



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN MODİFİYE HYALURONAN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Yüksek Lisans Tezi

Merve KANARGI

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN MODİFİYE
HYALURONAN GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Merve KANARGI

Danışman(lar) : Doç. Dr. Kübra DURKAN
Dr. Lenka MUSILOVA

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı
Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Yüksek
Lisans Programı

İzmir
2023

Merve KANARGI tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Biyomedikal uygulamalar için modifiye hyaluronan geliştirilmesi ve karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06.02.2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

.....

Raportör Üye : :

.....

Üye :

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Biyomedikal Uygulamalar İçin Modifiye Hyaluronan Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06/01/2023

İmzası

Merve Kanargı

ÖZET**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN MODİFİYE
HYALURONAN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

KANARGI, Merve

Yüksek Lisans Tezi

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kübra Durkan

Dr. Lenka Musilova

Ocak 2023, 45 sayfa

Hücre dışı matriste rol alan önemli bir biyopolimer olan hyaluronik asit biyomedikal uygulamalar için ilgi çekici özelliklere sahiptir. Biyouyumlu bir yapıya sahip olan hyaluronik asit özellikle doku mühendisliği ve yara örtüsü gibi tıbbi uygulamalarda kullanılabilecek biyomalzemeler oluşturmak için birçok araştırmaya konu olmaktadır. Ancak, hyaluronik asitin hızlı bozunabilir bir yapıda olması ve sulu ortamlarda hızlıca çözünmesi, bu uygulamalarda kullanılabilirliğini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hyaluronik asitin kimyasal olarak modifiye edilerek bu dezavantajlı özelliklerin üstesinden gelinmesi gerekmektedir.

Bu tezde uzun yağ asidi zincirleri kullanılarak hyaluronik asitin hidrofobik olarak modifiye edilmesi amaçlanmıştır. Palmitik asit, laurik asit ve hekzanoik asit kullanılarak çeşitli hyaluronan türevleri elde edilmiştir. Elde edilen türevler FTIR ile karakterize edilerek modifikasyon doğrulanmıştır. Sonrasında bu türevlerin elektroegirme uygulaması için ön denemeleri yapılmıştır. Özellikle palmitik asit ve laurik asit ile sentezlenen örneklerin elektroegirmede Taylor konisi oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: hyaluronik asit, kimyasal modifikasyon, hidrofobik modifikasyon, elektroegirme

ABSTRACT**DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MODIFIED
HYALURONAN FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

KANARGI, Merve

MSc in Material Science and Engineering

Supervisors: Doç. Dr. Kübra Durkan

Lenka Musilova, Ph.D

January 2023, 45 pages

Hyaluronic acid, an important biopolymer involved in the extracellular matrix, has interesting properties for biomedical applications. Hyaluronic acid, which has a biocompatible structure, has been the subject of many researches to create biomaterials that can be used in medical applications such as tissue engineering and wound dressing. However, the fact that hyaluronic acid is rapidly degradable and dissolves rapidly in aqueous environments makes its use in these applications difficult. Therefore, these disadvantageous properties must be overcome by chemically modifying hyaluronic acid.

In this thesis, it is aimed to hydrophobically modify hyaluronic acid by using long fatty acid chains. Various hyaluronan derivatives were obtained by using palmitic acid, lauric acid and hexanoic acid. The derivatives obtained were characterized by FTIR and the modification was confirmed. Afterwards, preliminary tests of these derivatives were made for the electrospinning application. It was observed that samples synthesized with palmitic acid and lauric acid formed Taylor cone in electrospinning.

Keywords: hyaluronic acid, chemical modification, hydrophobic modification, electrospinning

TEŞEKKÜR

Öncelikle sayın danışmanım Doç. Dr. Kübra Durkan’a rehberliği, değerli önerileri ve destekleri için çok teşekkür ederim. Bu projedeki katkıları ve rehberliğiyle benimle iş birliği içinde çalışan sayın ikinci danışmanım Dr. Lenka Musilova’ya desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Ayrıca, projedeki teknik altyapıyı ve deneysel ekipmanları sağladıkları için Tomas Bata Üniversitesi, Teknoloji Fakültesi içindeki emeği geçen herkese minnettarım. Yardımını ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ümit Hüseyin Kaynar’a da çok teşekkür ederim. Bu proje için yurtdışında bulunmama katkı sağlayan sayın koordinatör hocamız Doç. Dr. Hüseyin Ata Karavana’ya ve Ege Üniversitesi Erasmus ofisi çalışanlarına ve oradaki tüm ihtiyaçlarım konusunda bana destek olan Mirka Milkovich ve Patrik Foltyn’e de minnettarlığımı da belirtmek isterim.

Son olarak sonsuz destekleri ve sabırlarından ötürü sevgili aileme de teşekkürlerimi sunarım.

Merve KANARGI

İÇİNDEKİLER TABLOSU

1.	GİRİŞ.....	1
2.	GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.	Biyopolimerler.....	3
2.2.	Hyaluronan	4
2.2.1.	Tarihsel Perspektif.....	4
2.2.2.	Oluşumu ve Üretilmesi.....	6
2.2.3.	Yapısı ve Özellikleri.....	7
2.3.	Hyaluronanın Modifikasyonu.....	9
2.3.1.	Karboksil Gruplarının Modifikasyonu.....	11
2.3.2.	Hidroksil Gruplarının Modifikasyonu	12
2.4.	Hyaluronan Biyomedikal Uygulamaları.....	12
2.4.1.	Elektroegirme	13
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler	16
3.2.	Kimyasal Modifikasyon Reaksiyonları	16
3.2.1.	Palmitik Asit ile Modifikasyonu.....	16
3.2.2.	Hekzanoik Anhidrit ile Modifikasyon	17
3.2.3.	Laurik Asit ile Modifikasyonu.....	18
3.3.	Malzemelerin Kullanım Miktarları ve Oranları.....	19
3.4.	Çözünme Testleri.....	25
3.5.	Hyaluronan Karakterizasyonu için Yöntemler	26
3.5.1.	Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi.....	26
3.6.	Elektroegirme Denemeleri.....	27
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	29
4.1.	Çözünme Testleri.....	29
4.2.	FTIR Spektroskopisi Sonuçları.....	32
4.2.1.	Modifiye Edilmemiş Hyaluronana ait FTIR Spektroskopisi	32
4.2.2.	Palmitik asit ile modifiye edilmiş hyaluronana ait FTIR Spektroskopisi	34
4.2.3.	Hekzanoik anhidrit ile modifiye edilmiş hyaluronana ait FTIR Spektroskopisi ..	36
4.2.4.	Laurik Asit ile modifiye edilmiş hyaluronana ait FTIR Spektroskopisi.....	37
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	44
	KAYNAKÇA	46
	ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hyaluronanın disakkarit biriminin kimyasal yapısı (A) ve tetrasakkarit birimindeki hidrofobik ve hidrofilik gruplar (B)	8
Şekil 2. Hyaluronanın aktif fonksiyonel bölgeleri (Garg ve Hales, 2004)	10
Şekil 3: Kimyasal Konjugasyon ve Çapraz Bağlanma	10
Şekil 4. Elektroeğirmenin şematik gösterimi (Rahmati vd., 2021)	13
Şekil 5. Taylor Konisi Oluşumu (Al-Hazeem, 2018)	15
Şekil 6. Modifiye edilmemiş hyaluronan tozu: 124 kDa(A), 243 kDa(B), 600 kDa(C)	16
Şekil 7. Palmitik asit modifikasyonu şematik gösterimi	17
Şekil 8. Hekzanoik anhidrit modifikasyonu şematik gösterimi	18
Şekil 9: Laurik asit modifikasyonu şematik gösterimi	19
Şekil 10. Modifiye edilmiş tüm örnekler	25
Şekil 11. (A) FTIR Spektrometre, (B) Hazırlanmış FTIR numuneleri	26
Şekil 12: Elektroeğirme cihazı	27
Şekil 13. Palmitik asit türevleri çözünme testleri	30
Şekil 14. Hekzanoik anhidrit türevleri çözünme testleri	31
Şekil 15. Laurik asit türevleri çözünme testleri	32
Şekil 16. Modifiye edilmemiş hyaluronan FTIR Spektrometresi	33
Şekil 17. HA-C16-1 (MW: 124 kDa, Çözücü: THF) FTIR Spektrumu	34
Şekil 18. HA-C16-2 (MW: 124 kDa, Çözücü: IPA) FTIR Spektrumu	34
Şekil 19. HA-C16-3 (MW:243 kDa Çözücü:THF) FTIR Spektrumu	35
Şekil 20. HA-C16-4 (MW:243 kDa Çözücü: IPA) FTIR Spektrumu	35
Şekil 21. HA-AC-3 (243 kDa)/ HA-AC-2 (124 kDa) FTIR Spektrumları	36
Şekil 22.HA-LA-1 FTIR Spektrumu	38
Şekil 23. HA-LA-2 FTIR Spektrumu	38
Şekil 24. HA-LA-3 FTIR Spektrumu	39
Şekil 25. HA-LA-4 FTIR Spektrumu	39
Şekil 26. HA-LA-5 FTIR Spektrumu	40
Şekil 27. HA-LA-6 FTIR Spektrumu	40
Şekil 28. HA-LA-7 FTIR Spektrumu	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

Şekil 29. HA-LA-8 FTIR Spektrumu	41
Şekil 30. HA-LA-9 FTIR Spektrumu	42



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1 : Hyaluronan araştırmalarındaki önemli olaylar.....	5
Tablo 2. Palmitik asit türevleri için kullanılan miktarlar ve eş değ er oranları	20
Tablo 3. Hekzanoik anhidrit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eş değ er oranları.....	21
Tablo 4. Laurik asit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eş değ er oranları	22
Tablo 5. Laurik asit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eş değ er oranları (HA-LA-5-6-7).....	23
Tablo 6. Laurik asit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eş değ er oranları (HA-LA-8-9)	24
Tablo 7. Elektroeğ irme denemeleri için kullanılan örnek-konsantrasyon değ erleri	28
Tablo 8. Palmitik asit türevleri ç özünme testleri sonuçları	29
Tablo 9. Hekzanoik anhidrit türevleri ç özünme testleri sonuçları.....	30
Tablo 10. Laurik asit türevleri ç özünme testleri sonuçları	31
Tablo 11. Laurik asit ile modifiye edilmiş örneklerin kod numaralarına göre parametre farkları.....	37
Tablo 12. Elektroeğ irme denemelerinde kullanılan örnekler	43

1. GİRİŞ

Hyaluronik asit hücre dışı matriste bulunan bir biyopolimerdir ve aktivitesi ile ilgili umut verici özelliklere sahip olması nedeniyle biyomedikal kullanımıyla ilgili araştırmalar her geçen gün artmaktadır. Hyaluronik asitin farklı biyolojik işlevlerine ve tıbbi uygulamalarına odaklanması hyaluronik asit bazlı farklı türevlerinin geliştirilmesini teşvik etmektedir (Schanté vd., 2011). Bu nedenle hyaluronik asit; ilaç verme, cerrahi sonrası adezyon önleme veya doku mühendisliği uygulamaları ile yeni biyoyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir polimerler için çekici bir yapı taşıdır.

Özellikle ilaç dağıtımı veya yara iyileşmesi için doku mühendisliği uygulamalarında yapı iskelesi olarak kullanılabilecek nanofiberlerin hazırlanması gibi uygulamalar için hyaluronik asit kullanımı ön plana çıkmaktadır. Bu uygulamalar için, fiberlerin sahip olması gereken özelliklerden bazıları şöyle sıralanabilir; sulu ortamda kendini taşıyabilen özelliklere sahip olmak, biyoyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir olmak ve toksik olmamak ve stabilitesini koruyabilmesidir. Hyaluronik asit biyoyouyumlu yapısına rağmen, bu gereksinimlere göre bazı dezavantajlı özelliklere de sahiptir. Bunlar; suda hızlı çözünme, zayıf mekanik kararlılık ve hızlı bozunmadır. Bu durum hyaluronik asitli yapıları çoğu tıbbi uygulama için uygun hale getirmez, çünkü bunlar genellikle sulu ortamlarda uzun süreli stabilite gerektirir. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için fiziksel ve/veya kimyasal bazı modifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için fiziksel ve/veya kimyasal çapraz bağlama kullanılabilir. Literatürde uygulanan yöntemler arasında enzimatik çapraz bağlama (Pavan vd., 2016) , foto çapraz bağlama (Huerta-Angeles vd., 2016) veya hidrazitler, glutaraldehit, divinil sülfon ve karbodiimidler (Kuo, Swarm ve Prestwich, 1991; Tiwari ve Bahadur, 2019) kullanılarak modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Diğer bir yaklaşım ise, hyaluronik asit ve diğer polimerlerden kompozit malzemeler hazırlamak için polielektrolit etkileşimlerini kullanmaktır (Kogan vd., 2007; Garcia vd., 2021). Bununla birlikte, çapraz bağlı yapılarda genellikle mekanik özelliklerin zayıflığından ve yüksek şişmeden muzdariptir.

Bu çalışmada, hidrofobik asil yan zincirleri kullanılarak hyaluronik asit üzerinde fiziksel çapraz bağlar gibi çalışan modifikasyonlar geliştirilmesi

amaçlanmıştır. Asil yan zincirleri, hyaluronik asit üzerindeki OH gruplarının esterleşmesiyle ortaya çıkmaktadır (Foglarová vd., 2016; Matelová vd., 2016). Elde edilen ürünün suda çözünürlüğünün azaltılarak su-alkol karışımında kısmi çözünmesi sağlanmış, elektroegirme yönteminde kullanılabilir türevler geliştirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyopolimerler

Biyopolimerler, bitkilerden, hayvanlardan veya mikroorganizmalardan doğrudan özütlenerek elde edilen polimerlerdir. Bu polimerler esas olarak proteinler ve polisakkaritlerden oluşmaktadır (Li vd., 2021).

Son yıllarda özellikle ilaç ve doku mühendisliği alanlarında biyopolimerler hakkında yapılan araştırmalar ve uygulamalar giderek artmaktadır. Biyopolimerlerin geliştirilmiş biyouyumluluk, düşük immünojeniklik ve yüksek bozunabilirlik sergilemeleri, sentetik polimerlere göre çeşitli avantajlar sunabiliyor olması bunun temel nedenlerinden biridir. Ayrıca, doğal polimerler, hücrelerin belirli bir zaman aralığında çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyebilen ve yönlendirebilen ve sonuç olarak onlarla biyolojik etkileşimi artırabilen, hücreler için doğal olan biyomoleküller içerir (Derakhshanfar vd., 2018) .

Polipeptit olarak bilinen proteinler, biyolojik sistemlerde kritik makromoleküller olan lineer zincirli ve küresel forma katlanmış amino asitlerden oluşan organik bileşiklerdir. Proteinlerin yapısal açıdan esnek ve yüksek biyouyumlu olmaları nedeniyle biyomedikal alanda kullanılmaktadırlar. Biyomedikal alanda en çok kullanılan proteinler kollajen, elastin, fibrin, keratin, ipek ve jelatin proteinleridir (Choi vd., 2018).

Polisakkaritler kalınlaştırıcı, jelleştirici, emülsifiye edici, hidratlayıcı ve süspanse edici polimerler olarak birçok uygulamada önemli bir rol oynarlar. Özellikle bazı polisakkaritlerden uygun sıcaklık ve basınç koşullarında fiziksel jeller elde edilebilmektedir. Bunlar gıda, kozmetik, biyomedikal veya farmasötik uygulamalarda kullanılmaktadır. Bunun yanında, doğal polisakkaritlerin biyolojik aktivitesiyle ilgili araştırmalar artmakta ve insana yönelik uygulamaları için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Polisakkaritler bitkilerde veya hayvanlarda biyosentez yoluyla üretilmektedir. Ayrıca bakteriyel hyaluronan, gellan veya ksantan gibi mikrobiyal polisakkaritler de geliştirilebilmektedir. Özellikle aljinatlar, HA ve kitosan kanıtlanmış biyolojik aktiviteleri nedeniyle biyolojik uygulamalar için umut verici olarak nitelendirilmektedir (Rinaudo, 2008).

