiziksel çapraz bağlanan harmanlanan PNVCL/CMC IPN hidrojel yapıların zamanla zincirler arası etkileşimler (dolanmalar) azalmıştır. Çoğu harmanlanmış yapılarda da benzer durum rapor edilmiştir.

Çapraz bağlı yapıda ise sentez sırasında CMC'nin fonksiyonel hale getirilmesinde CMC uzun zincir yapısının kısaldığı ve daha küçük zincir yapılı fonksiyonel yapılar elde edildiği düşünülmektedir. Kısa zincirli fonksiyonel CMCNH₂ ile çapraz bağlanan kolpolimer yapıların faz geçiş sıcaklığının altında ve üstündeki sıcaklıklarda 21 gün boyunca dayanıklı olduğu ve sıcaklığa duyarlılıklarını koruduğu belirlenmiştir. Ancak kısa zincirli suda çözünür CMCNH₂'lerin iskelelerin zamanla kütle kaybında etkili olabileceği düşünülmektedir.

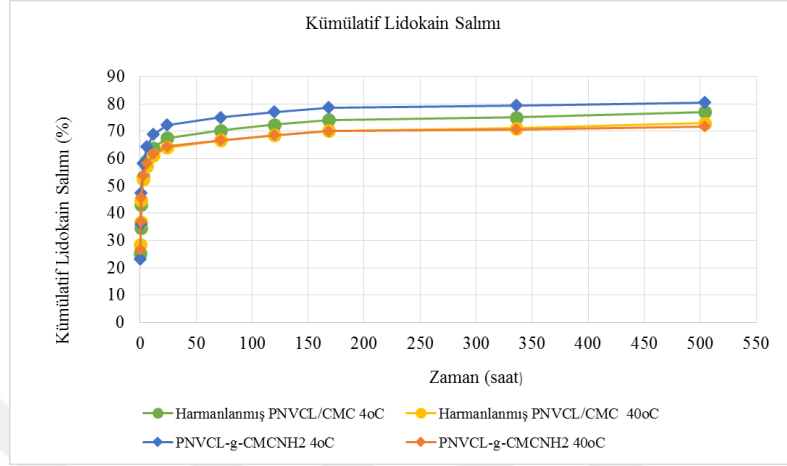
5.13 İlaç Yükleme ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi

Yapılan deneysel çalışmalarda ortama salınan lidokain'in miktarı maksimum absorbands değerini verdiği dalga boyu λ_{max} = 260 nm'de ölçülmüştür. Yüklenen ve salınan ilaç miktarını kantitatif olarak belirlemek amacıyla lidokainin bilinen konsantrasyondaki çözeltileri kullanılarak standart kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir (Şekil 5.25).



Şekil 5.25 Standart lidokain grafiği

Standart eğri kullanılarak, belirlenen salım noktalarında alınan örneklerden salınan ilaç miktarı belirlenerek kümülatif olarak Şekil 5.26’da verilmiştir.



Şekil 5.26 Hibrit hidrojellerden sıcaklığa duyarlı kümülatif ilaç salımı

Her iskeleye 10 mg olacak şekilde yüklenen lidokainin sıcaklığa bağlı salımı üç hafta boyunca gerçekleştirilmiştir. Lidokain moleküllerinin yapı iskelesinin gözeneklerinden hızlı difüzyonu nedeniyle ani salım gerçekleşmiştir ve hidrojel yüzeyine yakın yüklenen lidokain moleküllerinin sayısı da ilk salım oranını artırdığı düşünülmektedir.

21 günlük salım süresinin sonunda iskeleye yüklenen ilacın yaklaşık %80'i salınmıştır. Sentezlenen hibrit hidrojellerden ilaç salımı, 4°C de daha fazla gerçekleşirken, faz geçiş sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda (40°C), örneklerden ilaç salımı daha az (%12) gerçekleşmiştir.

PNVL-g-CMCNH₂ hibrit hidrojelinden sıcaklığa bağlı lidokain salımı daha iyi gerçekleşmiştir ve lidokain salımı 4°C’de daha fazla olmuştur. İlaç salımı ilk iki günde ani (burst) salım olarak gerçekleşmiştir. Vücut sıcaklığının üzerindeki sıcaklıkta (40°C) iskele yapıda gerçekleşen büzüşme sonucunda gözenek büyüklüğünün azaldığı ve ilaç salımının düştüğü sonucu elde edilmiştir.

Harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojelinin sıcaklığa bağlı ilaç salımı arasındaki fark en az olup (%5) hidrojin gözenek yapısının sıcaklıkla çok değişmediği ve daha rijit bir yapıya sahip olduğu sonucu çıkarılmıştır. Bunun nedeni, karışım hidrojel ağ matris yapısında Al^{+3} iyonik çapraz bağlanma sonucunda daha kompakt veya yüksek oranda iç içe geçmiş hidrojel sistemi nedeniyle polimerik zincirlerin daha az şişmesi olabilir. Oluşan iç içe geçmiş hidrojel matrisinin çapraz bağlanma sonucunda yapının sertliğinin arttığı ve gözeneklerin küçülmesine neden olduğu sonucu çıkarılmıştır. Harmanlanmış PNVCL/CMC hidrojel iskelelere yüklenen ilaç moleküllerinin matris boyunca kolayca taşınmasını engellenmesi sonucunda ilaç salınımının azaldığı gösterilmiştir (Agnihotri vd. 2005, Bhattacharya vd. 2012). Harmanlanmış PNVCL/CMC rijid yapılı hidrojin sıcaklık artışıyla içerisindeki yapıdan suyun uzaklaşması da zorlaştırdığından sıcaklığa bağlı salımda değişimde az olmuştur.

Hidrojellerden ilaç salımı çeşitli koşullara (hidrojel eldesinde fiziksel, kimyasal çapraz bağlanma vb, kullanılan yöntemlere, hidrojel oluşturulan polimerik yapıların şişme davranışına, çevresel koşullara) bağlıdır.

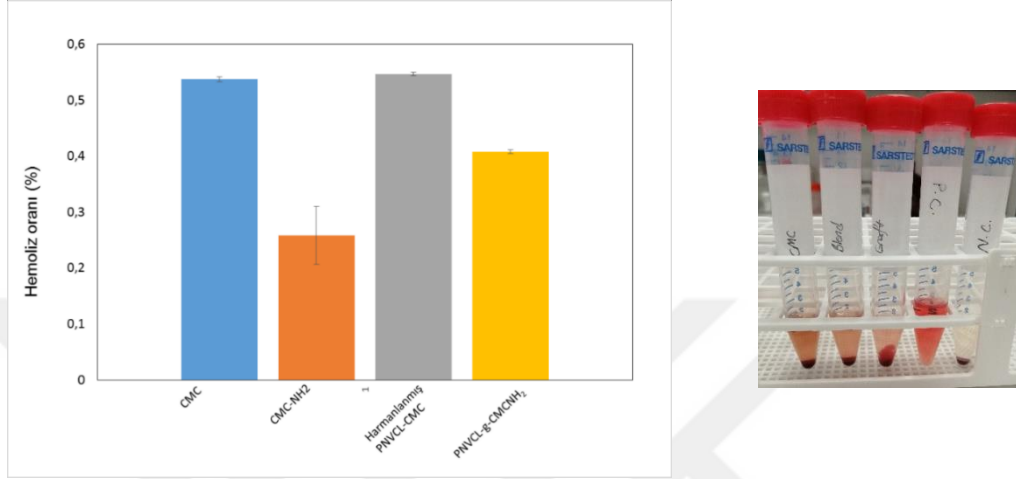
5.14 Hemoliz

Biyouyumlu olmayan hidrojellerin neden olduğu osmotik bozulmalar ve kandaki fiziksel değişiklikler eritrositlerin parçalanmalarına neden olabilir. Hidrojeller ile etkileşen eritrositlerin yıkımı, hemoglobin atılımına neden olabilir. Hidrojellerle etkileşim sonucu oluşan lizis, hidrojellerin kan hücrelerine toksisitesinin iyi bir göstergesidir.