2.2. Hyaluronan

Hyaluronik asit (HA), doğal olarak bir tuz formunda (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) hyaluronan (NaHy) olarak, birçok canlı organizmada bulunan bir polisakkarit veya glikozaminoglikan olarak sınıflandırılabilen bir biyopolimerdir. HA, dokulardaki hücre dışı matrisin (ECM) ana bileşenidir ve hücre çoğalması, hidrasyon, yağlama gibi çeşitli biyolojik işlemlere katılır ve ayrıca ECM'nin homeostazını korur (Manou vd., 2019).

2.2.1. Tarihsel Perspektif

Hyaluronik asit ilk olarak 1880'de Fransız kimyager Portes tarafından gözlenmiştir. Portes, vücutta kornea ve kıkırdak müsininde olağandışı bir madde olarak rapor etmiş ve buna "hyalomusin" adını vermiştir (Garg ve Hales, 2004).

1918'de Levene ve Lopez Suarez, camısı cisim ve kordon kanından "mukoitin-sülfürik asit" adını verdikleri farklı bir polisakkarit türü çıkardılar (Levene ve Lopez-Suarez, 1918). Bu polisakkarit, glukozamin, glukuronik asit ve sülfat iyonunun bir karışımıydı. O zaman polisakkaritin sülfatlanmış glikozaminoglikanlarla harmanlanmış hyaluronik asit olduğu bilinmiyordu. Daha sonra, 1934'te Karl Meyer ve John Palmer, bu sıradışı yeni polisakkariti sığır gözünün vitrözünden izole ettiler. Yunanca "*hyaloid*" (camısı, şeffaf anlamında bir kelime) ve "üronik asit" kelimelerinin birleşiminden oluşan bu maddeye hyaluronik asit adını verdiler (Meyer ve Palmer, 1934).

Sonraki yıllarda birçok bilim insanı, eklemlerin sinovyal sıvısı, göbek kordonu ve kıkırdak gibi hayvanların farklı kısımlarından hyaluronan izole etmiştir. Hyaluronan ekstraksiyon süreci optimize edilerek neredeyse tüm omurgalı dokuları için kullanılabilir hale geldi. 1937'de Kendall, Heidelberg ve Dawson, hyaluronanın patojenik bir bakteri olan hemolitik streptokok tarafından da üretildiğini bildirmiştir. 1959 yılında, Streptokok piyojen kaynaklı hiyalüronat sentaz (HAS) ilk kez tanımlanmıştır. Birkaç on yıl sonra, DeAngelis ve araştırma grubu, Streptokok piyojenden hiyalüronat sentazın (HAS) izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Hyaluronan araştırmalarının önemli araştırma bulguları Tablo 1'de gösterilmiştir (Boeriu vd., 2013; Selyanin vd., 2015).

Tablo 1 : Hyaluronan araştırmalarındaki önemli olaylar

Yıl	Olay
1880	Portes ilk kez kornea ve kıkırdak m�sinlerinde sıradışı bir madde keşfetti ve ona " hyalom�sin " adını verdi.
1918	Levene ve Lopez Suarez, farklı bir tür polisakkarit çıkardılar ve buna “mukoitin -sülfürik asit” adını verdiler.
1934	Karl Meyer ve John Palmer, sığır gözünün vitr�z�nden yeni bir polisakkarit izole ederek maddeye "hyaluronik asit" adını verdiler.
30'lar-50'ler	Omurgalıların çeşitli dokularından hyaluronan izole edildi ve analiz edildi. Bazı patojenik bakterilerin hyaluronan ürettiği ve hücrelerini kapsüllemek için kullandığı keşfedildi.
50'ler	Hyaluronan göz cerrahisinde kullanılmaya başlandı.
40'lar-70'ler	Hyaluronanın ekstraksiyon ve bozunma sürecinin optimizasyonu gerçekleştirildi.
1979	Horoz ibiğinden ultra saf hyaluronan elde edildi ve hyaluronanın endüstriyel uygulamaları başladı.
1980	Balazs Pharmacia (�sve�), katarakt cerrahisinde kullanmak üzere bir ürün markası (Healon) tanıttı
1993	Streptokok piyojenler ve diğer mikroorganizmalardan HA sentezinin yapılması ve karakterizasyonu
1996	Hyaluronanın en büyük parçasının "oktamer" olarak sentezi
2003	öngörülen uzunlukta hyaluronan ve monodispers hyaluronan oligosakkaritlerin enzimatik üretimi üzerine çalışmalar
2000-bugün	Farklı biyomedikal uygulamalar için bir biyomateryal olarak hyaluronan kullanımı üzerine araştırmalar

Tarihte hyaluronanın biyomedikal alanında çeşitli pratik uygulamaları yapılmıştır. Örneğin, ilk olarak 1943'te İkinci Dünya Savaşı sırasında don nedeniyle uzuvlarında yanıklar oluşan askerleri tedavi etmek için yara pansuman malzemesi olarak kullanılmıştır. N.F Gamaleya, yara örtüsünü göbek kordonundan elde edilen bir materyal kullanarak yapmış ve buna 'rejenerasyon faktörü' adını vermiştir. Bundan sonra sargı, SSCB Sağlık Bakanlığı tarafından “rejeneratör” adlı bir ilaç olarak onaylanmıştır. 1950'lerde E.A Balazs, hyaluronanın oküler tedavilerdeki potansiyeli üzerine araştırmalara başlamıştır. 1970 yılında, artriti tedavi etmek için yarış atlarının eklemlerine hyaluronan enjekte edilerek iyileşme gözlemlenmiştir. Tüm bu gelişmeler ışığında HA'nın oftalmoloji, yara pansuman, medikal estetik gibi birçok biyomedikal alanda uygulama potansiyeline sahip olduğu anlaşılmıştır (Selyanin vd., 2015).

2.2.2. Oluşumu ve Üretilmesi

Hyaluronan doğada böcekler ve bitkiler hariç birçok organizmada bulunur ve üretilir. İnsan, hayvan (sığır, tavşan, horoz), alg (*Chlorella sp.*), bakteriler (*Pasteurella multocida*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus zooepidermicus*), maya mantarı (*Cryptococcus neoformans*) ve yumuşakçalar hyaluronanın doğal olarak bulunduğu canlılardır (Fallacara vd., 2018).

Hyaluronan esas olarak omurgalı dokularının hücre dışı matrisinde (ECM) bulunur ve kıkırdak, cilt, beyin, camsı cisim, göbek kordonu ve sinovyal sıvıda bol miktarda bulunur. Hyaluronanın konsantrasyonu, farklı vücut sıvıları için değişim göstermektedir. Örneğin, kan serumunda 0,01–0,1 µg/g, eklem sıvısında 1400–3600 µg/g ve yumuşak bağ dokularında 8,5–18 µg/g arasında değişir (Dicker vd., 2014). Bunun yanında, perisellüler bir kaplama 0.5-1.0 mg/ml konsantrasyona sahip olabileceğinden, hyaluronan bazı hücrelerin yüzeylerinde bulunur (Russell ve Salustri, 2006). İnsan vücudunda, 70 kg ağırlığındaki bir kişi için toplam hyaluronan miktarı 15 gr civarındadır (Volpi, Schiller ve Soltes, 2009).

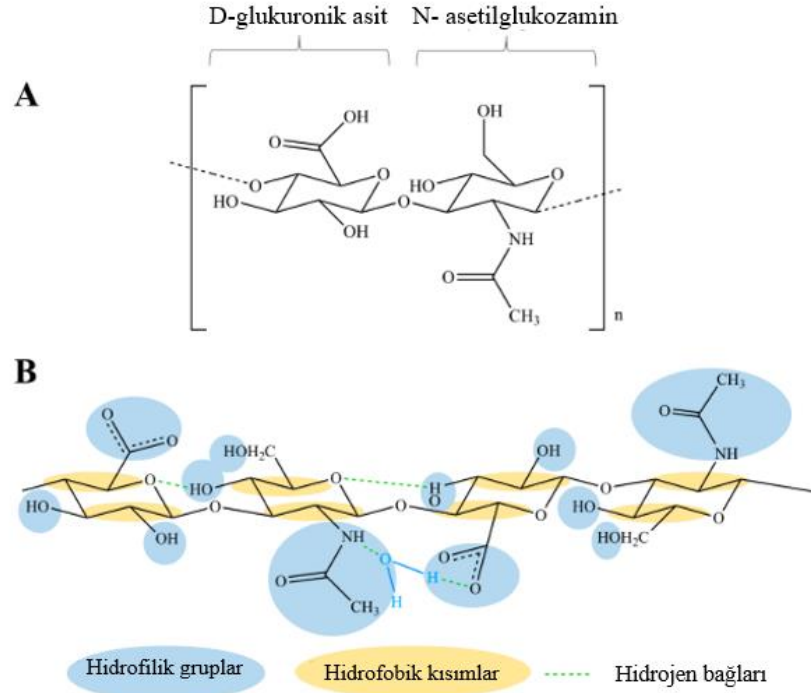
Canlı bir organizmada hyaluronanın üretimine HA sentazları (HAS) aracılık eder. HAS'ler, Golgi aygıtında sentezlenen diğer glikozaminoglikanların aksine plazma zarında hyaluronanın lineer yapısını üretebilen, membrana bağlı enzim olarak da adlandırılan özel bir zar proteinleri grubudur (Weigel, 2015). Memelilerde üç tip HAS izoenzimi bulunabilir: HAS1, HAS2, HAS3. HAS1 ve HAS2, uzun zincirlerin üretilmesinden sorumludur, HAS3 en kısa zincirleri oluşturur (Zhu, Zhu ve Guo, 2017). Bu nedenle hyaluronanın moleküler ağırlığı biyolojik örneğe göre farklılık gösterir. Örneğin; insan eklem sıvısında 6000-7000 kDa ve kan serumunda 100-300 kDa aralığındadır (Castro, Campos ve Mei, 2021).

Hyaluronanın endüstriyel anlamda ilk üretimi, hayvansal kaynaklardan (sığır vitrozü ve horoz ibiği gibi) ekstraksiyon yoluyla olmuştur. Ancak, teknik kısıtlamalar düşük verimli üretime ve yüksek polidispersiteye ($MW \geq 10^6$ Da) neden olmuştur. Ayrıca, yüksek saflaştırma maliyetleri ve biyolojik kontaminasyon riski, araştırmacıları ve mühendisleri endüstriyel ölçekte hyaluronan üretimi için başka yöntemler bulmaya yöneltmiştir (Fallacara vd., 2018).

Şu anda ticari hyaluronan, mikrobiyal fermentasyon teknolojisi ile bakterilerden üretilmektedir. Günümüzde HA ürünleri çoğunlukla *Streptococcus equi*'den elde edilmektedir. HA'nın yapısı çeşitli biyolojik organizmalar arasında korunduğundan, bakteri kaynaklı hyaluronan insan dokuları ile biyouyumluluğunu korur (Rangaswamy ve Jain, 2008; de Oliveira vd., 2016).

2.2.3. Yapısı ve Özellikleri

Hyaluronanın kimyasal yapısı 1954 yılında Meyer ve Weissmann tarafından açıklanmıştır (Weissmann ve Meyer, 1954). Hyaluronan, tekrarlayan D-glukuronik asit ve N-asetil-D-glukozamin disakkarit birimlerine sahip bir polisakkarit olan dalsız sülfatlanmamış bir glikozaminoglikandır (GAG). Tekrarlayan disakkaritler, hyaluronik asidin birincil yapısı olarak β (1 $\rightarrow$ 3) ve β (1 $\rightarrow$ 4) glikozidik bağlarla bağlanır (Hargittai ve Hargittai, 2008) Hyaluronanın yapısında yüksek miktarda hidroksil gruplarının bulunması (Şekil 1B), karboksil grupları tarafından indüklenen yük itme işleminin sulu bir çözeltide yüksek çözünürlükle sonuçlanmasına neden olur. Ayrıca her karboksil grubu negatif yüklüdür ve fizyolojik koşullarda pozitif yüklü iyonlarla (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) bağlanabilir. Hyaluronan negatif bir yüke sahiptir ve suda hyaluronan veya sodyum hyaluronat olarak tuz oluşturur. Hyaluronan, yüksek su tutma kapasitesine sahip çok hidrofilik bir moleküldür. Sulu koşullarda, karboksil ve asetamido grupları su molekülleri ile bağlantılıdır ve hyaluronanın tek sarmallı, solak, iki katlı sarmal ikincil yapısını oluşturur. Ayrıca, bazı hidrofobik etkileşimler ve moleküller arası hidrojen bağları, biyopolimerin β -tabaka üçüncül yapısını oluşturmaya yol açar (Laurent, T.C. ; Balazs, E.A., 1970).



Şekil 1. Hyaluronanın disakkarit biriminin kimyasal yapısı (A) ve tetrasakkarit birimindeki hidrofobik ve hidrofilik gruplar (B)

Hyaluronan bir polielektrolittir, yani tekrarlayan birimleri elektrolit gruplarına sahiptir, bu nedenle iyonik kuvvet, pH ve sıcaklık polimerin reolojik özelliklerini etkiler. Polimer zincirinin moleküler etkileşimleri zayıfladığında HA'nın viskozitesi azalır. Ayrıca pH değişimi HA'yı kolayca etkiler, özellikle pH 4'ten küçük ve 11'den büyük olduğunda, HA hidroliz reaksiyonu ile bozulur (Cleland, 1968).

Hyaluronan çözeltiler, kayma inceltici (veya psödoplastik) viskoelastik davranış profiline sahip Newton tipi olmayan akışkanlardır. Kesme hızları arttığında, hidrojen bağları arasındaki moleküler kuvvetler ve hidrofobik etkileşimler bozulur ve HA zinciri deforme olur, bu da HA'nın viskozitesinin azalmasına yol açar. Ancak HA'nın deformasyonu kalıcı değildir ve tersine çevrilebilir. Kesme hızı düştüğünde, HA çözeltisi orijinal yapısına ve viskozitesine geri dönebilir (H.G. Garg ve Hales, 2019).

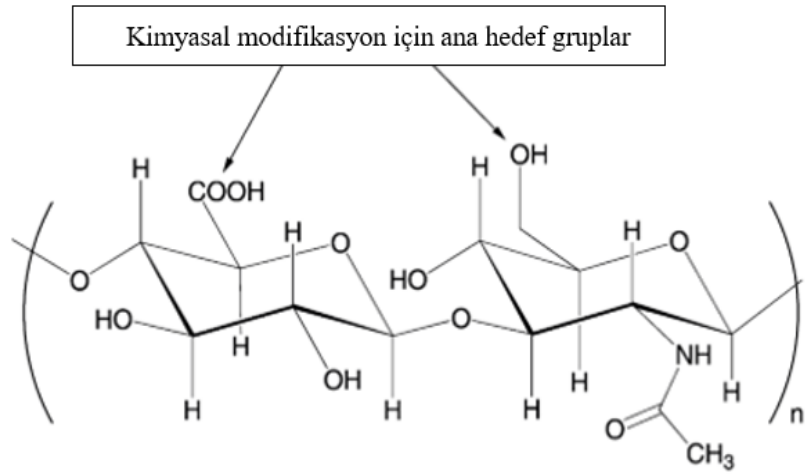
Hyaluronanın olağanüstü biyofonksiyonelliği, biyoaktiviteyi ve hücrelerle uyumluluğu inceleme merakını uyandırmıştır. Bu nedenle, araştırmacılar, hyaluronanın işlevlerini geliştirmek/taklit etmek veya bazı terapötik ajanlar sağlamak için hyaluronan içeren biyomalzemeler hakkında çalışmaların

ilerlemesini sağlamıştır (Amorim *vd.*, 2021). Bununla birlikte, hyaluronan sulu çözeltide hızla çözünür ve fizyolojik koşullarda enzimatik olarak kolayca bozunur ve bu da biyomedikal amaçlar için kullanımı son derece zorlayıcı sınırlamalara neden olur. Bu nedenle, biyomedikal uygulamalarda daha fazla kullanım için HA modifikasyonu gerekliliği vardır (Tiwari ve Bahadur, 2019).

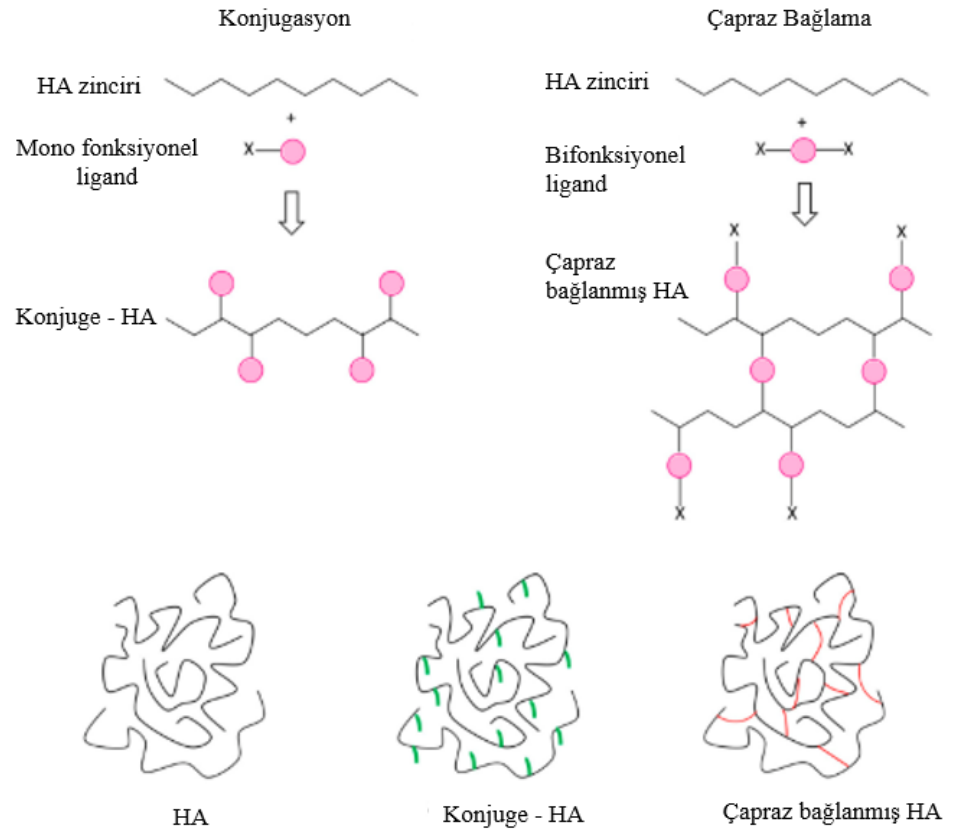
2.3. Hyaluronanın Modifikasyonu

Hyaluronan, ilaç dağıtımı, kanser tümör tedavisi, oftalmik tedavi, yara pansuman ve kemik rejenerasyonu gibi biyomedikal uygulamalar için yeni materyaller üretmeye en uygun polimerlerden biridir (Almeida *vd.*, 2014; Šmejkalová *vd.*, 2017; Séon-Lutz *vd.*, 2018; Huerta-Ángeles *vd.*, 2020; Federico *vd.*, 2021). Ancak bu doğal polimerin sulu ortamda yüksek çözünürlüğü ve hızlı bozunması klinik uygulamalarda bazı sorunlara neden olabilir. İkame derecesine göre, hidrofobik modifikasyon, HA'nın bozunma hızını ve hidrofilikliğini değiştirebilir. Örneğin, HA, amino asitlerin -OH veya -COOH gruplarıyla temas ettirilerek modifikasyonu yoluyla enzimatik bozunmadan kendini koruyabilir hale gelir. Modifiye HA'nın bozunma hızının modifiye edilmemiş HA'dan daha uzun olduğu tümör dokuları üzerinde yapılan bir çalışmada kanıtlanmıştır (Tiwari ve Bahadur, 2019). Türevlerin fizikokimyasal özellikleri modifikasyondan sonra saf HA'dan değiştirilse de, çoğu biyomedikal kullanım için doğal hyaluronan avantajlarının biyouyumluluğunu ve biyolojik olarak parçalanabilirliğini korur (Garg ve Hales, 2004).

HA'nın tekrarlayan disakkarit birimi, modifikasyon için iki ana aktif bölüme sahiptir: karboksil (COOH) ve hidroksil (OH) grupları (Bkz. Şekil 2). Genel olarak modifikasyon için iki farklı yöntem uygulanır: konjugasyon ve çapraz bağlama. Bu iki yöntem, farklı ürünlerle sonuçlanan aynı kimyasal reaksiyonlar üzerine inşa edilmiştir (Şekil 3). Konjugasyon, tek bir HA zinciri ile bir kovalent bağ oluşturan bir fonksiyonel gruba sahip bir molekülü içerirken, çapraz bağlanmada moleküller, birden fazla kovalent bağ ile farklı HA zincirlerine bağlanan birden fazla fonksiyonel gruba sahiptir (Fallacara *vd.*, 2018).



Şekil 2. Hyaluronanın aktif fonksiyonel bölgeleri (Garg ve Hales, 2004)



Şekil 3: Kimyasal Konjugasyon ve Çapraz Bağlanma

2.3.1. Karboksil Gruplarının Modifikasyonu

Birçok kimyasal modifikasyon yöntemi arasında en çok bilinen ve uygulananlardan biri karbodiimid aracılı reaksiyonlardır. Bu reaksiyonlar genellikle pH 4,75'te suda gerçekleştirilir, böylece karbodiimid nitrojenleri protonlanır. Aktivasyon için 1-Etil-3-[3-(dimetilamino)-propil]-karbodiimid (EDC) kullanılır. Bu koşullarda, nükleofil olarak bir miktar amin bazı kalırsa, kovalent bağlı bir bileşik oluşturulabilir. Ancak, amid ürünü yerine O-asilüre ara ürünü oluşturulur ve bu reaksiyonun ana ürünü olarak reaktif olmayan N-asilüre oluşturacak şekilde yeniden düzenlenir. pH 4-6'da neredeyse tüm bazik aminler dengede protonlanır (nükleofilik amin formu olarak %0,001'den az kalır) (Garg ve Hales, 2004).

Bununla birlikte, bazı hidrazidler nükleofilisitelerini asidik koşullarda (pH 4,75) koruyabilir ve hyaluronanın aktive edilmiş kısmı ile birleşebilir. Örneğin, pKa değeri aralığı 2-4 olan dihidrazit bileşikler (örn. adipik dihidrazid, ADH) karşılık gelen konjugat asitler için nükleofiliklerini asidik koşullarda (pH 4,75) tutabilir ve ayrıca modifiye edilebilen ve ilaçlarla yüklenebilen, çapraz bağlama ajanları veya biyokimyasal problemler olarak proses edilebilir birçok hidrazit grubuna sahip olabilir. Yakın tarihli bir çalışmada, hyaluronanı başarılı bir şekilde modifiye etmek için adipik asit dihidrazid çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. Türevler nanolifler elde etmek için elektro-eğirmede kullanılmıştır (Xue vd., 2021).

Çok sayıda reaksiyon arasında, hidrofobik olarak modifiye edilmiş hyaluronana karşı en iyi çalışılmış reaksiyonlardan biri esterleşmedir. İki ana adımdan oluşur; hyaluronanı aprotik çözücüler içinde çözmek için ilk adım, bir hyaluronan tetrabutylamoniyum tuzunun hazırlanmasıdır. Esterleşme reaksiyonları için farklı alkol türleri kullanılabilir. Reaksiyon, esterlenmiş kısımlar şeklinde yüksek dönüşüm sağlayabiliyorsa, hidrofobikleştirme başarılı olur ve türevler sulu ortamda çözülmez (Garg ve Hales, 2004).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, alifatik zincirler ve amino grupları tarafından modifiye edilen hyaluronan, kemik rejenerasyonu amacıyla elektro-eğirme uygulamasında umut vermektedir. Hyaluronan türevleri, alifatik zincirlerin aşılması ve karbodiimid reaksiyonlarının birlikte kullanılmasıyla

üretilmiştir. Uzun alkil zinciri modifiyeli hyaluronan türevlerinin sulu ortamda hidrofobik davranış gösterdiği gözlemlenmiştir (Federico vd., 2021).

2.3.2. Hidroksil Gruplarının Modifikasyonu

HA'nın hidroksil gruplarını hedefleyerek zaman içinde birçok türevlendirme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. HA'nın karboksil grupları, hidroksil gruplarının değiştirilmesiyle değişmez. Epoksitler veya divinil sülfon kullanılarak eter oluşumu, glutaraldehit kullanılarak hemiasetal oluşumu, oktenil süksinit anhidrit ile ester oluşumu, oksidasyon ve karbamat oluşumu bu amaçla gerçekleştirilen reaksiyonlardan bazılarıdır (Schanté vd., 2011).

Kateterler, sensörler ve kılavuz teller gibi bazı biyomedikal cihazların kanla eşleşen yüzeyleri vardır. Bu nedenle hyaluronan kaplı tıbbi cihazlar biyouyumlu ve trombojenik olmayan özellikleri nedeniyle kullanışlıdır. Hyaluronanın hidroksil gruplarının sülfatlanması, uygun kaplama biyomateryalleri üretmek için faydalı bir yaklaşım olarak görülmektedir (Garg ve Hales, 2004).

Alkali koşullar altında metakrilik anhidrit ile esterleşme reaksiyonu, foto çapraz bağlama işlemi ile birlikte 3D biyobaskı uygulamalarında da kullanılan metakrilatlanmış-HA'yı vermiştir (Petta vd., 2018).

2.4. Hyaluronan Biyomedikal Uygulamaları

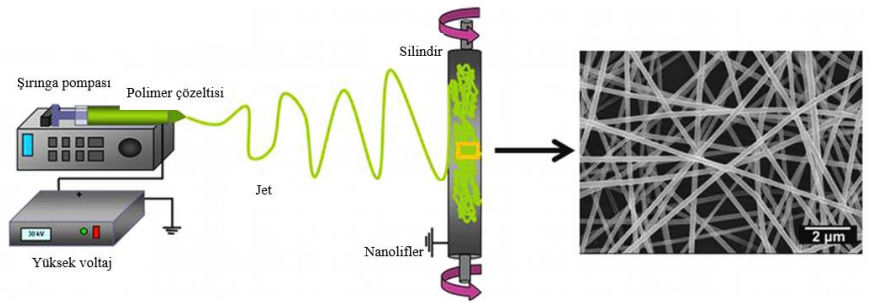
Biyomedikal uygulamalardan doku mühendisliği, rejeneratif tıp için yaratıcı ve farklı uygulanabilirliği nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Tasarlanmış yapı iskeleleri proliferasyon için hücre dostu bir ortam sağlayabildiği için yavaş yavaş meydana gelebilir ve bu da onları yara örtüsü, kemik rejenerasyonu, yapay organların üretimi ve canlı dokular için çok uygun malzemeler haline getirir. Tasarlanan iskele yapısı, biyokimyasal homeostazı etkilediği için uygulanan bölgenin hücresel ortamına uygun olmalıdır. Bu nedenle, iskelelerin tasarım aşamasında biyolojik olarak parçalanabilen maddelerin kullanılması, vücudun hücre dışı matrisinin (ECM) bileşenleri ile uyumlu olması için çok büyük önem teşkil etmektedir. Bu nedenle, hyaluronanın elektrospinning, 3D baskı gibi farklı biyomedikal uygulamalar için uygulanabilirliğini artırmak için araştırmacılar tarafından yeni yöntemler geliştirilmiştir (Rahmati vd., 2021).

2.4.1. Elektroeğirme

Elektro eğirme, bir elektrik alanı altında eğirme yoluyla polimer eriyik veya çözeltiden ultra ince lifler üretmek için kullanılan ayarlanabilir bir tekniktir. John Cooley ve Willian Morton, 1902'de bu yöntemin iki patentini almıştır (Cooley, 1902; Morton, 1900). Elektro eğirme, düşük maliyetli kurulumu nedeniyle laboratuvarından endüstriyel üretime kolayca aktarılabilen çok yönlü bir yöntemdir (Reneker ve Yarin, 2008). Ayrıca, çeşitli tipte polimer çözeltilerinin kullanımı, hava temizleme membranları, enerji depolama malzemeleri, adsorbanlar, katalitik malzemeler, transistörler, biyomedikal uygulamalar vb. gibi geniş bir uygulama yelpazesi sunar (Xue vd., 2019).

Elektro eğirmenin ana prensibi, liflerin oluşumuna yol açan yüklü bir yüzey ile dönen elektrikli jetlerin kombinasyonuna dayanır. Elektro eğirmenin dört temel unsuru şırınga pompası, yüksek voltajlı güç kaynağı, iğne ve toplayıcıdır. Elektro eğirme işlemi temel dört adımdan oluşur:

- i. Yüklü sıvı damlası bir Taylor konisi veya koni şekilli bir jet oluşturur;
- ii. Yüklü jet düz bir çizgi halinde uzanır;
- iii. Jet, elektrik alanı nedeniyle inceler ve ayrıca elektriksel bükülme kararsızlığını (veya whipping kararsızlığını) artırır;
- iv. Jet katı hale gelir ve lif(ler) olarak toplanır (Xue vd., 2019).



Şekil 4. Elektroeğirmenin şematik gösterimi (Rahmati vd., 2021)

İletken bir sıvı damlacığına elektrik verildiğinde, yüzey gerilimi nedeniyle damlacık şeklinde deformasyon oluşmaya başlar. Voltaj yükseldiğinde, elektrik alanı yüzey geriliminden daha belirgin hale gelir ve bu da damlacık üzerinde bir koni şekli oluşturmak üzere kuvvet uygulanmasına yol açar. Taylor koni fenomeni

Sir Geoffrey Ingram Taylor tarafından 1964'te tanımlanmıştır. İdeal şekilli bir koni veya koni-jet oluşumunun elektrospreyleme işleminde tahmin edilen bir açıyla teorik kısıtlamasını belirtir (Taylor, 1964). Taylor bu fikri iki varsayıma dayandırmıştır: koninin yüzeyi eşpotansiyeldir (bu, içindeki her noktanın aynı potansiyelde olduğu anlamına gelir) ve koni sabit durum denge durumundadır. Taylor koni şekli oluştuğunda, polimer jeti serbest bırakılır ve çözücü buharlaşır, bu da polimerin lif olarak katılaşmasına yol açar (whipping işlemi). Elektroeğirme işleminde, jet, yüzeyin elektrik potansiyeli arttığında ve çözeltinin yüzey gerilimini aştığında gönderilir.

Kritik potansiyel Taylor tarafından tanımlanmıştır.