Tezde kullanılan hidrojeller, kan uyumluluğu kullanılarak hemoliz açısından değerlendirildi (Şekil 5.27). İnsan kanındaki eritrositler, CMC, CMCNH₂, Harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH₂ ile 1 saat süreyle 37 °C'de etkileştirilmiştir. Distile su pozitif kontrol ve PBS (pH 7,4) negatif kontrol çözeltileri olarak kullanılmıştır. Şekil 5.27'de, PK'da eritrositlerin yıkımı ile parlak kırmızı renk görülürken, diğer iskeleler ile etkileştirilen eritrositlerin olduğu tüplerde daha az kırmızı renk ve NK'da açık sarı renk görülmüştür. Hidrojeller ve kanın inkübasyonu ile test edilen tüm hidrojeller için % 1'den daha düşük hemolitik oran belirlenmiştir. ISO-10993-5 göre,

hemolitik oranları % 5'in (biyomalzemeler için kritik güvenli hemolitik oran) altında olan numuneler hemolitik olmayan yani biyouyumlu olarak kabul edilir.

Sonuç olarak saf CMC ve bu tez kapsamında sentezlenen yeni hibrit hidrojelilerin kan uyumluluklarının iyi olduğu gösterilmiştir.



Şekil 5.27 Hidrojellerin kan uyumluluklarının değerlendirilmesi için in vitro hemoliz testi

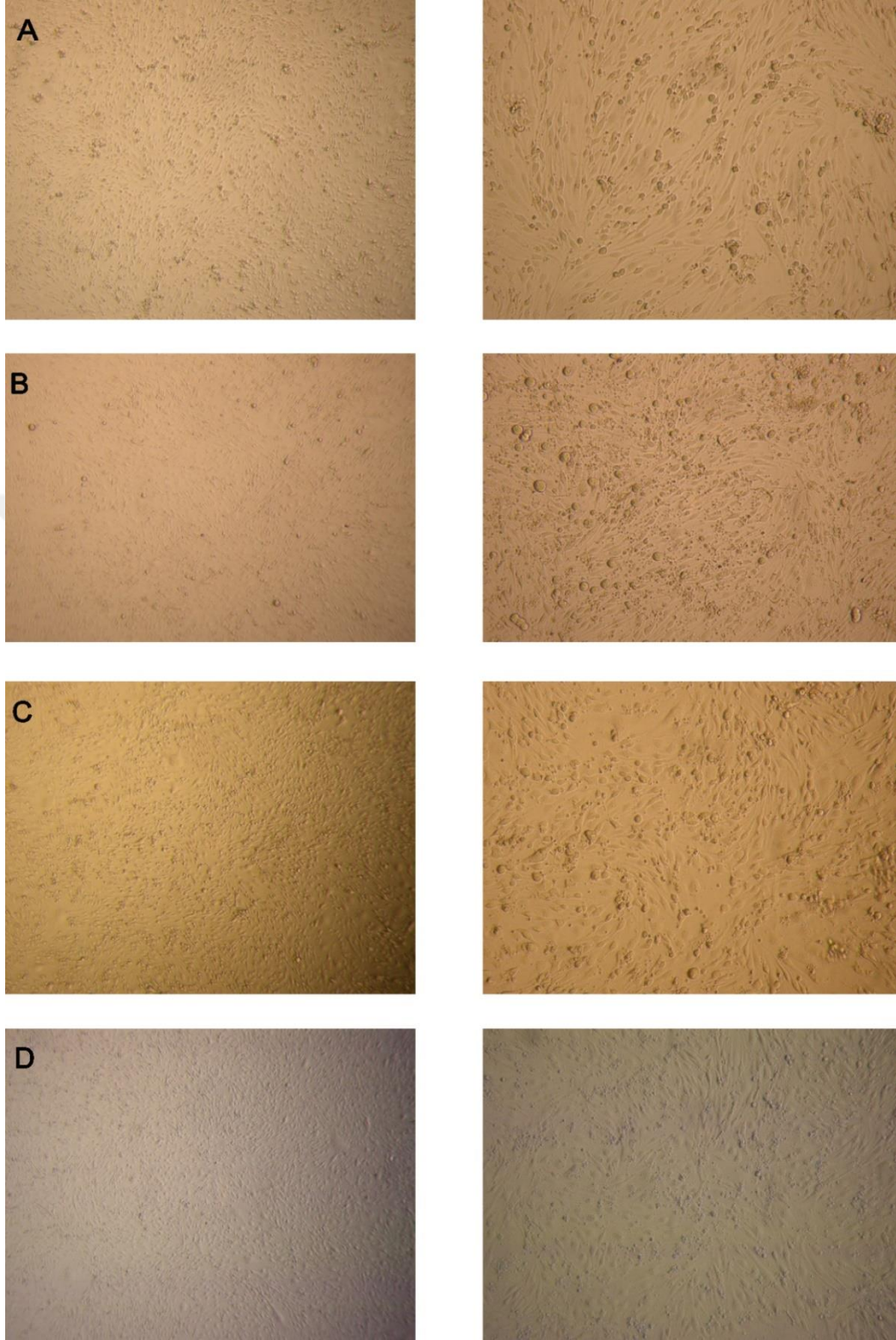
5.15 İndirekt Hücre Canlılığı

Tez kapsamında hazırlanan CMC, CMCNH₂, Harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH₂ iskelelerin muamele edildiği polimer çözeltisi ile etkileştirilen hücrelerin canlılığı, standart alamar mavisi testi ile belirlenmiştir (Al-(Nasiry vd., 2007). Polimerler ile etkileştirilen vasat ile 48 saat kültüre edilen adipoz mezankimal hücrelerin faz kontrast mikroskopu görüntüleri Şekil 5.28’de verilmiştir.

Belirlenen inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı alamar mavisi testi ile florometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 5.29). Negatif kontrol (NK) ve diğer iskelelerle etkileştirilen hücreler alamar mavisi ile pembe renk verirken, TritonX 100 ile etkileştirilen hücreler (PK), hücre canlılığını yitirdiği için alamar mavisi ile renk değiştirmemiştir. Hücre içermeyen kuyucukta, kör olarak sadece vasat ve alamar mavisi çözeltisi bulunmaktadır. Malzeme ile etkileştirilmemiş hücrelerin canlılığı (NK) 100 kabul edilmiş ve diğer örneklerin hücre canlılığı buna göre belirlenmiştir. CMC ve CMC-NH₂ iskeleleri ile

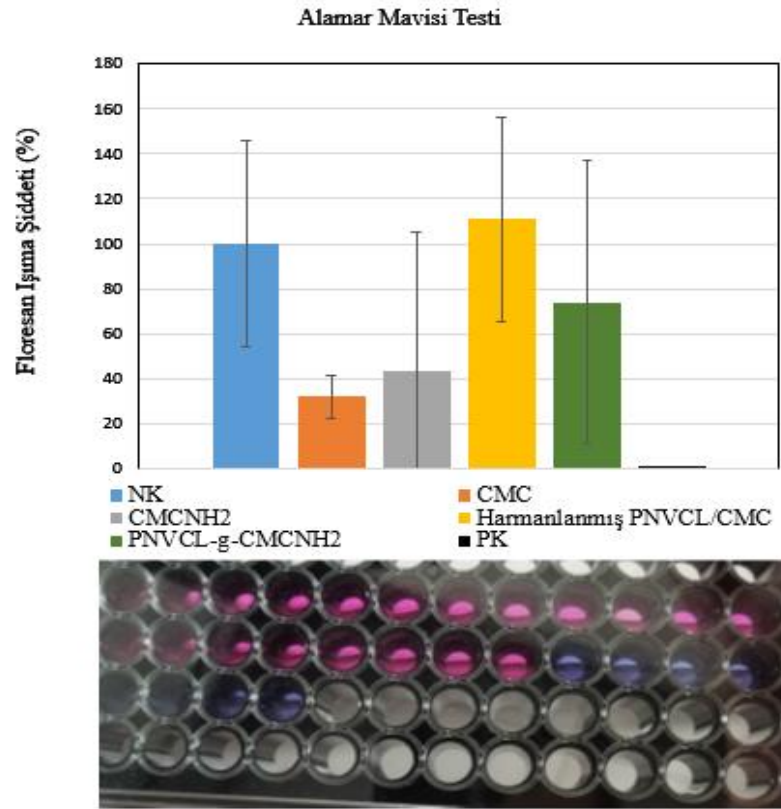
etkileşen hücrelerin hücre canlılığı yaklaşık %32 ve %43'lere düşerken, PNVCL ile harmanlanan ve çapraz bağlanan hibrit iskeleler ile etkileştirilen örneklerin hücre canlılığı %110 ve %74 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, biyouyumlu PNVCL ile hibritleştirilen CMC hidrojellerinin polimer çözeltileri daha iyi biyouyumluluğa ve daha az sitotoksisiteye sahiptir.