(Taylor, 1964; Al-Hazeem, 2018):

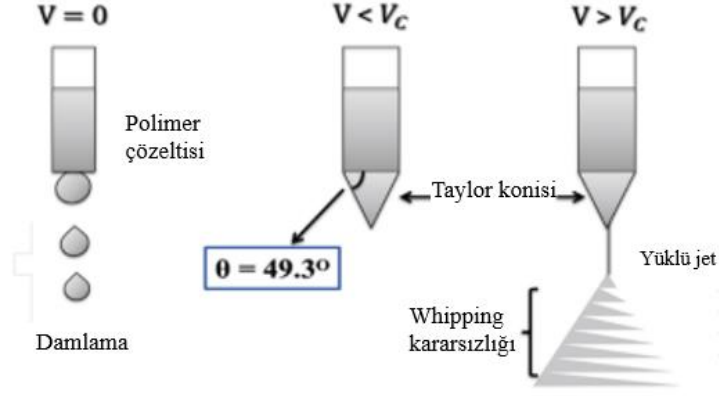
$$V_c^2 = 4 \frac{H^2}{L^2} \left(\ln \frac{2L}{R} - \frac{3}{2} \right) (0.117\pi\gamma R) \quad (1)$$

V_c kritik potansiyel, H kapiler ile zemin arasındaki mesafe, L kapiler uzunluğu, R kapiler yarıçapı ve γ sıvının yüzey gerilimidir.

Başka bir korelasyonda bir kılcal borudan bir damlacığın püskürtme işlemi için elektrik potansiyeli aşağıdaki gibi tanımlanmıştır (Carson ve Hendricks, 1965; Al-Hazeem, 2018):

$$V = 300\sqrt{20\gamma r} \quad (2)$$

burada V elektrik alanı, γ sıvının yüzey gerilimi ve r damlanın yarıçapıdır. Taylor'ın yaklaşımına göre, mükemmel bir koninin denge açısı (yarı dikey açı), Taylor açısı olarak da adlandırılan 49.3° 'dir. Elektrik alanı belirgin şekilde daha yüksek olduğunda ($V > V_c$), jet Taylor koni ucundan boşalır ve zıt kutuplu başka bir elektrota gider veya topraklanır.



Şekil 5. Taylor Konisi Oluşumu (Al-Hazeem, 2018)

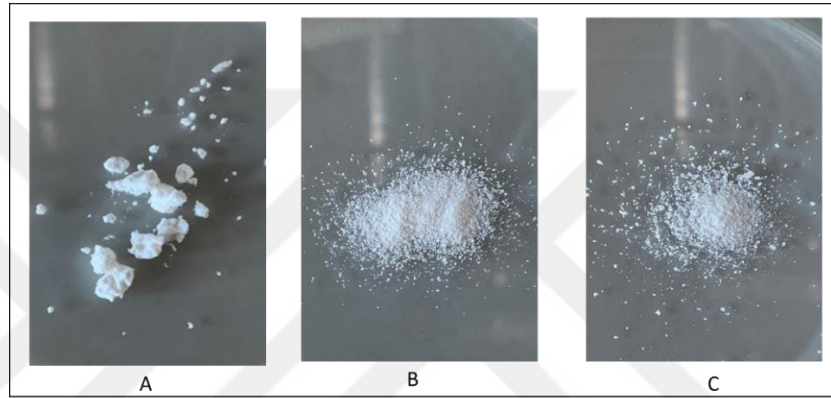
İstenilen kalitede nanolifler üretmek için elektro-eğirme işleminde bazı önemli parametrelerin dikkate alınması gerekir. Bu parametreleri süreç, çözüm ve çevre ile ilgili olarak kolayca üç kategoriye ayırabiliriz. Elektrik voltajı, akış hızı ve elektrospinning cihazının iğne ve kollektör kısmının konumları proses için parametrelerdir. Ortamın bağıl nemi ve sıcaklığı çevre olarak kabul edilebilir. Çözelti, döndürülebilirlik için gerekli özelliklere sahip olmalıdır. Bu reolojik özellikler, çözeltinin viskozitesinden, konsantrasyonundan, yüzey geriliminden ve elektriksel iletkenliğinden ve polimerin moleküler ağırlığından etkilenir (Castro, Campos ve Mei, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Hyaluronatın sodyum tuzu (NaHy), ($M_w = 124$ kDa, $M_w = 248$ kDa), Contipro Ltd., Çek Cumhuriyeti tarafından sağlandı.

4-Dimetilaminopiridin (DMAP), tetrahidrofuran (THF), izopropil alkol (IPA), trietilamin (TEA), dimetilsülfoksit (DMSO), palmitik asit, hekzanoik anhidrit, laurik asit, benzoil klorür (BC) Sigma Aldrich'ten satın alındı.



Şekil 6. Modifiye edilmemiş hyaluronan tozu: 124 kDa(A), 243 kDa(B), 600 kDa(C)

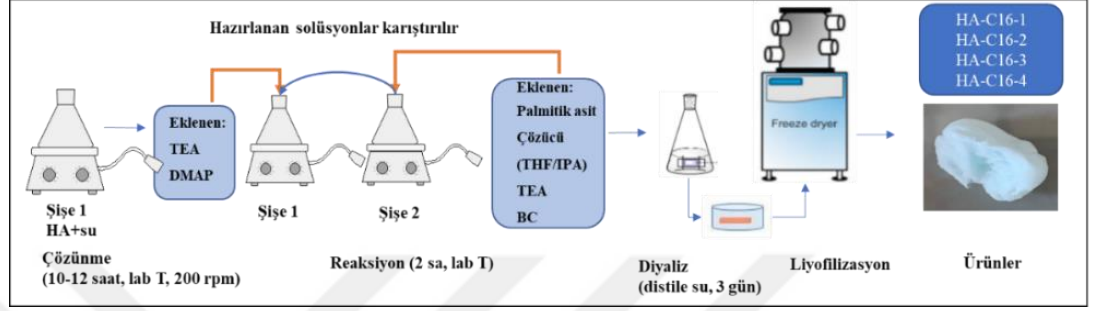
3.2. Kimyasal Modifikasyon Reaksiyonları

Hyaluronan, palmitik asit, laurik asit ve hekzanoik anhidrit ile modifiye edilmiştir.

3.2.1. Palmitik Asit ile Modifikasyonu

Hyaluronan (100 mg, 0,25 mmol), gece boyunca 5 ml ultra saf su içinde çözündürüldü (Şişe 1)., başka bir şişede palmitik asit, çözücü (THF veya IPA, 3 ml) içinde çözündürüldü ve 5 dakika boyunca 200 rpm'de karıştırıldı (Şişe 2). Yağ asidinin çözülmesinden sonra TEA (0,105 ml, 0,75 mmol) ve benzoil-klorür (0,029 ml, 0,25 mmol) yavaş yavaş palmitik asit çözeltisine ilave edildi ve aktivasyon reaksiyonu 30 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra aktivasyon bitiminden 5 dakika önce hyaluronan solüsyonuna (Şişe 1) TEA (0,105 ml, 0,75 mmol) ilave edildi. DMAP (1,53 mg, 0,0125 mmol), ultra saflaştırılmış su içinde çözündürüldü ve hyaluronan çözeltisine (Şişe 1) ilave edildi. Daha sonra hyaluronan solüsyonuna

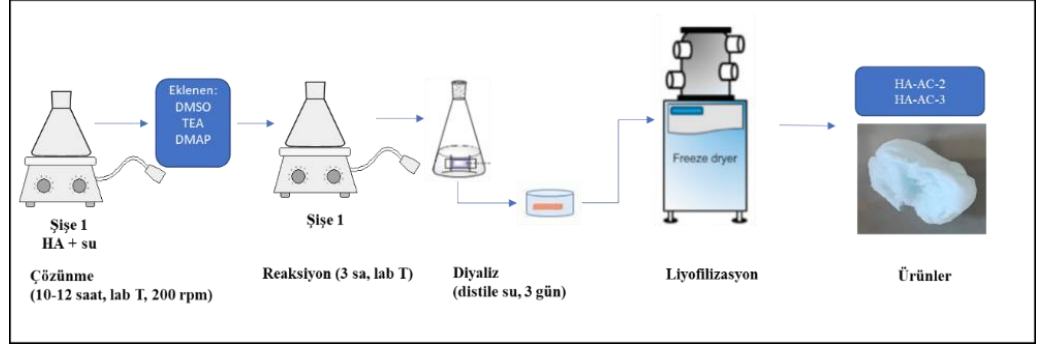
aktive edilmiş yağ asidi solüsyonu ilave edildi, reaksiyon 2 saat sürdürüldü. Reaksiyonun sona ermesinden sonra, hyaluronan çözeltisi, 10 ml (başlangıç hacminin iki katı) ultra saflaştırılmış su ile seyreltildi. Seyreltilmiş reaksiyon solüsyonu, diyaliz membranına (Spectra/Por membranlar, 13 kDa kesilmiş) aktarıldı ve diyaliz, laboratuvar sıcaklığında 3 gün boyunca distile suya karşı yapıldı. Diyalizden sonra örnekler liyofilize edildi.



Şekil 7. Palmitik asit modifikasyonu şematik gösterimi

3.2.2. Hekzanoik Anhidrit ile Modifikasyon

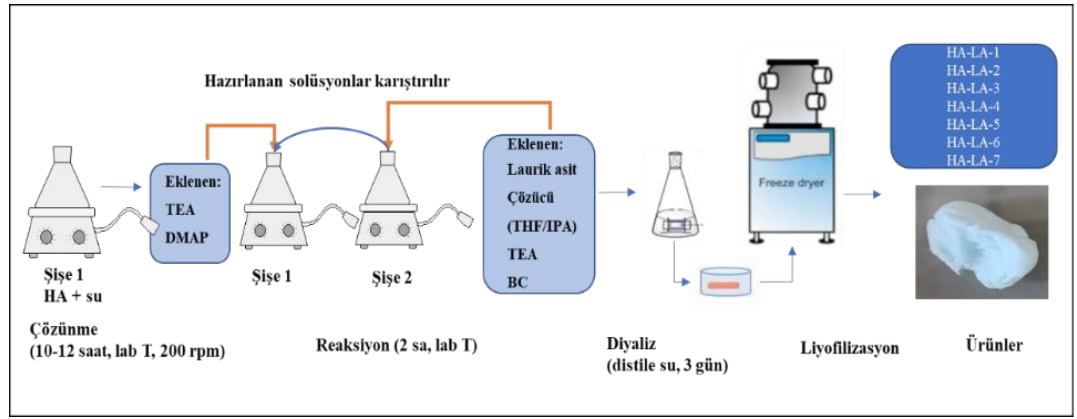
Hyaluronan (100 mg), 5 ml ultra saflaştırılmış su içinde gece boyunca çözündürüldü. Çözünmüş hyaluronan çözeltisi, 5 ml DMSO ile seyreltildi. Daha sonra NaHy çözeltisine TEA (0,087 ml, 0,625 mmol) ilave edildi. Başka bir şişede, DMAP (1,53 mg, 0,0125 mmol), ultra saflaştırılmış su (0,5 ml) içinde çözündürüldü ve hyaluronan çözeltisine ilave edildi ve reaksiyon, 5 dakika karıştırıldı. Son olarak HA çözeltisine hekzanoik anhidrit (0,144 ml, 0,625 mmol) ilave edildi ve 240 rpm'de, laboratuvar sıcaklığında 3 saat karıştırıldı. Reaksiyonun sona ermesinden sonra, hyaluronan çözeltisi, 10 ml ultra saflaştırılmış su ile seyreltildi. Seyreltilmiş reaksiyon solüsyonu, diyaliz membranına (Spectra/Por membranlar, 13 kDa kesilmiş) aktarıldı ve diyaliz, laboratuvar sıcaklığında 3 gün boyunca distile suya karşı yapıldı. Diyalizden sonra örnekler liyofilize edildi.



Şekil 8. Hekzanoik anhidrit modifikasyonu şematik gösterimi

3.2.3. Laurik Asit ile Modifikasyonu

Hyaluronan (100 mg, 0.25 mmol), gece boyunca 5 ml ultra saf su içinde çözündürüldü. (Şişe 1)., başka bir şişede laurik asit (THF veya IPA 3 ml) içinde çözündürüldü ve 200 rpm'de 5 dakika karıştırıldı. (Şişe 2). Yağ asidinin çözülmesinden sonra TEA (0,105 ml, 0,75 mmol) ve benzoil-klorür (0,029 ml, 0,25 mmol) yavaş yavaş laurik asit çözeltisine ilave edildi ve aktivasyon reaksiyonu 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra aktivasyon bitiminden 5 dakika önce hyaluronan solüsyonuna (Şişe 1) TEA (0,105 ml, 0,75 mmol) ilave edildi. DMAP (1,53 mg, 0,0125 mmol), ultra saflaştırılmış su içinde çözündürüldü ve hyaluronan çözeltisine (Şişe 1) ilave edildi. Daha sonra hyaluronan solüsyonuna aktive edilmiş yağ asidi solüsyonu ilave edildi, reaksiyon 2 saat sürdürüldü. Reaksiyonun sona ermesinden sonra, hyaluronan çözeltisi, 10 ml (başlangıç hacminin iki katı) ultra saflaştırılmış su ile seyreltildi. Seyreltilmiş reaksiyon solüsyonu, diyaliz membranına (Spectra/Por membranlar, 13 kDa kesilmiş) aktarıldı ve diyaliz, laboratuvar sıcaklığında 3 gün boyunca distile suya karşı yapıldı. Diyalizden sonra örnekler liyofilize edildi.



Şekil 9: Laurik asit modifikasyonu şematik gösterimi

3.3. Malzemelerin Kullanım Miktarları ve Oranları

Palmitik asit ile üretilen modifiye türevler şunlardır: HA-C16-1, HA-C16-2, HA-C16-3, HA-C16-4. Kullanılan malzemelerin miktarları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 2. Palmitik asit türevleri için kullanılan miktarlar ve eş değer oranları

REAKSİYON 1 HA-C16-1						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm3)	Mol eşdeğeri
HA (124 kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Palmitik asit	64	0,25	256,42			1
THF				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,57	0,029	1,21	1
REAKSİYON 2 HA-C16-2						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm3)	Mol eşdeğeri
HA (124 kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Palmitik asit	64	0,25	256,42			1
IPA				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,57	0,029	1,21	1
REAKSİYON 3 HA-C16-3						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm3)	Mol eşdeğeri
HA (243 kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Palmitik asit	64	0,25	256,42			1
THF				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,57	0,029	1,21	1
REAKSİYON 4 HA-C16-4						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm3)	Mol eşdeğeri
HA (243 kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Palmitik asit	64	0,25	256,42			1
IPA				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,57	0,029	1,21	1

Tablo 2’de gösterildiği gibi 4 farklı HA türevi için kullanılan eş değer oranları aynıdır. Ancak kullanılan HA’nın moleküler ağırlıkları HA-C16-1 ve HA-C16-2 için 124 kDa iken, HA-C16-3 ve HA-C16-4 için 243 kDa kullanılmıştır. Çözücü olarak da HA-C16-1 ve HA-C16-3 için THF, HA-C16-2 ve HA-C16-4 için IPA kullanılmıştır.

Hekzanoik anhidrit ile üretilen modifiye türevler şunlardır: HA-AC-2, HA-AC-3. Kullanılan malzemelerin miktarları aşağıdaki tablolarda verilmiştir.