Şekil 5.28 İndirekt in vitro sitotoksisite testindeki hücrelerin faz kontrast mikroskobu görüntüleri a) NK b) CMC c) CMCNH₂ d) harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH₂ ile etkileştirilmiş hücrelerin 4X ve 10X görüntüleri

Yapısında fonksiyonel -COOH grupları bulunduran hidrojellerin yüzeylerinin negatif yüklenmesi sonucunda hücre canlılığı ve büyümesinin azaldığı rapor edilmiştir. Fonksiyonel grupların sayısının artması ile bu etkinin arttığı belirtilmiştir (Webb vd. 1998). Saf CMC hidrojellerinde fonksiyonel anyonik -COO^- gruplarının sayısının en yüksek olması nedeniyle hücre canlılığındaki en fazla düşüş bu grupta gözlenmiştir. Fonksiyonel -COOH grupların aminolanması ile COO^- gruplarının azalması nedeniyle hücre canlılığı CMCNH_2 gruplarında artmıştır. PNVCL ile harmanlanmış ve aşılınmış CMC örneklerinde yüklü fonksiyonel grupların çapraz bağlanmalarda kullanılması ve malzeme yüzeyinde sayılarının daha da azalması ile hücre canlılığının önemli ölçüde arttığı düşünülmektedir.



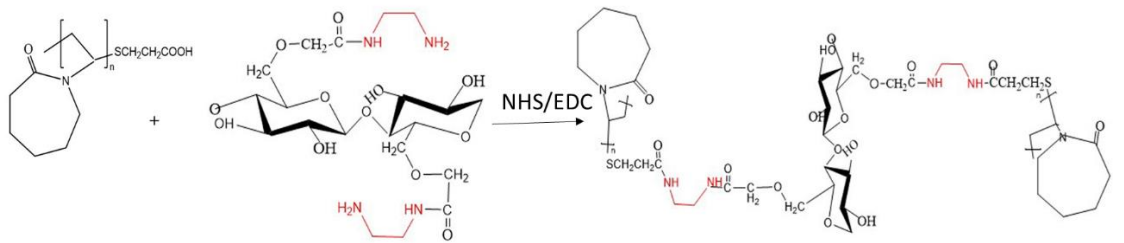
Şekil 5.29 İndirekt in vitro sitotoksisite testinde a) NK b) CMC c) CMCNH_2 d) harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g- CMCNH_2 ile etkileştirilmiş hücrelerin canlılıklarının alamar mavisi testi ile belirlenmesi

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Doğal kaynaklı polimerlerin mekanik dayanımının az olması nedeniyle, sentetik kaynaklı polimerlerle birlikte hibrit kullanımına gerek duyulmaktadır. Mekanik özellik ile biyouyumluluğu geliştirmek için hem fiziksel hem de kimyasal çapraz bağlamanın birlikte kullanılması hibrit hidrojel sistemlerinin geliştirilmesinde çeşitli avantajlar sağlamaktadır.

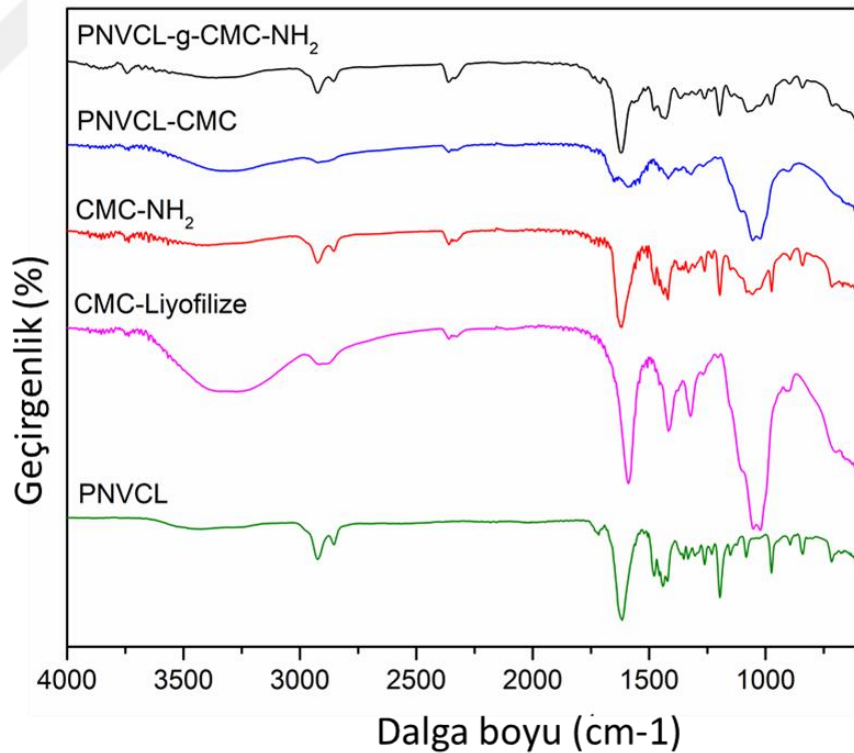
Sunulan bu yüksek lisans tezi, üç önemli kısma ayrılmıştır (i) öncü fonksiyonel PNVCL-COOH ve CMC-NH₂ sentezi (ii) Fonksiyonel polimerlerle, kimyasal çapraz bağlı sıcaklığa duyarlı PNVCL-g-CMCNH₂ ve harmanlanmış PNVCL/CMC hibrit hidrojel sentezi ve (iii) sentezlenen ve optimize edilen hibrit hidrojellerin, sıcaklığa duyarlı ilaç salımı için kullanılabilirliği.

Fonksiyonel PNVCL-COOH monomeri olan NVCL'dan, serbest radikal tepkimesi ile merkaptopropiyonik asit (MPA) kullanılarak elde edilmiştir (Prabaharan 2008). Fonksiyonel CMCNH₂ ise, hiyaluronik asit (HA)'ın amino'lanması için (HA-NH₂) için önerilen yönteme benzer bir yöntemle elde edilmiştir (Tan vd. 2011). EDA'nın amino gruplarından biri, CMC nin serbest karboksil grupları ile reaksiyona sokularak (-CONH₂) amid bağı ile CMC'ye bağlanırken ve ikinci serbest amino (NH₂) grubu, fonksiyonel PNVCL-COOH kovalent amid bağı ile bağlanarak hibrit yapı oluşturulmuştur.