Tablo 3. Hekzanoik anhidrit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eşdeğer oranları

REAKSİYON 1 HA-AC-2						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm³)	Mol eşdeğeri
HA (124 kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
DMSO			78,13	5		
Hekzanoik Anhidrit	134	0,625	214,3	0,144	0,928	2,5
TEA	63	0,625	101,19	0,087	0,726	2,5
DMAP	1,53	0,0125	122,17	0,001	1,21	0,05
REAKSİYON 2 HA-AC-3						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm³)	Mol eşdeğeri
HA (243 kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
DMSO			78,13	5		
Hekzanoik Anhidrit	134	0,625	214,3	0,144	0,928	2,5
TEA	63	0,625	101,19	0,087	0,726	2,5
DMAP	1,53	0,0125	122,17	0,001	1,21	0,05

Laurik asit ile ilk olarak üretilen modifiye türevler şunlardır: HA-LA-1, HA-LA-2, HA-LA-3, HA-LA-4. Kullanılan malzemelerin miktarları aşağıdaki tablolarda verilmiştir:

Tablo 4. Laurik asit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eşdeğer oranları

REAKSİYON 1 HA-LA-1						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm ³)	Mol eşdeğeri
HA (124kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Laurik asit	50	0,25	200,3178		0,883	1
THF				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,6	0,029	1,21	1
REAKSİYON 2 HA-LA-2						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm ³)	Mol eşdeğeri
HA (124kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Laurik asit	50	0,25	200,3178		0,883	1
IPA				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,6	0,029	1,21	1
REAKSİYON 3 HA-LA-3						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm ³)	Mol eşdeğeri
HA (243kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Laurik asit	50	0,25	200,3178		0,883	1
THF				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,6	0,029	1,21	1
REAKSİYON 4 HA-LA-4						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm ³)	Mol eşdeğeri
HA (243kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Laurik asit	50	0,25	200,3178		0,883	1
IPA				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	35	0,25	140,6	0,029	1,21	1

Tabloda gösterildiği gibi 4 farklı HA-LA türevi için kullanılan eş değer oranları aynıdır. Ancak kullanılan HA'nın moleküler ağırlıkları HA-LA-1 ve HA-LA-2 için 124 kDa iken, HA-LA-3 ve HA-LA-4 için 243 kDa kullanılmıştır. Çözücü olarak da HA-LA-1 ve HA-LA-3 için THF, HA-LA-2 ve HA-LA-4 için IPA kullanılmıştır.

Daha sonra laurik asit oranı artırılarak ve farklı moleküler ağırlıklarda yeni modifikasyon reaksiyonları tasarlandı. Her bileşenin kullanım miktarı ve oranları aşağıdaki tablolarda verilmiştir

Tablo 5. Laurik asit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eşdeğer oranları (HA-LA-5-6-7)

REAKSİYON 5 HA-LA-5						
Kimyasal Madde l	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm3)	Mol eşdeğeri
HA (124kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Laurik asit	75	0,375	200,3178		0,883	1,5
IPA				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	53	0,375	140,6	0,044	1,21	1,5
REAKSİYON 6 HA-LA-6						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm3)	Mol eşdeğeri
HA (243kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Laurik asit	75	0,375	200,3178		0,883	1,5
IPA				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	53	0,375	140,6	0,044	1,21	1,5
REAKSİYON 7 HA-LA-7						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm3)	Mol eşdeğeri
HA (600 kDa)	100	0,25	400			1
Saf su				5		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
DMAP	1,53	0,0125	122,2			0,05
Laurik asit	75	0,375	200,3178		0,883	1,5
IPA				3		
TEA	76	0,75	101,2	0,105	0,726	3
Benzoil Klorür	53	0,375	140,6	0,044	1,21	1,5

Yukarıdaki tabloda da görüldüğü gibi laurik asit oranı 1'den 1,5'e çıkarılarak 3 yeni modifiye HA-LA üretilmiştir. Solvent olarak hepsinde IPA kullanılmıştır. HA-LA-5 için 124 kDa moleküler ağırlıklı, HA-LA-6 için 243 kDa moleküler ağırlıklı ve HA-LA-7 için 600 kDa moleküler ağırlıklı HA kullanılmıştır.

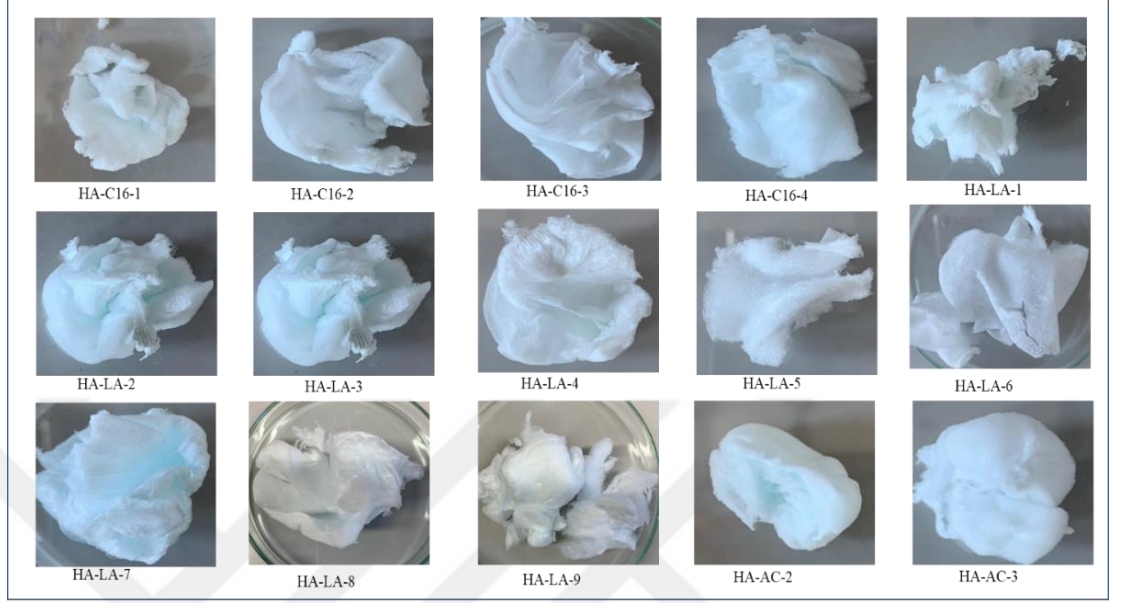
Son olarak elektroegirme denemeleri için daha büyük miktarda üretim yapılmak istenmiştir. İki modifikasyon seçilerek daha yüksek miktarda sentez yapılmıştır. Tabloları aşağıda gösterilmektedir.

Tablo 6. Laurik asit türevleri için kullanılan malzemelerin miktarları ve eşdeğer oranları (HA-LA-8-9)

REAKSİYON 8 HA-LA-8						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm³)	Mol eşdeğeri
HA (124 kDa)	500	1,25	400			1
Saf su				25		
TEA	380	3,75	101,2	0,523	0,726	3
DMAP	7,64	0,0625	122,2			0,05
Laurik asit	375,6	1,875	200,3178		0,883	1,5
IPA				15		
TEA	380	3,75	101,2	0,523	0,726	3
Benzoil Klorür	264	1,875	140,6	0,218	1,21	1,5
REAKSİYON 9 HA-LA-9						
Kimyasal Madde	m (mg)	n (mmol)	M (g/mol)	V (ml)	d (g/cm³)	Mol eşdeğeri
HA (600 kDa)	500	1,25	400			1
Saf su				25		
TEA	380	3,75	101,2	0,523	0,726	3
DMAP	7,64	0,0625	122,2			0,05
Laurik asit	375,6	1,875	200,3178		0,883	1,5
IPA				15		
TEA	380	3,75	101,2	0,523	0,726	3
Benzoil Klorür	264	1,875	140,6	0,218	1,21	1,5

Yukarıdaki tabloda da görüldüğü gibi HA-LA-8 sentezinde 124 kDa moleküler ağırlıklı HA, HA-LA-9 için ise 600 kDa moleküler ağırlıklı HA kullanılmıştır. Her iki modifikasyonda da çözücü IPA olarak seçilmiştir. HA: Laurik asit oranı da 1:1,5 olarak kullanılmıştır.

Aşağıda modifiye edilmiş tüm örneklerin liyofilizasyon sonrası nasıl görüldüğünün fotoğrafları tablo halinde verilmiştir.



Şekil 10. Modifiye edilmiş tüm örnekler

3.4. Çözünme Testleri

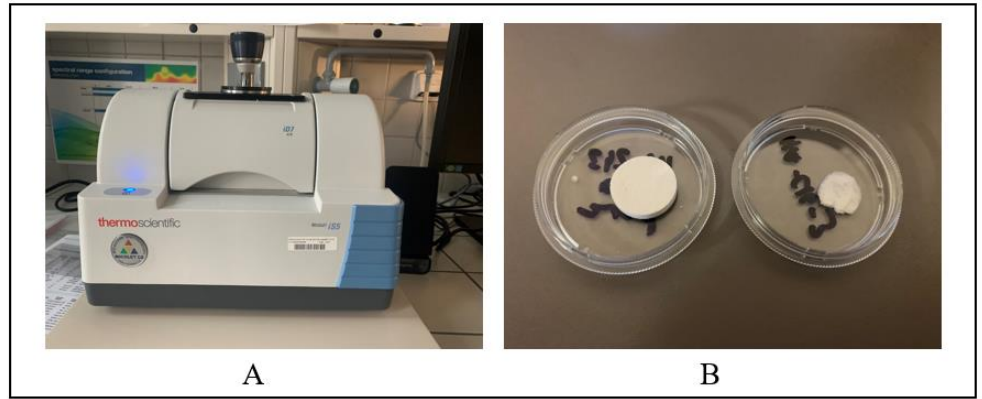
Modifiye edilmiş hyaluronan numunelerinin su ve alkol içerisindeki çözünürlüklerinin ilk etapta test edilebilmesi amacıyla çözünme testleri yapıldı. Laboratuvar şartlarında oda sıcaklığındaki ultra saf su ve izopropil alkol (IPA) kullanıldı.

Her modifikasyon sonrası liyofilize edilmiş örneklerden 5.0-5.5 mg aralığında alındı ve çözünürlük için ön test olarak IPA (1 ml), ultra saf su (1 ml) ve IPA-su karışımı (%50 IPA : su, 1 ml) içinde çözünme açısından test edildi. Çözünme testleri laboratuvar sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılarak gerçekleştirildi.

3.5. Hyaluronan Karakterizasyonu için Yöntemler

3.5.1. Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

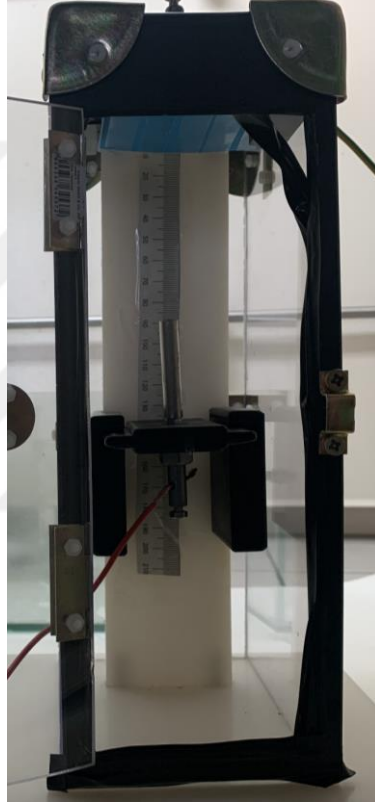
Saf hyaluronan, modifiye edilmiş numunelerle karşılaştırma için FTIR'da analiz edildi. Saf hyaluronan toz halinde bulunduğundan, Trystom pelet presi kullanılarak numune katı tablet olarak hazırlandı. Modifiye edilmiş hyaluronan numuneleri de FTIR numunelerinin hazırlık aşaması olarak küçük ve pürüzsüz parçalara kırılmıştır (Bkz. Şekil 4). Daha sonra modifiye edilmiş ve saf hyaluronan numuneleri Nicolet IS5 FT-IR spektrometresinde (Bkz. Şekil 11) Germanyum kristalli ATR düzenlemesinde analiz edilmiştir. Tüm spektrumlar, $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte 64 birikimde absorbans modunda kaydedildi.



Şekil 11. (A) FTIR Spektrometre, (B) Hazırlanmış FTIR numuneleri

3.6. Elektroeğirme Denemeleri

Modifiye edilmiş hyaluronan örnekleri içerisinde çözünme testlerinde bulanık görünüm vererek kısmi çözünme gösterenler seçilerek damlacık ile elektroeğirme cihazı ile denemeler gerçekleştirildi. Cihazın fotoğrafı Şekil 12’de verilmiştir. Bu denemeler sırasında kullanılan örnekler ve konsantrasyon değerleri de Tablo 7’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Elektroeğirme cihazı

Tablo 7. Elektroçirme denemeleri için kullanılan örnek-konsantrasyon değerleri

Örnek Adı	Konsantrasyon (w/v%)
HA-C16-1 (124 kDa)	8%
HA-C16-2 (124 kDa)	8%
HA-C16-3 (243 kDa)	5%
HA-C16-4 (243 kDa)	5%
HA-AC-3 (243 kDa)	5%
HA-LA-7 (600 kDa)	3%
HA-LA-8 (124 kDa)	8%
HA-LA-9 (600 kDa)	3%

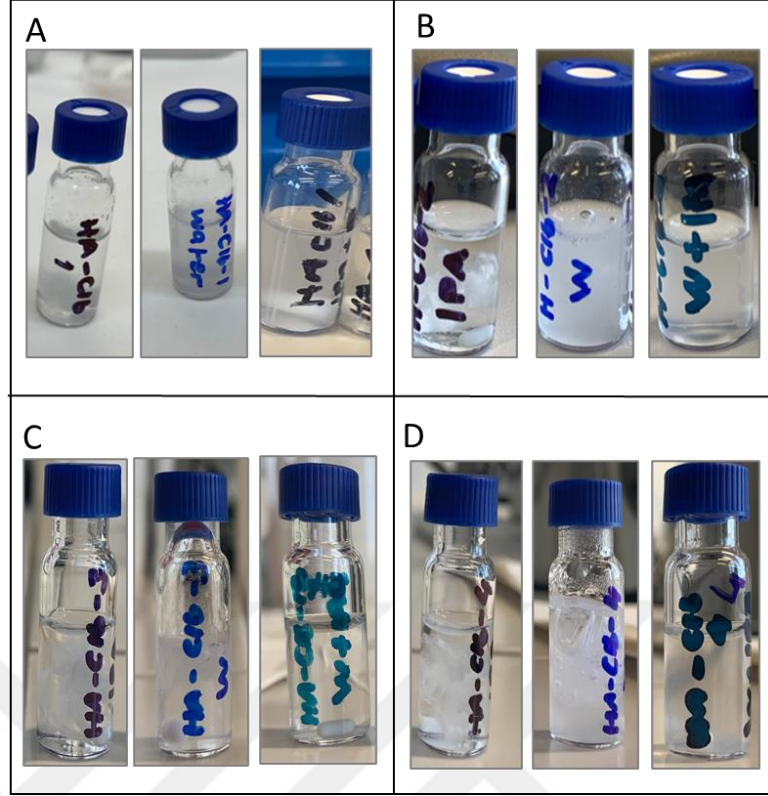
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Çözünme Testleri

Palmitik asit ile modifiye edilmiş örneklerin çözünme testi sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 8. Palmitik asit türevleri çözünme testleri sonuçları

Çözünen Örnek	Çözücü: IPA	Çözücü: Su	Çözücü: Su+IPA (%50)
HA-C16-1	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Kısmen çözündü (bulanık)
HA-C16-2	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Kısmen çözündü (bulanık)
HA-C16-3	Çözünme yok	Çözünme yok	Tamamen çözündü
HA-C16-4	Çözünme yok	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)

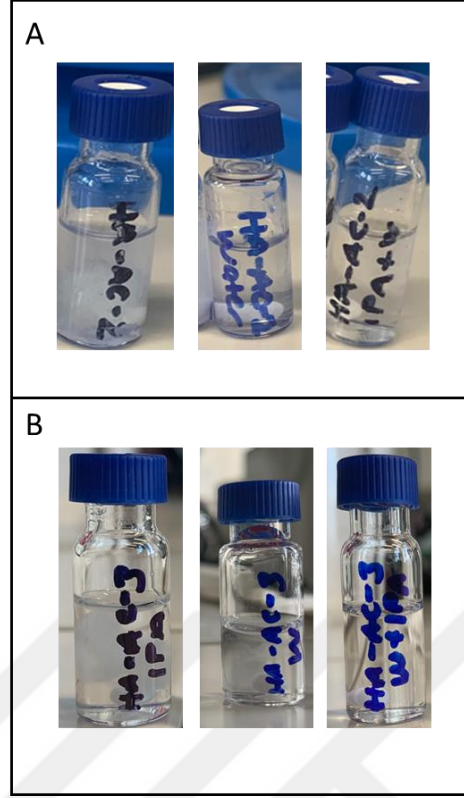


Şekil 13. Palmitik asit türevleri çözünme testleri

Hekzanoik anhidrit ile modifiye edilmiş örneklerin çözünme testi sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 9. Hekzanoik anhidrit türevleri çözünme testleri sonuçları

Çözünen Örnek	Çözücü: IPA	Çözücü: Su	Çözücü: Su+IPA (%50)
HA-AC-2	Çözünme yok	Tamamen çözündü	Tamamen çözündü
HA-AC-3	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Tamamen çözündü

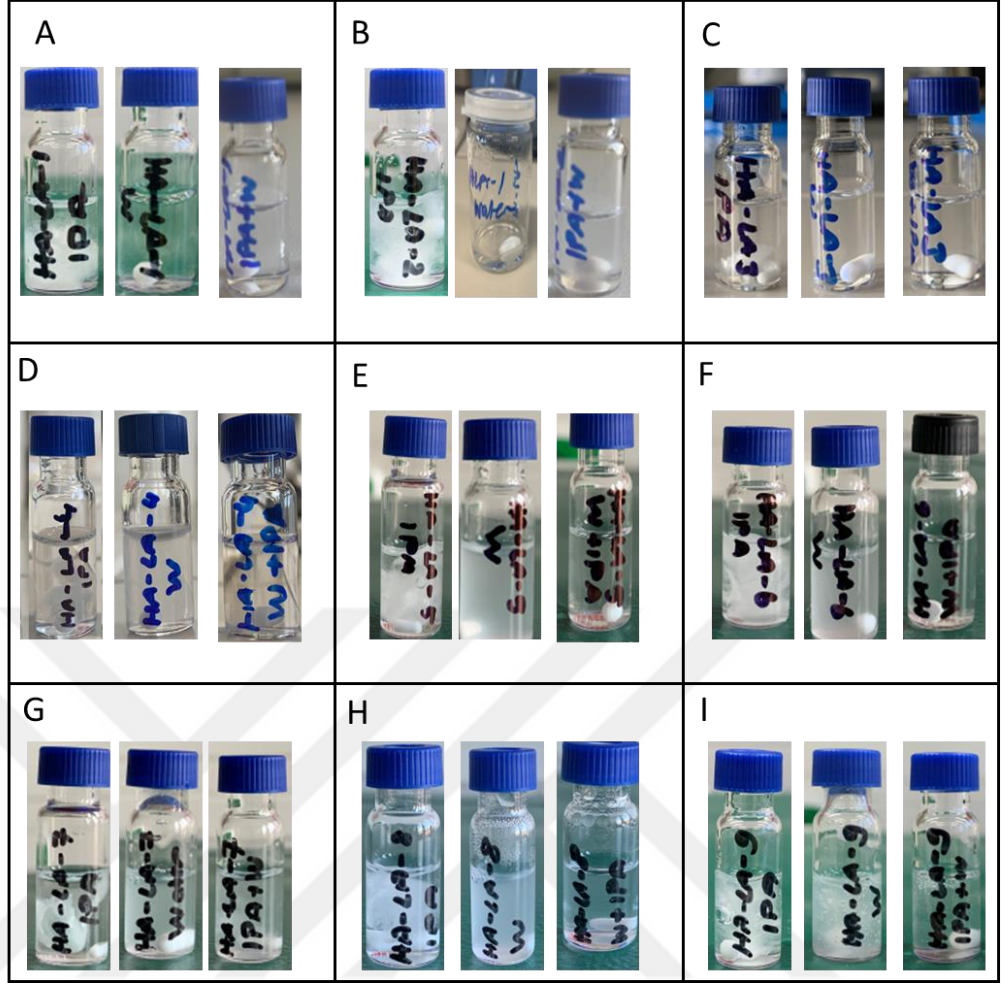


Şekil 14. Hekzanoik anhidrit türevleri çözünme testleri

Laurik asit ile modifiye edilmiş örneklerin çözünme testi sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 10. Laurik asit türevleri çözünme testleri sonuçları

Çözünen Örnek	Çözücü: IPA	Çözücü: Su	Çözücü: Su+IPA (%50)
HA-LA-1	Çözünme yok	Tamamen çözündü	Tamamen çözündü
HA-LA-2	Çözünme yok	Tamamen çözündü	Tamamen çözündü
HA-LA-3	Çözünme yok	Tamamen çözündü	Tamamen çözündü
HA-LA-4	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Tamamen çözündü
HA-LA-5	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Tamamen çözündü
HA-LA-6	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Tamamen çözündü
HA-LA-7	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Kısmen çözündü (bulanık)
HA-LA-8	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Tamamen çözündü
HA-LA-9	Çözünme yok	Kısmen çözündü (bulanık)	Tamamen çözündü



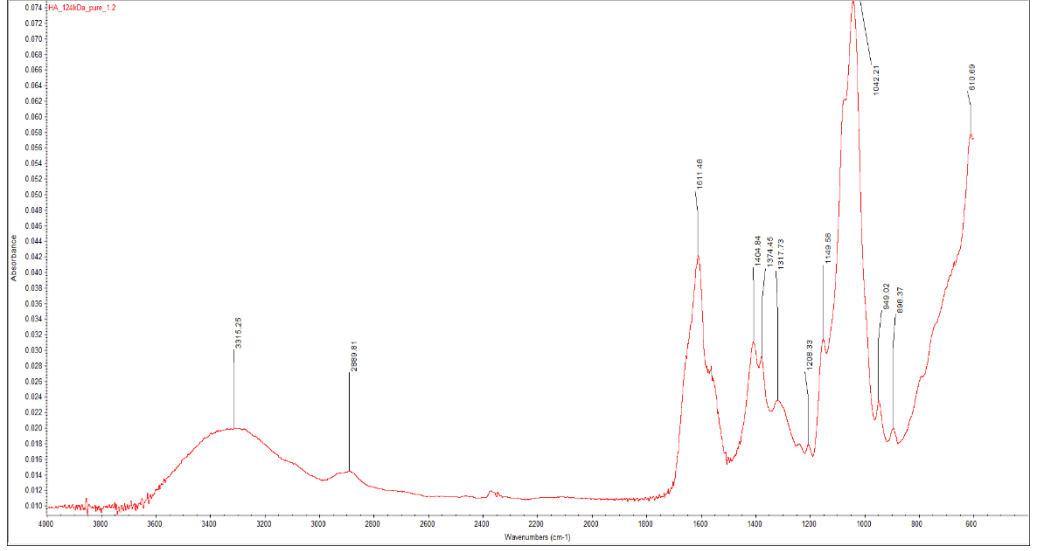
Şekil 15. Laurik asit türevleri çözünme testleri

4.2. FTIR Spektroskopisi Sonuçları

Kimyasal modifikasyonun varlığını belirleyebilmek için örnekler FTIR ile karakterize edilmiştir. Ancak modifiye hyaluronanın bağlarındaki değişimi karakterize edebilmek için öncelikle modifiye edilmemiş olan saf hyaluronan örneğinin FTIR ile karakterizasyonu yapılmıştır.

4.2.1. Modifiye Edilmemiş Hyaluronana ait FTIR Spektroskopisi

Modifiye edilmemiş hyaluronan örneğinin FTIR spektrumu aşağıdaki grafikte verilmiştir.



Şekil 16. Modifiye edilmemiş hyaluronan FTIR Spektrometresi

Tek Bağ Alanı (2500-4000 cm^{-1})

- 3250-3550 cm^{-1} arasındaki geniş bant, hidroksil veya amonyum (OH^- , NH^-) varlığını doğrulamaktadır. Bunun yanında 1600-1300 cm^{-1} , 1200-1000 cm^{-1} ve 800-600 cm^{-1} alanları arasındaki pikler de hidroksil grubunun varlığını göstermektedir.
- 2935-2860 cm^{-1} arasındaki pikler, uzun zincirli lineer alifatik bileşiklerin varlığını doğrular. Bu zirveleri, alkil zincirlerinin varlığını doğrulayan 1470-720 cm^{-1} arasındaki bazı zirveler takip eder.

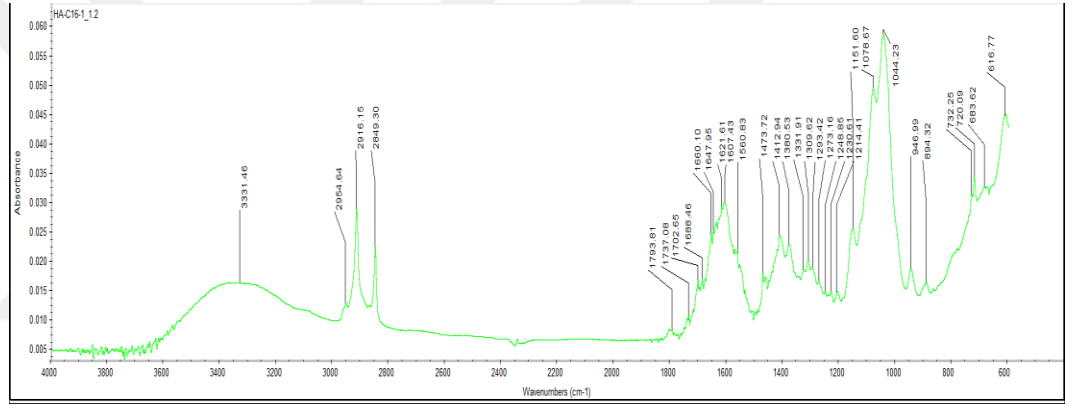
Çift Bağ Alanı (1500-2000 cm^{-1})

- Pikler, karbonil grubunun (esterlerin) varlığını doğrulayan 1750-1700 cm^{-1} alanı arasında ayırt edilir.
- 1700 cm^{-1} 'in altındaki pikler, amid ve karboksilik bağları ifade eder.
- Karboksilik asit piklerinin yoğunluğunun azalması modifikasyonu doğrulayacaktır (Nandiyanto, Oktiani ve Ragadhita, 2019)

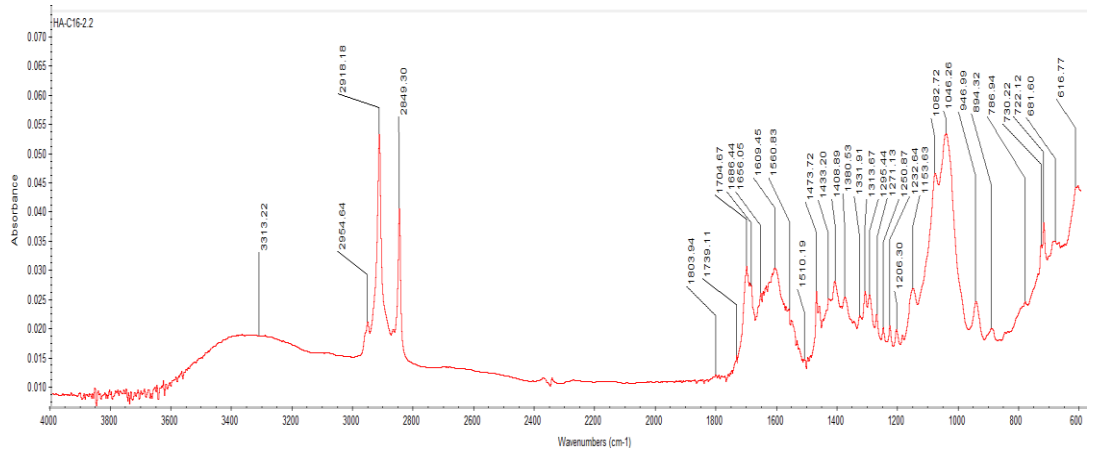
4.2.2. Palmitik asit ile modifiye edilmiş hyaluronana ait FTIR Spektroskopisi

Modifikasyon sonrası elde edilen palmitik asit ile modifiye edilmiş hyaluronan örneklerinin FTIR spektrumları aşağıda verilmiştir. Bu spektrumlardaki önemli zirveler ve pikler ile modifikasyon doğrulaması ve modifiye örneğin karakterizasyonu yapılmıştır.

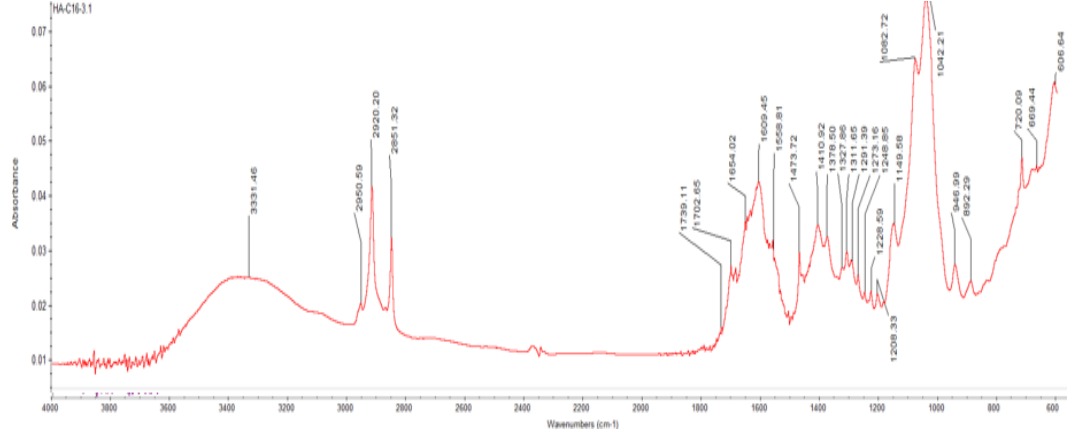
Aşağıdaki grafiklerde sırasıyla Şekil 17 ve Şekil 18’de palmitik asit ile modifiye edilmiş olan 124 kDa moleküler ağırlığa sahip hyaluronan örneğinin, Şekil 19 ve Şekil 20’de ise palmitik asit ile modifiye edilmiş olan 243 kDa FTIR spektrumu görülmektedir.