Şekil 6.1 Sıcaklığa duyarlı PNVCL-g-CMCNH₂ hibrit hidrojel sentezi

Saf CMC ve PNVCL polimerlerine ait literatürdeki karakteristik FTIR piklerine ilave olarak, sentezlenen fonksiyonel ürünlere CMC-NH₂ ve PNVCL-COOH ait piklerin varlığı ortaya konulmuştur. Saf CMC ye ait 1589 cm⁻¹'deki COO⁻Na⁺ grubuna ait gerilme pikinin tepkimeler sonunda kaybolması, çalışmada istenilen çapraz bağlanmaların gerçekleştiğinin kanıtıdır. CMC'nin, EDA (etilen diamin, NH₂-CH₂-CH₂-NH₂) kullanılarak fonksiyonlandırıldığı ve oluşan CMCNH₂ ürününe ait 1546 cm⁻¹ gözlenen yeni amid II piki (-CONHR), başarıyla modifiye edildiğini göstermiştir. Monomer NVCL'dan sentezlenen fonksiyonel PNVCL-COOH'a ait yeni FTIR piki 1620 cm⁻¹ ve 3425 cm⁻¹'de -OH grubuna ait pikin varlığı ile kanıtlanmıştır. Hibrit hidrojellerin sentezi için PNVCL ve CMC çözeltilerinin karıştırıldığı ve fiziksel olarak harmanlandığı yapılarda ise -COOH grubuna ait gerilme piki 1625 cm⁻¹ ve CMC'ye ait piranoz gruplarına ait pikleri 1057 cm⁻¹'de keskin olarak görülmektedir. PNVCL-g-CMCNH₂ kimyasal olarak hibrit kopolimer oluşturulduğunda CONHR amid II piki 1564 cm⁻¹ gözlemlenirken 1057 cm⁻¹'de pikin şiddetinin de azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 6.2 CMC temelli hidrojellerin toplu FTIR grafiği

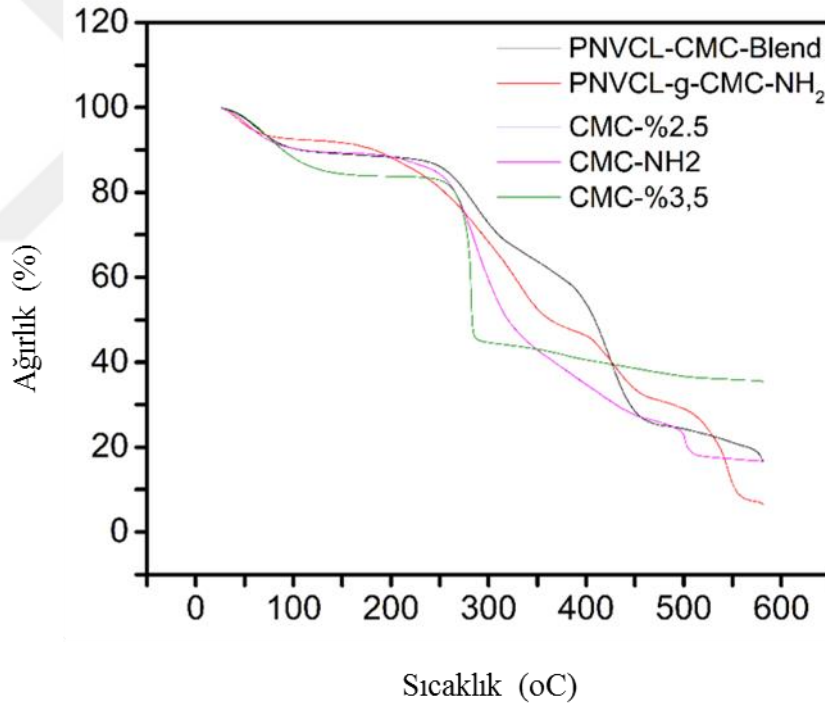
Sentezlenen PNVCL-COOH ve PNVCL-g-CMCNH₂ için HNMR sonuçları incelendiğinde PNVCL'ye ait pikler ve CMCNH₂ ye ait pikler birlikte gözükmemektedir. İki polimerin birbiri ile kovalent konjugasyonu ile CMC ¹HNMR pikleri 3.1 ppm'den sonraki bölgededir ve EDA'ya ait pikler de 3.46 ppm'de yer alır. PNVCL'nin pikleri ile karşılaştırıldığında bu bölgede pik bulunmamaktadır. Bu sonuçlar sentezlerin başarılı olduğunu kanıtlar.

Selüloz türevli moleküller arasında CMC'nin bir faz geçiş sıcaklığının (LCST) olmadığı sıcaklığa bağlı bir davranış göstermediği ve 140°C'ye kadarki sıcaklıklarda termal olarak dayanıklı olduğu rapor edilmiştir (Abdelrahim vd. 1994, Jain vd. 2023). Bu tez kapsamında, çözeltilerin faz geçiş sıcaklığının belirlenmesi için 25°C ve 42°C sıcaklık aralığında geçirgenlikleri belirlenmiştir. Literatüre uygun şekilde CMC ve CMCNH₂ çözeltilerinin geçirgenliklerinde sıcaklığa bağlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Ancak sıcaklığa duyarlı özelliğe sahip PNVCL ile harmanlanan ve konjuge edilen CMC içeren hidrojenlerin sıcaklığa bağlı faz geçişlerinin olduğu şeffaf yapıda olan çözeltilerin beyaz opak yapıya geçtikleri gözlenmiştir. Harmanlanmış ve kovalent olarak çapraz bağlanmış örneklerin LCST değerlerinin oldukça farklı olduğu görülmüştür. PNVCL ve CMC polimerlerinin harmanlanması ile polimer zincirlerinin fiziksel olarak içiçe geçmesiyle IPN hidrojel yapı oluşmuş ve elde edilen çözeltinin 32°C'de faz geçişi belirlenmiştir. Uzun zincirli ve viskoz yapıdaki CMC üzerine PNVCL zincirlerinin sıcaklıkla agregatlaşması ile faz geçişi kolay olmuş ve daha düşük sıcaklıkta gerçekleşmiştir. Oysa CMCNH₂ sentezi sırasındaki kimyasal işlemler nedeniyle CMC polimerlerinin zincir uzunluğu kısalmış ve viskozitesi de azalmıştır. Bu durumda kısa zincirler arasında molekül içi ve moleküller arası etkileşimlerin artması nedeniyle suyun uzaklaşması zorlaşmış ve faz geçiş sıcaklığı 39°C'de gerçekleşmiştir.

Tez kapsamında farklı hidrojenlerden elde edilen disk şeklindeki üç boyutlu iskelelerin boyutlarında önemli farklılıklar görülmemesine rağmen, kuru ağırlıkları bakımından PNVCL ilave edilmiş örnekler yaklaşık iki kat ağırlığa sahiptirler. Yapısal olarak CMC ve harmanlanmış PNVCL/CMC örneklerinin daha düz ve sert yapıda olduğu, kovalent çapraz bağlı hibrit PNVCL-g-CMCNH₂ ve CMCNH₂ örneklerinin ise göfret yapıda olduğu gözlenmiştir. Bu yapıların oluşturulmasında kullanılan çapraz bağlayıcılardan

kaynaklı bir durum olduğu düşünülmektedir. Üç boyutlu iskelelerin çözücü ortamındaki yapılarına bakıldığında CMC ve harmanlanmış PNVCL/CMC örneklerinin daha katı ve opak yapıda olduğu ancak CMCNH₂ ve PNVCL-CMCNH₂ örneklerinin daha şeffaf ve hidrojel yapılı olduğu gözlenmiştir.

Herbir gruba ait üç boyutlu iskelelerin termal davranışları incelendiğinde CMC ve CMCNH₂'nin ve iki aşamalı bir bozunmaya sahip olduğu, fiziksel ya da kimyasal olarak PNVCL'nin eklendiği ürünlerde ise bozunmanın üç aşamalı olduğu ve maksimum bozunma sıcaklığının ve termal kararlılığının arttığı görülmüştür. Harmanlanmış örneğin TGA eğrisinde CMC'ye ait karakteristik bozunma eğrisi daha net görülmektedir. PNVCL ile kovalent çapraz bağlı yapılarda 550 °C'de kütle kaybı %90 olarak bulunmuştur.



Şekil 6.3 CMC temelli örneklerin toplu TGA grafikleri

Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile ürünlere ait iskelelerin yüzeyinin üç boyutlu görüntüleri incelendiğinde CMC ve CMCNH₂ iskelelerinde gözenekli yapının oluştuğu, gözeneklerin homojen büyüklük ve dağılımda olduğu ve birbiriyle bağlantılı olduğu belirlenmiştir. PNVCL-g-CMCNH₂ hibrit iskele yapılarının SEM görüntülerinde ise

yüzeyde daha gözeneksiz tabakanın olduğu ve CMC iskelelerine göre kesitlerin daha az gözeneğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Hidrojel yapılarının oluşmasında CMC ve CMCNH₂ zincirleri Al⁺³ iyonları ile zincirler arası köprüler oluşturarak fiziksel çapraz ile ağ yapılı jel oluşumunu sağlarken, Harmanlanmış örneklerde PNVCL zincirleri bu ağ yapının içine yerleşmesi ile IPN hidrojel yapılar oluşturulmuştur. PNVCL-g-CMCNH₂ hibrit kopolimer sentezi sırasında hem kovalent çapraz bağ oluşumu için EDC/NHS çapraz bağlama yöntemi sonra Al⁺³ iyonları iyonik çapraz bağlama yöntemi kullanılmıştır.