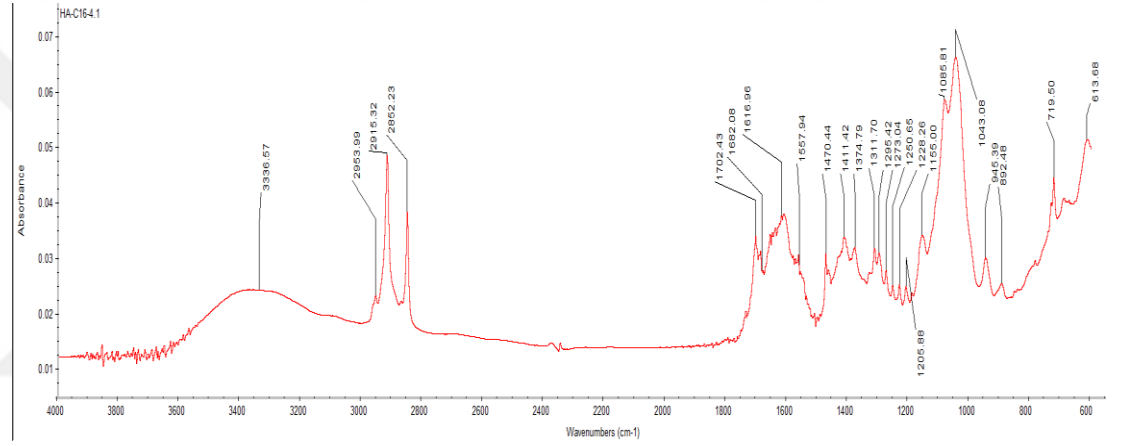
Şekil 17. HA-C16-1 (MW: 124 kDa, Çözücü: THF) FTIR Spektrumu



Şekil 18. HA-C16-2 (MW: 124 kDa, Çözücü: IPA) FTIR Spektrumu



Şekil 19. HA-C16-3 (MW:243 kDa Çözücü: THF) FTIR Spektrumu



Şekil 20. HA-C16-4 (MW:243 kDa Çözücü: IPA) FTIR Spektrumu

Tek bağ alanı 3000-3500 cm^{-1} aralığındaki geniş bant N-asetil fonksiyonel grubunun N-H'si ile HA ve artık suyun -OH grupları nedeniyle O-H'nin germe titreşimlerini göstermektedir.

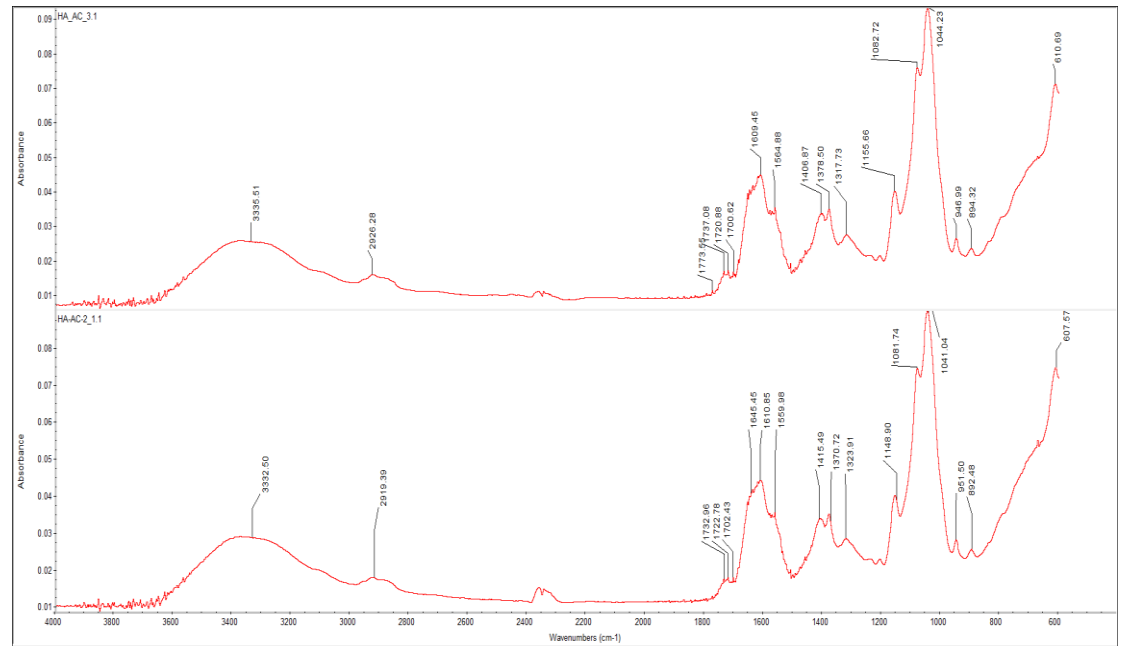
2800-3000 cm^{-1} aralığında gelen piklerde saf hyaluronan spektrumundakine göre modifiye olanlarda ciddi bir artış görülmektedir. Buradaki artış alkil zincirlerinin (-CH- antisimetrik ve -CH₂- ve -CH₃'ün simetrik gerilmesi) titreşimine karşılık gelir (Diaz-Salmeron, Ponchel ve Bouchemal, 2019). Yani buradaki bağların yoğunluğunda bir artış olması GlcNAc'nin 6. pozisyonundaki hidroksil grubunun hidrofobikleşmesini doğrulamaktadır. Bu bölgedeki önemli tepe noktaları HA-C16-1 için 2916.25 cm^{-1} , HA-C16-2 için 2918.18 cm^{-1} , HA-C16-3 için 2920.20 cm^{-1} ve HA-C16-4 için 2915.32 cm^{-1} zirveleri bu bölgede artış göstermiştir.

1700-1750 cm^{-1} aralığında yer alan pikler ise ester-karbonil grubu titreşimi için karakteristik bandıdır ($-\text{C}=\text{O}$ gerilmesi). Karbonil ester grubunun titreşimine karşılık gelen modifikasyonu onaylamaktadır. Palmitik asit ile modifiye edilmiş tüm örneklerde bu bölgede bazı pikler görülmektedir. HA-C16-1 için 1737 cm^{-1} , HA-C16-2 için 1739 cm^{-1} , HA-C16-3 ve HA-C16-4 için 1702 cm^{-1} de gelen pikler kimyasal modifikasyonu doğrular niteliktedir.

1700 cm^{-1} altındaki piklere bakıldığında karboksilik asitleri ifade eden bu piklerin boyundaki kısılma ortamdaki karboksilik asit fonksiyonel gruplarının azaldığını göstermektedir. Bu grupların piklerinde görülen belirgin azalma da kimyasal modifikasyon nedeniyle alkilleşmeyi doğrulamaktadır.

4.2.3. Hekzanoik anhidrit ile modifiye edilmiş hyaluronana ait FTIR Spektroskopisi

Modifikasyon sonrası elde edilen hekzanoik anhidrit ile modifiye edilmiş hyaluronan örneklerinin FTIR spektrumları aşağıda verilmiştir. Şekil 21'de hekzanoik anhidrit ile modifiye edilmiş 124 kDa moleküler ağırlıklı ve 243 kDa moleküler ağırlıklı modifiye hyaluronan örneklerinin FTIR spektrumları verilmiştir. Bu spektrumlardaki modifikasyona ilişkin önemli zirveler gösterilmiş ve modifiye örneğin karakterizasyonu yapılmıştır.



Şekil 21. HA-AC-3 (243 kDa)/ HA-AC-2 (124 kDa) FTIR Spektrumları

Her iki örnekte de 2800-2950 cm^{-1} aralığındaki tepe noktalarında artış görülmektedir. HA-AC-2'de 2919.39 cm^{-1} , HA-AC-3'te 2926.28 cm^{-1} 'de görülen artış -CH, -CH₂ ve -CH₃ alkil zincirlerindeki titreşimlere ithaf edilmektedir. Bu titreşimlerdeki artış modifikasyon oluşumunu desteklemektedir (Diaz-Salmeron, Ponchel ve Bouchemal, 2019).

HA-AC-2 için 1732.96 cm^{-1} ve HA-AC-3 için 1737.08 cm^{-1} 'de görülen karakteristik pikler karbonil ester grubunun titreşimini göstermektedir. Bu zirveler heksanoik anhidrit ile hyaluronan arasındaki bağ oluşumunu kanıtlamaktadır.

HA-AC-2 ve HA-AC-3 arasındaki temel fark moleküler ağırlıklarının 124 kDa ve 243 kDa şeklinde birbirinden farklı oluşudur. Ancak, moleküler ağırlıklarının farklı olmasının heksanoik anhidrit ile yapılan kimyasal modifikasyon için FTIR spektrumunda bir etkisi gözlenmemiştir.

4.2.4. Laurik Asit ile modifiye edilmiş hyaluronana ait FTIR

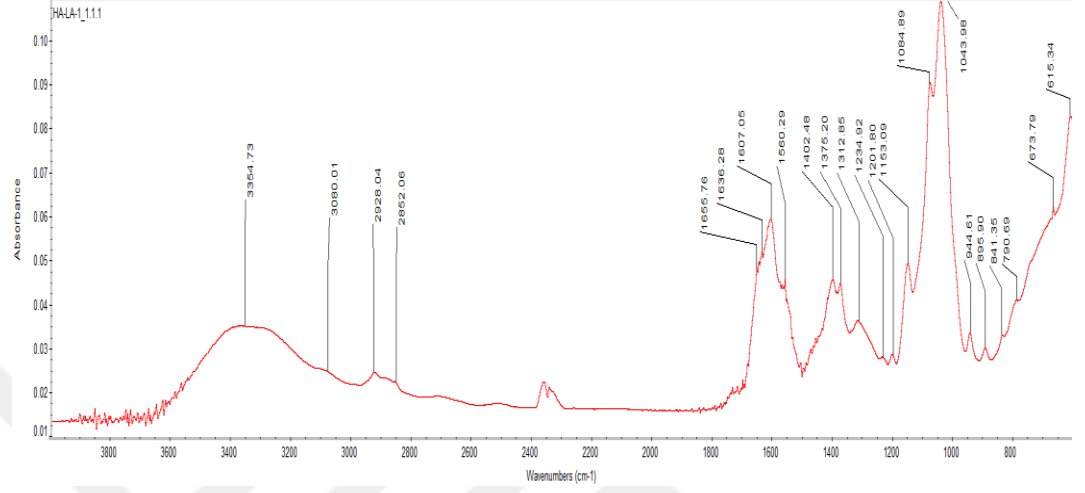
Spektroskopisi

Laurik asit ile modifikasyonu yapılan örneklerin FTIR spektrumları incelenmiştir. Laurik asit modifikasyonu için 9 farklı örnek çalışılmıştır. Hazırlanan örneklerin arasındaki parametre farkları aşağıdaki tablo üzerinde gösterilmiştir (Tablo 11).

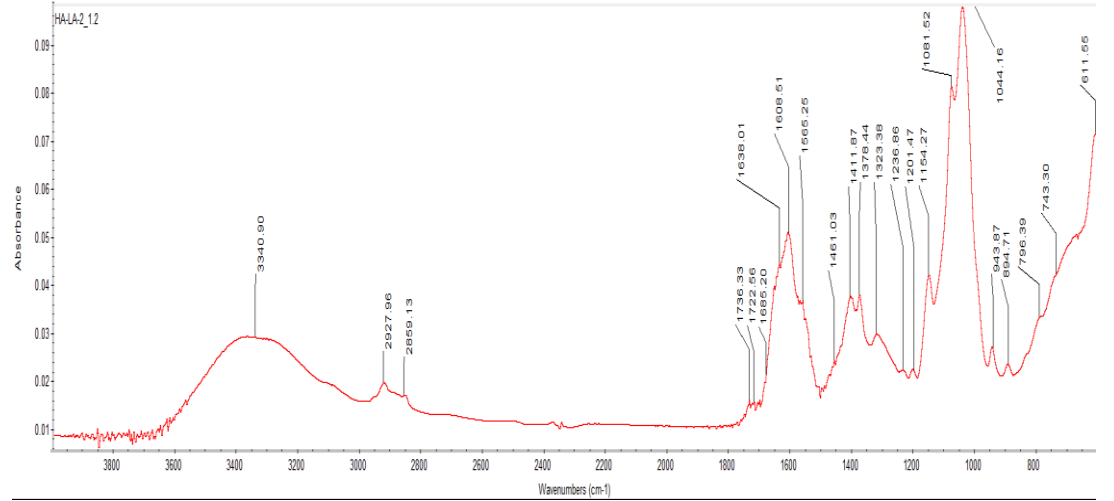
Tablo 11. Laurik asit ile modifiye edilmiş örneklerin kod numaralarına göre parametre farkları

Kod no	HA Moleküler Ağırlığı (kDa)	Kullanılan Çözücü	nHA:nLA Eşdeğer Oran
HA-LA-1	124	THF	1.0:1.0
HA-LA-2	124	IPA	1.0:1.0
HA-LA-3	243	THF	1.0:1.0
HA-LA-4	243	IPA	1.0:1.0
HA-LA-5	124	IPA	1.0:1.5
HA-LA-6	243	IPA	1.0:1.5
HA-LA-7	600	IPA	1.0:1.5
HA-LA-8	124	IPA	1.0:1.5
HA-LA-9	600	IPA	1.0:1.5

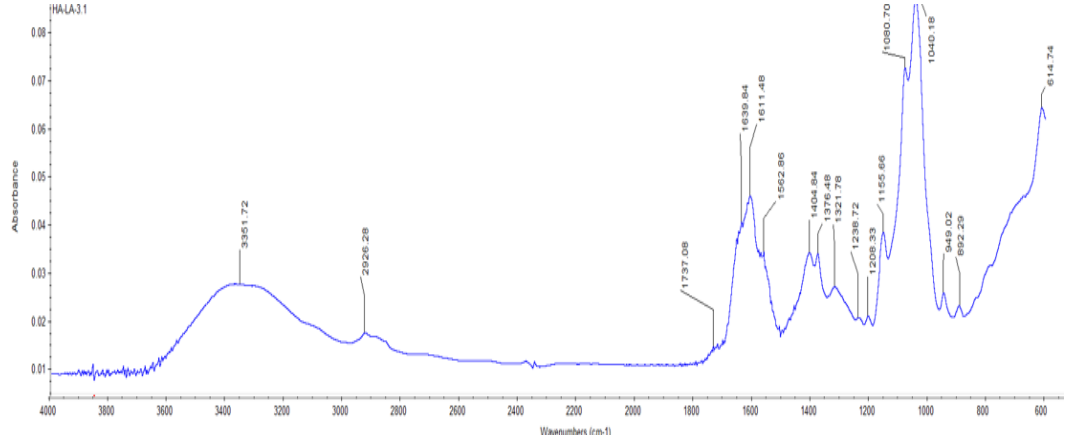
Aşağıdaki grafiklerde sırasıyla Şekil 22 ve Şekil 23’de laurik asit ile modifiye edilmiş olan 124 kDa moleküler ağırlığa sahip hyaluronan örneklerinin, Şekil 24 ve Şekil 25’te ise laurik asit ile modifiye edilmiş olan 243 kDa FTIR spektrumu görülmektedir.