Su tutuculuk analizi sonuçları incelendiğinde, hidrofilik hidroksil ve karboksilik gruplarına ek olarak CMC, su ve nemi yapısında adsorpladığı için süper emiciler olarak çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır (Nan vd. 2019). Bu tez kapsamında fiziksel ya da kimyasal sentetik ve sıcaklığa duyarlı PNVCL zincirlerinin ilavesi ile oluşturulan hibrit sistemlerin su tutuculuk özelliğinin CMC'ye göre azaldığı belirlenmiştir. Sıcaklığa duyarlı bir su tutuculuk özelliği her iki hibrit iskele örneklerinde de görülmektedir ve 4°C'de daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Su tutuculukları ilk 30 dk da dengeye ulaşmıştır, bu durumun, yapılarındaki çok sayıdaki hidrofilik fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle gerçekleştiği ifade edilmiştir (Song vd. 2019) En yüksek su tutuculuğu PNVCL-g-CMCNH₂ iskele yapılarının 4°C'de olduğu ve 40°C'deki su tutuculuğa göre %30 daha fazla su molekülünün iskele yapıda adsorplandığı bulunmuştur. CMC ve CMCNH₂'de serbest polar gruplar (-COO, -NH₂, -OH) yapılarında daha fazla su tutmalarını sağlarken, fiziksel ya da kimyasal olarak ortama giren PNVCL grupları, su molekülleri ile etkileşimi azaltmıştır. Su tutma kapasitesinin çapraz bağlanma yöntemi ve miktarının yanında yapıda bulunan iyonlaşabilen grupların sayısı ile de orantılı olduğu rapor edilmiştir. CMC ve CMCNH₂ hidrojellerinin fonksiyonel iyonlaşabilen gruplar olan -COO⁻ ve NH₃⁺ gruplarının, elektrostatik itme sonucunda yapının zincirlerinin düzgün şekilde uzaması sonucunda, Al⁺³ iyonları ile çapraz bağlanmaların azalacağı ve zamanla daha gevşek bir yapının olabileceği bildirilmiştir (Nuisin vd.2022).

CMC, CMCNH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC ve PNVCL-g-CMCNH₂ hidrojellerinin bozunma yüzdeleri, 4°C’de 14 günlük inkübasyondan sonra yaklaşık % 5, % 17, % 55 ve % 60 olarak belirlenirken bu iskelelere yüklenen ilacın kümülatif salımı % 77, % 80, % 77 ve % 80 olarak belirlenmiştir. 40 °C’de biyobozunma % 7, % 30, % 65, ve % 70 olarak belirlenirken kümülatif ilaç salımı % 68, % 72, % 73 ve % 71 olarak belirlenmiştir. Tüm örneklerde, LCST sıcaklığının üzerinde (40 °C) biyobozunurluk artmasına rağmen, ilaç salımında bir azalma belirlenmiştir. Bu durum faz geçiş sıcaklığının üzerinde büzülme ile daha kompakt yapının oluşumu ile daha küçük gözenekli yapının oluşumu ile açıklanabilir. CMC hidrojellerinin, istenilen seviyede ilaç konsantrasyonunu yavaş salınım yoluyla uzun süre gerçekleştirebileceği ve böylece ilaç toksisitesini ve yan etkileri azaltacağı belirtilmiştir (Zheng vd. 2022).

CMC, CMCNH₂, harmanlanmış PNVCL/CMC PNVCL-g-CMCNH₂ iskelelerin sitotoksiteleri karşılaştırıldığında, yüzde hemoliz değerleri sırasıyla %0,5, 0,25, 0,5 ve 0,4 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre tez kapsamındaki hidrojellerin hemolitik test standardına (<%5) uygun olduğu ve örneklerin iyi kan uyumluluğuna sahip olduğunu gösterilmiştir.

Diğer indirekt sitotoksite testi olan %Alamar Mavisi hücre canlılığı sonuçları Çizelge 6.1’de verilmiştir. CMC ve CMCNH₂ gruplarında belirlenen düşük hücre canlılığı, zincir yapılarındaki iyonik yapıli grupların varlığı ve sayısına bağlanmıştır. Harmanlanmış ve konjuge edilmiş hibrit sistemlerde ise artan hücre canlılığı bu yapıların eldesinde kullanılan yöntemler sonucunda kimyasal ve fiziksel çpaz bağlanmalar nedeniyle serbest fonksiyonel grupların sayısını ve biyouyumlu PNVCL’ye atfedilmiştir.

Çizelge 6.1 Üç boyutlu hidrojel iskeleler ile etkileştirilen adipoz mezankimal hücrelerinin Alamar mavisi testi ile belirlenen hücre canlılıkları (%)

Grup	Hücre Canlılığı (%)
Negatif Kontrol	%100
CMC	32
CMCNH ₂	43
Harmanlanmış PNVCL/CMC	111
PNVCL-g-CMCNH ₂	74
Pozitif Kontrol	0

Doğal polisakkarit yapıları CMC hidrojellerinin mekanik dayanımlarını artırmak ve çevresel uyarılara duyarlı ilaç salımını gerçekleştirebilecek iskele yapıları geliştirmek üzere polimer zincirleri fonksiyonlandırılmış ve ikili çapraz bağlama yöntemi ile başarılı hidrojel yapıları elde edilmiştir. Sentezlenen fonksiyonel polimerlerin ve hibrit hidrojel yapılarının kimyasal karakterizasyonu yapılarak sentezlerin başarılı olduğu, yapıya katılan PNVCL ile CMC temelli iskeleleri sıcaklığa duyarlılık kazandığı, faz geçiş sıcaklığının kovalent çapraz bağlı sistemlerde daha yüksek olduğu, termal bozunmalarının daha yüksek sıcaklıklara kaydığı ortaya konulmuştur. Ayrıca sentezlenen hidrojellerin sıcaklığa duyarlılık kazanması ile önemli özelliklerinin (su tutuculukları, biyobozurlukları ve ilaç salımlarının) bu değişiklikten etkilendiği rapor edilmiştir. Modifiye polimerler kullanılarak sentezlenen hidrojellerin, sitotoksikite ve hemoliz test sonuçları malzemelerin biyouyumlu olduğunu ve hücreler üzerinde toksik bir etkisinin bulunmadığını göstermiştir.

Gelecekte, modifiye edilebilir fonksiyonel ve akıllı polimerler ile, farklı çapraz bağlama yöntemleri kullanılarak elde edilecek hibrit CMC hidrojellerinin, ayarlanabilir ilaç salımı yanında diğer medikal alanlarda çeşitli uygulamalara alternatif olarak kullanılabileceği ve bu çalışmalara katkı sağlayabileceği ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelrahim, K.A., Ramaswamy, H.S., Doyon, G., Toupin, C. (1994). Effects of concentration and temperature on carboxymethylcellulose rheology. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 29; 243–253.
- Adamiak, K., & Sionkowska, A. (2020). Current methods of collagen cross-linking. *International journal of biological macromolecules*, 161, 550-560.
- Agnihotri, S.A., Aminabhavi, T.M. (2005). Development of Novel Interpenetrating Network Gellan Gum-Poly(vinyl alcohol) Hydrogel Microspheres for the Controlled Release of Carvedilol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31; 491-503.
- Barik, S. (2019). *Chapter 18 - Layered Double Hydroxide-Decorated Hydrogel for Biomedical Applications*. *Nanostructured Polymer Composites for Biomedical Applications*. Micro and Nano Technologies, 367-383.
- Barouti, G., Liow, S. S., Dou, Q., Ye, H., Orione, C., Guillaume, S. M., & Loh, J. X. (2016). New Linear and Star-Shaped Thermogelling Poly([R]-3-hydroxybutyrate) Copolymers. *Chemistry A European Journal*, 10501-12.
- Bhattacharya, S.S., Ghosh, A.K., Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Ghosh, A. (2012). Al³⁺ ion cross-linked interpenetrating polymeric network microbeads from tailored natural polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.*, 51; 1173–1184.
- Bi, S., Wang, C., Cao, Q., Zhang, C. (2004). Studies on the mechanism of hydrolysis and polymerization of aluminum salts in aqueous solution: correlations between the “Core-links” model and “Cage-like” Keggin-Al₁₃ model. *Coordination Chemistry Reviews*, 248; 441-455.
- Bokias, G., Mylonas, Y., Staikos, G., Bumbu, G. G., Vasile, C. (2001). Synthesis and Aqueous Solution Properties of Novel Thermoresponsive Graft Copolymers Based on a Carboxymethylcellulose Backbone. *Macromolecules*, 34; 4958-4964.
- Bromberg, L. E., & Ron, E. S. (1998). Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 197-221.
- Bulpitt, P, Aeschlimann, D. (1999). New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* 47; 152 – 169.
- Byrne, M. E., Park, K., & Peppas, N. A. (2002). Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*, 54(1), 149-161.
- Cai, M-H., Chen, X-Y., Fu, L-Q., Du, W-L., Yang X., Mou, X-Z., Hu P-Y. (2021). Design and Development of Hybrid Hydrogels for Biomedical Applications: Recent Trends in Anticancer Drug Delivery and Tissue Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* Vol 9.
- Chiono, V., Pulieri, E., Vozzi, G., Ciardelli, G., Ahluwalia, A., & Giusti, P. (2008). Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 889-898.
- Choi, C., Kim, S., Cha, C. (2021). Dual-functional alginate crosslinker: Independent control of crosslinking density and cell adhesive properties of hydrogels via separate conjugation pathways. *Carbohydr. Polym.*, 252; 117128.

- Chu, L.-Y., Li, Y., Zhu, J. H., Wang, H. D., & Liang, Y. J. (2004). Control of pore size and permeability of a glucose-responsive gating membrane for insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, 43-53.
- Cortez-Lemus, N. A., Licea-Claverie, A. (2016). Poly(N-vinylcaprolactam), a comprehensive review on a thermoresponsive polymer becoming popular. *Progress in Polymer Science* 53; 1–51.
- Dahlan, N.A., Pushpamalar, J., Veeramachineni, A.K., Muniyandy, S. (2018). Smart hydrogel of carboxymethyl cellulose grafted carboxymethyl polyvinyl alcohol and properties studied for future material applications. *J. Polym. Environ.*, 26; 2061–2071.
- Dimida, S., Demitri, C., De Benedictis, V. M., Scalera, F., Gervaso, F., & Sannino, A. (2015). Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(28).
- Dreiss, C.A. (2020). Hydrogel design strategies for drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 48;1–17.
- Durkut, S., Elcin, Y. M. (2020). Synthesis and characterization of thermo sensitive poly(N-vinylcaprolactam)-grafted-aminated alginate hydrogels. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 221; 1900412-1900423.
- Durkut, S. (2019). Thermoresponsive poly (N-vinylcaprolactam)-g-galactosylated chitosan hydrogel: synthesis, characterization, and controlled release properties *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 68; 1034-1047.
- Durkut, S., Elcin, Y. M. (2017). Synthesis and characterization of thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam)-g-collagen. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45; 1665-1674.
- Eslahi, N., Abdorahim, M., Simchi, A. (2016). Smart Polymeric Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering: A Review on the Chemistry and Biological Functions. *Biomacromolecules*, 3441-3463.
- Filipcsei, G., Feher, J., & Zrinyi, M. (2000). Electric field sensitive neutral polymer gels. *Journal of Molecular Structure*, 109-117.
- Ghadban, A., Ahmed, A. S., Ping, Y., Ramos, R., Arfin, N., Cantaert, B., Miserez, A. (2016). Bioinspired pH and magnetic responsive catechol-functionalized chitosan hydrogels with tunable elastic properties. *Chemical Communications*, 697-700.
- Gil, E. S., Hudson, S. M. (2004). Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Progress in Polymer Science*, 1173-1222.
- Gong, J.P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T., Osada, Y. (2003). Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.*, 15; 1155–1158.
- Ha, C-S., Park, K., Park, S. S., Yun, Y. H. (2017). Mesoporous silica nanoparticles functionalized with a redoxresponsive biopolymer. *J. Porous Mater.* 24; 1215–1225
- He, X., Zeng, L., Cheng, X., Yang, C., Chen, J., Chen, H., Ni, H., Bai, Y., Yu, W., Zhao, K., Hu, P. (2021). Shape memory composite hydrogel based on sodium alginate dual crosslinked network with carboxymethyl cellulose. *European Polymer Journal* 156; 110592.
- He, L., Fullenkamp, D. E., Rivera, J. G., & Messersmith, P. B. (2011). pH responsive self-healing hydrogels formed by boronate–catechol complexation. *Chemical Communications*, 7497-7499.

- Heim, E., Harling, S., Ludwig, F., Menzel, H., & Schilling, M. (2008). Fluxgate magnetorelaxometry for characterization of hydrogel polymerization kinetics and physical entrapment capacity. *Journal of Physics Condensed Matter*.
- Hench, L., & Jones, J. (Eds.). (2005). *Biomaterials, artificial organs and tissue engineering*. Elsevier.
- Hoffman, A.S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 54; 3-12.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18-23.
- Jain, S., Sandhu, P.S., Malvi, R., Gupta, B. (2013). Cellulose derivatives as thermoresponsive polymer: An overview. *J. Appl. Pharm. Sci.*, 3; 139–144.
- Janarthanan, G., Tran, H. N., Cha, E., Lee, C., Das, D., Noh, I. (2020). 3D printable and injectable lactoferrin-loaded carboxymethyl celluloseglycol chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Materials Science & Engineering C* 113: 111008
- Javanbakht, S., Shaabani, A. (2019). Carboxymethyl cellulose-based oral delivery systems. *Int. J. Biol. Macromol.*, 133; 21–29.
- Jeon, O., Bouhadir, K.H., Mansour, J.M., Alsberg, E. (2009). Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, 30; 2724–2734.
- Jung, S., Shin, Y., Kim, D., Hu, Y., Kim, Y., Hong, I. K., Kim, M. S. (2021). pH-Responsive Succinoglycan-Carboxymethyl Cellulose Hydrogels with Highly Improved Mechanical Strength for Controlled Drug Delivery Systems. *Polymers* 13; 3197.
- Kaufmann, G., Klein, M. P., Goettert, M. I., Aguirre, T. A. S. (2022). Development and cytotoxicity evaluation of a cylindrical pH-responsive chitosan-genipin hydrogel for the oral delivery of diclofenac sodium. *European Polymer Journal*, 181, 111649,
- Klouda, L. (2015). Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 338-349.
- Khan, F., Tanaka, M. (2018). Designing smart biomaterials for tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 19:17.
- Koetting, M. C., Peters, J. T., Steichen, S. D., & Peppas, N. A. (2015). Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 1-49.
- Kumar, A. D., Sharma, S., Afgan, S., Kumar, R., Keshari A. K., Srivastava, R. (2018). Development of graft copolymer of carboxymethylcellulose and N-vinylcaprolactam towards strong antioxidant and antibacterial polymeric materials. *International Journal of Biological Macromolecules* 112; 780–787.
- Kumar, B., Priyadarshi, R., Deeba, F., Kulshreshtha, A., Gaikwad, K., Kim, J., Kumar, A., Negi, Y. S. (2020). Nanoporous Sodium Carboxymethyl Cellulose-g-poly (Sodium Acrylate)/FeCl₃ Hydrogel Beads: Synthesis and Characterization. *Gels*, 6; 49.
- Leone, G., Bidini, A., Lamponi, S., Magnani, A. (2013). States of water, surface and rheological characterisation of a new biohydrogel as articular cartilage substitute: a new biohydrogel as articular cartilage substitute. *Polym Adv Technol*. 24; 824–833
- Li, S., Chen, Z., Wang, J., Yan, L., Chen, T., Zeng, Q. (2020). Fabrication and characterization of a novel semi-interpenetrating network hydrogel based on

- sodium carboxymethyl cellulose and poly(methacrylic acid) for oral insulin delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 35; 3–14.
- Li, W., Sun, B., Wu, P. (2009). Study on hydrogen bonds of carboxymethyl cellulose sodium film with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* 78; 454–461.
- Li, J., Mooney, D. J. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*.
- Lim, H. L., Hwang, Y., Kar, M., & Varghese, S. (2014). Smart hydrogels as functional biomimetic systems. *Biomaterials Science*, 603-618.
- Lin, C.-C., & Metters, A. T. (2006). Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1379-1408.
- Lipatov, Y. S. (2002). Polymer blends and interpenetrating polymer networks at the interface with solids. *Progress in Polymer Science*, 1721-1801.
- Liu, M., Song, X., Wen, Y., Zhu J-L., Li, J. (2017). Injectable Thermoresponsive Hydrogel Formed by Alginate-g-Poly(N-isopropylacrylamide) That Releases Doxorubicin-Encapsulated Micelles as a Smart Drug Delivery System. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9; 35673–35682.
- Liu, J., Zhang, C., Zhang, L., Miao, D., Sui, S., Deng, F., & Zhu, P. (2019). Preparation and properties of carboxymethyl cellulose hydrogels. *Ferroelectrics*, 547(1), 37-43.
- Lizawa, T., Taketa, H., Maruta, M., Ishido, T., Gotoh, T., & Sakohara, S. (2007). Synthesis of porous poly(N-isopropylacrylamide) gel beads by sedimentation polymerization and their morphology. *Journal of Applied Polymer Science*, 842-850.
- Loh, X. J., Goh, S. H., & Li, J. (2007). New Biodegradable Thermogelling Copolymers Having Very Low Gelation Concentrations. *Biomacromolecules*, 585-593.
- Mahinroosta, M., Farsangi, Z. J., Allahverdi, A., & Shakoory, Z. (2018). Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Materials Today Chemistry*, 42-55.
- Mano, J. F. (2008). Stimuli-Responsive Polymeric Systems for Biomedical Applications. *Advanced Engineering Materials*, 515-527.
- Mantha, S., Pillai, S., Khayambashi, P., Upadhyay, A., Zhang, Y., Tao, O., Tran, S. D. (2019). Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials*, 12; 3323.
- Marques, N. N., Balaban, R. C., Halila, S., Borsali, R. (2018). Synthesis and characterization of carboxymethylcellulose grafted with thermoresponsive side chains of high LCST: The high temperature and high salinity self-assembly dependence. *Carbohydrate Polymers* 184; 108–117.
- Marsili, L., Bo, M. D., Eisele, G., Donati I., Berti, F., Toffoli, G., (2021). Characterization of Thermoresponsive Poly-N-Vinylcaprolactam Polymers for Biological Applications. *Polymers*, 13; 2639.
- Maolin, Z., Jun, L., Min, Y., & Hongfei, H. (2000). The swelling behavior of radiation prepared semi-interpenetrating polymer networks composed of polyNIPAAm and hydrophilic polymers. *Radiation Physics and Chemistry*, 397-400.
- Michaelis, J. U., Kiese, S., Amann T., Folland, C., Asam, T., Eisner, Peter Thickening (2023). Properties of Carboxymethyl Cellulose in Aqueous Lubrication. *Lubricants*, 11; 112.

- Mocanu, G., Mihai, D., Dulong, V., Picton, L., Cerf, D., & Moscovici, M. (2011). Anionic polysaccharide hydrogels with thermosensitive properties. *Carbohydrate Polymers*, 52-59.
- Moon, H. J., Ko, D. Y., Park, M. H., Joo, M. K., & Jeong, B. (2012). Temperature-responsive compounds as in situ gelling biomedical materials. *Chemical Society Reviews*, 4860-4883.
- Municoy, S., Álvarez Echazú, M.I., Antezana, P.E., Galdopórpora, J.M., Olivetti, C., Mebert, A.M., Foglia, M.L., Tuttolomondo, M.V., Alvarez, G.S., Hardy, J.G., (2020). Stimuli-responsive materials for tissue engineering and drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.*, 21; 4724.
- Nan, C., Fitrah, N., Norhazlin, Z., Mansor, A.A. (2019) Preparation and swelling study of CMC hydrogel as potential superabsorbent. *Per-tan. J. Sci. Technol.* 27, 489–498.
- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., & Pijnenborg, R. (2007). The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human reproduction*, 22(5), 1304-1309.
- Nep, E., & Conway, B. (2011). Grewia Gum 2: Mucoadhesive Properties of Compacts and Gels. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 393-401.
- Nuisin, R., Siripongpreda, T., Watcharamul, S., Siralermukul, K., Kiatkamjornwong, S. (2022). Facile Syntheses of Physically Crosslinked Carboxymethyl Cellulose Hydrogels and Nanocomposite Hydrogels for Enhancing Water Absorbency and Adsorption of Sappan Wood Dye. *Materials Science inc. Nanomaterials & Polymers, ChemistrySelect*, 7; 1-10.
- Oustadi, F., Imani, R., Haghbin Nazarpak, M., & Sharifi, A. M. (2020). Genipin-crosslinked gelatin hydrogel incorporated with PLLA-nanocylinders as a bone scaffold: synthesis, characterization, and mechanical properties evaluation. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(8), 1783-1792.
- Ottenbrite, R. M., Park, K., & Okano, T. (2010). *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*. New York: Springer.
- Palmese, L. L., Thapa, R. K., Sullivan, M. O., & Kiick, K. L. (2019). Hybrid hydrogels for biomedical applications. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 143-157.
- Qi, C., Yan, X., Huang, C., Melerzanov, A., & Du, Y. (2015). Biomaterials as carrier, barrier and reactor. *Protein&Cell*, 638-653.
- Qureshi, D., Nayak, S. K., Maji, S., Anis, A., Kim, D., Pal, K. (2019). Environment sensitive hydrogels for drug delivery applications. *European Polymer Journal*, 120; 109220.
- Palmese, L. L., Thapa, R. K., Sullivan, M. O., & Kiick, K. L. (2019). Hybrid hydrogels for biomedical applications. *Current opinion in chemical engineering*, 24, 143-157.
- Parhi, R. (2017). Cross-linked hydrogel for pharmaceutical applications: A review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(4), 515-530.
- Park, J. B., & Bronzino, J. D. (2002). *Biomaterials: Principles and Applications*. CRC PRESS.
- Park, S. H., Shin, H. S., Park, S. N. (2018). A novel pH-responsive hydrogel based on carboxymethyl cellulose/2- hydroxyethyl acrylate for transdermal delivery of naringenin. *Carbohydrate Polymers*, 200; 341–352.
- Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., & Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 27-46.

- Podual, K., Doyle III, F. J., & Peppas, N. A. (2000). Preparation and dynamic response of cationic copolymer hydrogels containing glucose oxidase. *Polymer*, 3975-3983.
- Prabaharan, M., Grailer, J. J., Steeber, D. A., Gong, S. (2008). Stimuli-Responsive Chitosan-graft-Poly(N-vinylcaprolactam) as a Promising Material for Controlled Hydrophobic Drug Delivery. *Macromol. Biosci.*, 8; 843.
- Prabaharan, M., & Mano, J. F. (2006). Stimuli-Responsive Hydrogels Based on Polysaccharides Incorporated with Thermo-Responsive Polymers as Novel Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 991-1008.
- Priya, G., Narendrakumar, U., Manjubala, I. (2019). Thermal behavior of carboxymethyl cellulose in the presence of polycarboxylic acid crosslinkers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 138; 89–95.
- Pushpamalar, V., Langford, S. J., Ahmad, M. and Lim, Y. Y. (2006). Optimization of Reaction Conditions for Preparing Carboxymethyl Cellulose from Sago Waste. *Carbohydrate Polymers* 64; 312-318.
- Rahman, S., Hasan, S., Nitai, A., Nam, S., Karmakar, A., Ahsan, S., Shiddiky, M., Ahmed, M. (2021). Recent Developments of Carboxymethyl Cellulose. *Polymers*, 13; 1345.
- Ramos, J., Imaz, A., Forcada, J. (2012) Temperature-sensitive nanogels: poly(N-vinylcaprolactam) versus poly(N-isopropylacrylamide). *Polym. Chem.*, 3: 852–856.
- Ranade, V. V. (1990). Drug Delivery Systems 4. Implants in Drug Delivery. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 871-889.
- Reza, A. T.; Nicoll, S. B. (2010). Characterization of novel photocrosslinked carboxymethylcellulose hydrogels for encapsulation of nucleus pulposus cells. *Acta Biomater.*, 6; 179–186.
- Rizwan, M., Yahya, R., Hassan, A., Yar, M., Azzahari, A. D., Selvanathan, V., Abouloula, C. N. (2017). pH Sensitive Hydrogels in Drug Delivery: Brief History, Properties, Swelling, and Release Mechanism, Material Selection and Applications. *Polymers*, 9-137.
- Sala, R. L., Kwon, M. Y., Kim, M., Gullbrand, S. E., Henning, E. A., Mauck, R. L., Camargo, E. R., Burdick, J. A. (2017). Thermosensitive Poly(N-vinylcaprolactam) Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part. A.*, 23; 935-945.
- Sanoj Rejinold, S N., Muthunarayanan, M., Divyarani, V.V., Sreerekha, P.R., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., Tamura, H., Jayakumar, R. (2011). Curcumin-loaded biocompatible thermoresponsive polymeric nanoparticles for cancer drug delivery. *J. Colloid Interface Sci.* 360; 39–51.
- Sapula, P., Bialik-Was, K., & Malarz, K. (2023). Are Natural Compounds a Promising Alternative to Synthetic Cross-Linking Agents in the Preparation of Hydrogels?. *Pharmaceutics*, 15(1), 253.
- Satarkar, N. S., & Hilt, Z. J. (2008). Magnetic hydrogel nanocomposites for remote controlled pulsatile drug release. *Journal of Controlled Release*, 246-251.
- Sharmila, C., Muthukumaran, C., Kirthika, S., Keerthana, S., Kumar, N.M., Jeyanthi, J. (2020). Fabrication and characterization of *Spinacia oleracea* extract incorporated alginate/carboxymethyl cellulose microporous scaffold for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.*, 156; 430-437.

- Siepmann, J., & Peppas, N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 163-174.
- Shin, Y., Kim, D., Hu, Y., Kim, Y., Hong, I. K., Kim, M. S., Jung, S., (2021). pH-Responsive Succinoglycan-Carboxymethyl Cellulose Hydrogels with Highly Improved Mechanical Strength for Controlled Drug Delivery Systems. *Polymers* 13; 3197.
- Song, L., Liu, F., Zhu, C., Li, Aimin (2019). Facile one-step fabrication of carboxymethyl cellulose based hydrogel for highly efficient removal of Cr(VI) under mild acidic condition. *Chemical Engineering Journal* 369; 641–651.
- Sood, N., Bhardwaj, A., Mehta, S., & Mehta, A. (2014). Stimuli-responsive hydrogels in drug delivery and tissue engineering. *Drug Delivery*, 748-770.
- Şeker, Ş., Arslan Y. E., Durkut, S., Elçin, A. E., Elçin, Y. M., (2014). *Nanopatterning and Nanoscale Devices for Biological Applications* CRC Press, Editör: Şeila Selimovic, Krzysztof Iniewski, Basım sayısı: 1, Sayfa Sayısı 417.
- Tan, H., Li, H., Rubin, J. P., Marra, K. G (2011). Controlled Gelation and Degradation Rates of Injectable Hyaluronic Acid-based Hydrogels through a Double Crosslinking Strategy. *J Tissue Eng Regen Med.* 5; 790–797.
- Taubner, T., Synytsya, A., Copíková, J. (2015). Preparation of amidated derivatives of carboxymethylcellulose. *International Journal of Biological Macromolecules* 72; 11–18.
- Toledo, P. V. O., Limeira, D. P. C., Siqueira, N. C., Petri, D. F. S. (2019). Carboxymethyl cellulose/poly(acrylic acid) interpenetrating polymer network hydrogels as multifunctional adsorbents. *Cellulose* 26; 597–615.
- Trujillo, S., Seow, M., Lueckgen, A., Salmeron-Sanchez, M., Cipitria, A. (2021). Dynamic Mechanical Control of Alginate-Fibronectin Hydrogels with Dual Crosslinking: Covalent and Ionic. *Polymers*, 13, 433.
- Uyanga, K. A., Daoud, W. A. (2021). Carboxymethyl cellulose-chitosan composite hydrogel: Modelling and experimental study of the effect of composition on microstructure and swelling response. *International Journal of Biological Macromolecules* 181, 1010–1022.
- Vasile, C., Bumbu, G.G., Dumitriu, R.P., Staikos, G. (2004). Comparative study of the behavior of carboxymethyl cellulose-g-poly(N-isopropylacrylamide) copolymers and their equivalent physical blends. *Eur. Polym. J.*, 40, 1209–1215.
- Varma, D. M., Gold, G. T., Taub, P. J., Nicoll, S. B. (2014). Injectable carboxymethylcellulose hydrogels for soft tissue filler applications. *Acta Biomater.*, 10; 4996-5004.
- Verma, N., Pramanik, K., Singh, A.K., Biswas, A. (2021). Design of magnesium oxide nanoparticle incorporated carboxy methyl cellulose/poly vinyl alcohol composite film with novel composition for skin tissue engineering. *Mater. Technol.*, 1–11.
- Vihola, H.; Laukkanen, A.; Hirvonen, J.; Tenhu, H. (2002). Binding and release of drugs into and from thermosensitive poly(N-vinyl caprolactam) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 16; 69–74.
- Vigata, M., Meinert, C., Hutmacher, D.W., Bock, N. (2020). Hydrogels as drug delivery systems: A review of current characterization and evaluation techniques. *Pharmaceutics*.12; 1188.

- Wang, M., Wang, L. (2013). Synthesis and characterization of carboxymethyl cellulose/organic montmorillonite nanocomposites and its adsorption behavior for Congo Red dye. *Water Science and Engineering*. 6; 272-282.
- Webb, K., Hlady, V., Tresco, P.A. (1998). Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 2T3 fibroblast attachment, spreading and cytoskeletal organization. *J Biomed Mater Res*. 41; 422-30.
- Willerth, S. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2019). Combining Stem Cells and Biomaterial Scaffolds for Constructing Tissues and Cell Delivery. *Stem Journal*, 1-25.
- Yang, L., Chu, J. S., & Fix, J. A. (2002). Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal Of Pharmaceutics*, 1-15.
- Zhang, X-Z., Zhuo, R-X. (2000). Preparation of fast responsive, thermally sensitive poly(N-isopropylacrylamide) gel. *European Polymer Journal* 36; 2301-2303.
- Zhang, C., Subramanian, H., Grailer, J.J., Tiwari, A., Pilla, S., Steeber, D.A., Gong, S., (2009). Fabrication of biodegradable poly(trimethylene carbonate) networks for potential tissue engineering scaffold applications, *Polym. Advan. Technol.*, 20; 742-747.
- Zhang, Z., Qiao, X. (2021). Influences of cation valence on water absorbency of crosslinked carboxymethyl cellulose. *Int. J. Biol. Macromol.*, 177; 149–156
- Zhang, W., Liu, Y., Xuan, Y., Zhang, S. (2022). Synthesis and Applications of Carboxymethyl Cellulose Hydrogels. *Gels*, 8; 529.
- Zrinyi, M., Szabo, D., & Kilian, H.-G. (1998). Kinetics of the shape change of magnetic field sensitive polymer gels. *Polymer Gels and Networks*, 441-454.