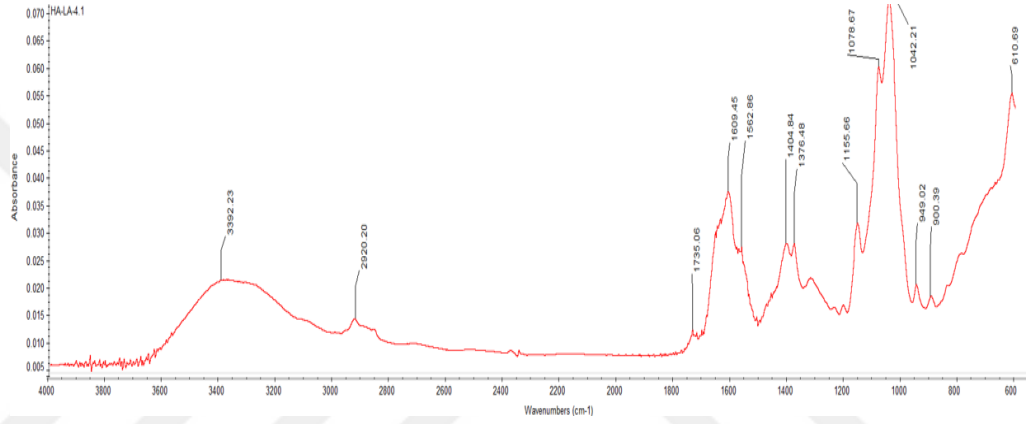
Şekil 22.HA-LA-1 FTIR Spektrumu



Şekil 23. HA-LA-2 FTIR Spektrumu



Şekil 24. HA-LA-3 FTIR Spektrumu

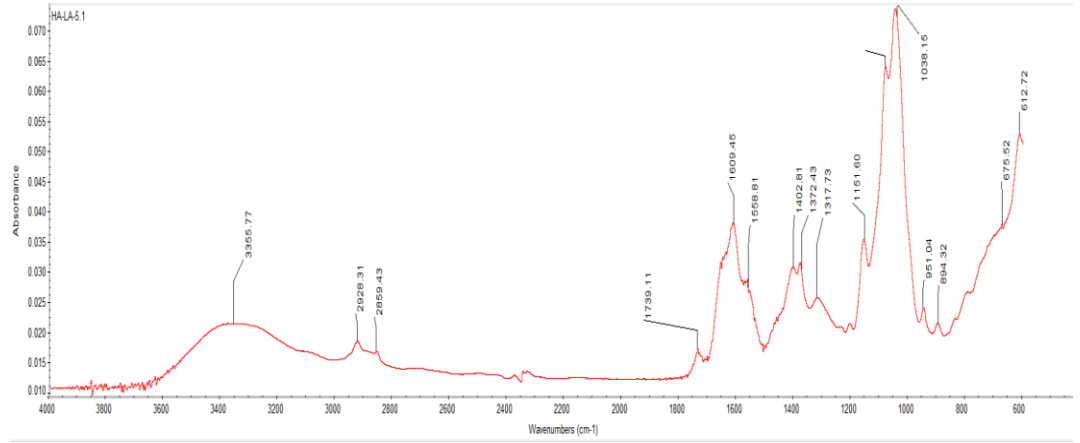


Şekil 25. HA-LA-4 FTIR Spektrumu

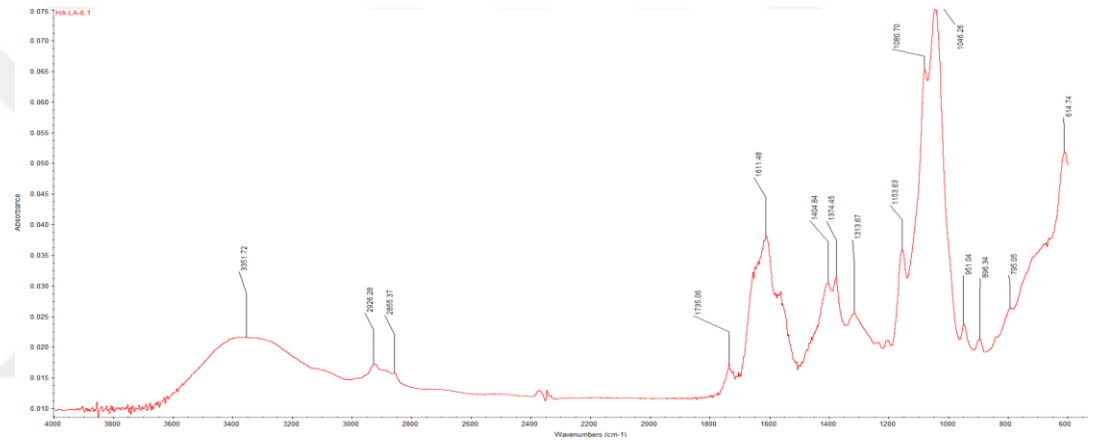
2800-3000 cm^{-1} aralığında alkil zincirlerinin titreşimine (-CH- antisimetrik ve -CH₂- ve -CH₃'ün simetrik gerilmesi) karşılık gelen bant ve tepe noktalarında hafif artışlar görülmektedir. Bu bölgedeki önemli tepe noktaları HA-LA-1 için 2928.04 cm^{-1} , HA- LA -2 için 2927.96 cm^{-1} , HA- LA -3 için 2926.28 cm^{-1} ve HA- LA -4 için 2920.20 cm^{-1} zirveleri bu bölgede artış göstermiştir.

1700-1750 cm^{-1} aralığında yer alan tepe noktalarına bakıldığında HA-LA-2 için 1736.33 cm^{-1} , HA-LA-3 için 1737.08 cm^{-1} , HA-LA-4 için 1735.05 cm^{-1} de küçük pikler görülmektedir.

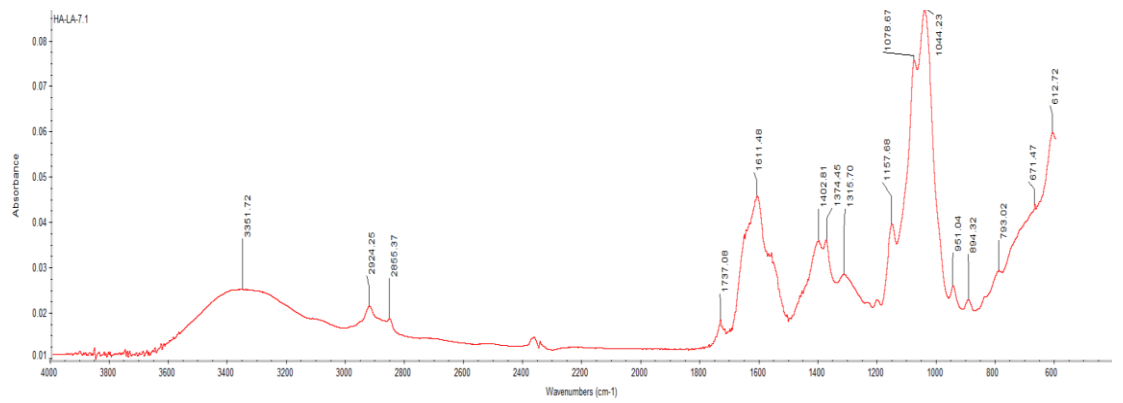
Bu sonuçlardan yola çıkılarak laurik asit mol eşdeğer oranı artırılarak modifikasyonlar (HA-LA-5-6-7-8-9) gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki grafiklerde sırasıyla Şekil 26'da laurik asit ile modifiye edilmiş olan moleküler ağırlığı 124 kDa, Şekil 27'de moleküler ağırlığı 243 kDa, Şekil 28'de moleküler ağırlığı 600 kDa FTIR spektrumu görülmektedir.



Şekil 26. HA-LA-5 FTIR Spektrumu



Şekil 27. HA-LA-6 FTIR Spektrumu

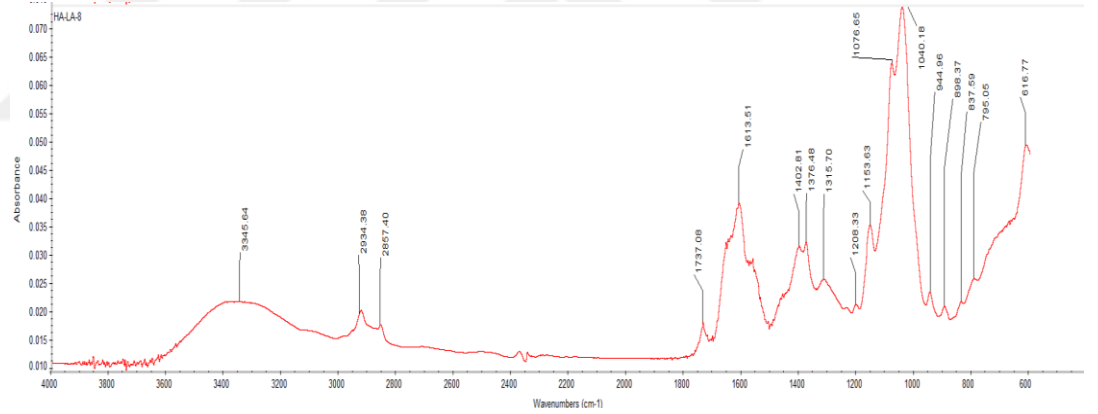


Şekil 28. HA-LA-7 FTIR Spektrumu

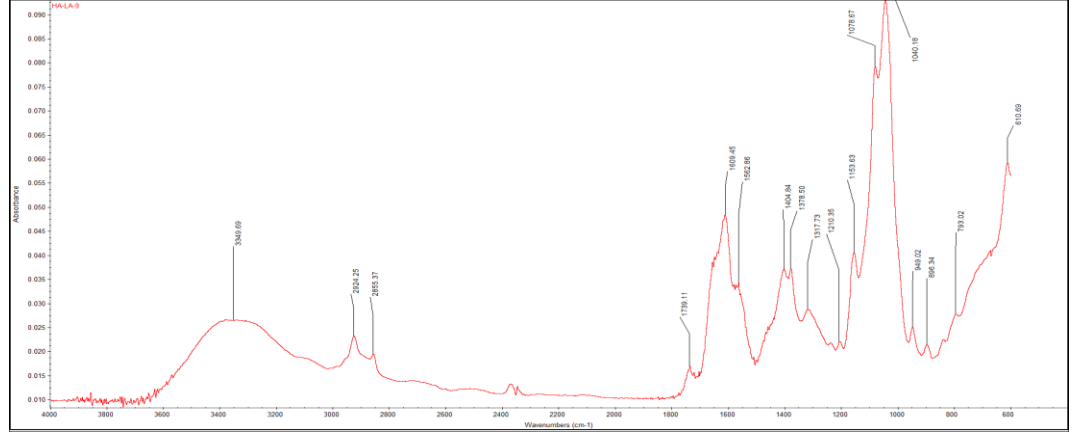
2800-3000 cm^{-1} aralığında alkil zincirlerinin titreşimine (-CH- antisimetrik ve -CH₂- ve -CH₃'ün simetrik gerilmesi) karşılık gelen bant ve tepe noktalarında artışların olduğu görülmektedir. Bu bölgedeki önemli tepe noktaları HA-LA-5 için 2928.31 cm^{-1} , HA-LA -6 için 2926.28 cm^{-1} , HA-LA -7 için 2924.25 cm^{-1} zirveleri bu bölgede artış göstermiştir.

1700-1750 cm^{-1} aralığında yer alan tepe noktalarına bakıldığında mol eşdeğer oranında yapılan artış ile modifikasyonları doğrulayan zirveler ortaya çıkmıştır. HA-LA-5 için 1739.11 cm^{-1} , HA-LA-6 için 1735.11 cm^{-1} , HA-LA-7 için 1737.08 cm^{-1} de görülen tepe noktaları karbonil ester oluşumunu doğrulamaktadır (Huerta-Ángeles vd., 2020).

HA-LA-8 ve HA-LA-9 alınan sonuçlara göre HA-LA-5 ve HA-LA-7'nin tekrar sentezidir. Onların da FTIR spektrumları Şekil 29 ve Şekil 30 'da verilmiştir.



Şekil 29. HA-LA-8 FTIR Spektrumu



Şekil 30. HA-LA-9 FTIR Spektrumu

Şekil 29 ve Şekil 30’da gösterilen HA-LA-8 ve HA-LA-9 örneklerinin FTIR grafikleri incelenmiştir. 2800-3000 cm^{-1} aralığında alkil zincirlerinin titreşimine ($-\text{CH}-$ antisimetrik ve $-\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}_3$ ’ün simetrik gerilmesi) karşılık gelen bant ve tepe noktalarında artışlar görülmektedir. Bu bölgedeki önemli tepe noktaları HA-LA-8 için 2934.38 cm^{-1} , HA-LA-9 için 2924.25 cm^{-1} olarak görülmektedir.

1700-1750 cm^{-1} aralığında yer alan tepe noktalarına bakıldığında HA-LA-8 için 1737.08 cm^{-1} , HA-LA-9 için 1739.11 cm^{-1} , de gösterilen zirveler modifikasyonu kanıtlamaktadır.

4.3 ELEKTROEĞİRME DENEME SONUÇLARI

Elektroeğirmede bir Taylor konisi oluşturmanın önemi, ince ve sürekli bir polimer çözeltisi akışı oluşumuna izin vermesidir. Elektrik alan kuvveti arttıkça, polimer çözeltisinin yüzey gerilimi aşılar ve damlacık, bir toplayıcıya ulaştığında bir nanofiber halinde katılaştıran ince bir jet halinde uzar (Reneker ve Yarin, 2008).

Bir Taylor konisi oluşmadan, polimer çözeltisi sürekli bir jet oluşturamayacağından, elektroeğirme işlemi mümkün olmazdı. Bu nedenle, bir Taylor konisinin oluşturulması, elektroeğirme işleminde çok önemli bir adımdır.

Palmitik asit, hekzanoik anhidrit ve laurik asit ile modifikasyonları yapılmış olan örneklerin arasından çözünme testlerinde ve FTIR spektrumu sonuçlarına bakılarak bazı örnekler seçilmiş ve bu örneklerin elektroeğirmede kullanılıp kullanılmayacağına dair denemeleri yapılmıştır.

Elektroegirmede uygulanan elektrik alanın değeri kilovolt cinsinden ölçölmüş olup, en fazla 40 kilovolta kadar çıkmıştır. Yavaş yavaş elektrik alan değeri artırılarak gözlemlenen örneklerin Taylor konisi oluşturup oluşturmayacağına bakılmıştır. Sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 12. Elektroegirme denemelerinde kullanılan örnekler

Örnek adı	Konsantrasyon (w/v%)	Taylor Konisi	Max kV
HA-C16-1 (124 kDa)	8%	yok	40
HA-C16-2 (124 kDa)	8%	yok	30
HA-C16-3 (243 kDa)	5%	var	23.6
HA-C16-4 (243 kDa)	5%	var	32
HA-AC-3 (243 kDa)	5%	var	20.2
HA-LA-7 (600 kDa)	3%	var	19
HA-LA-8 (124 kDa)	8%	var	26.5
HA-LA-9 (600 kDa)	3%	var	20.5

Tablo 12'ye göre elektroegirme işleminde denenmiş olan modifiye edilmiş örneklerin bir kısmında Taylor konisinin oluştuğu, bir kısmında ise oluşmadığı gözlemlenmiştir.

%8 lik konsantrasyonda hazırlanan 124 kDa moleküler ağırlığa sahip HA-C16-1 ve HA-C16-2 örneklerinin Taylor konisi oluşturmamıştır. Burada uygulanan voltajın yetersiz kalması, polimer çözeltisinin yeterince iletken olmaması veya oluşturulan yüzeyin yükünün yetersiz oluşu gibi faktörler bu durumun sebepleri arasında gösterilebilir.

Uygulamanın yapıldığı düzenekte nanolif elde edilmesi sağlanamamış olsa da kullanılan diğer örneklerde Taylor konisinin şekil olarak oluştuğu tespit edilmiştir. Palmitik asit, hekzanoik anhidrit ve laurik asit modifikasyonlarının elektroegirme ile nanolif oluşturabilmek için umut verici türevler oluşturduğu bu çalışma ile gösterilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hyaluronan birçok biyomedikal uygulama için uygun özellikler sergiler, ancak HA'nın çözünürlüğü sulu ortamlarda kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu tezde bir biyopolimer olan hyaluronanın uzun yağ asit zincirleriyle kimyasal olarak modifiye edilerek suda ve izopropil alkol içerisinde kısmen çözünen hyaluronan türevlerinin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu türevlerin üretimi sırasında moleküler ağırlık, üretimi sırasında kullanılan çözücü ve modifiye ajanın eşdeğer mol oranı parametrelerinde değişiklikler yapılarak bu parametrelerin etkileri gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, modifiye edilen hyaluronanın biyomedikal uygulamalardaki fiber kullanımını test etmek için elektroğirmedi farklı parametrelerde denemeler yapılarak sonuçları gözlemlenmiştir.

Modifikasyon reaksiyonları hyaluronanın aktif bölgelerinden OH gruplarının uzun yağ asit zincirleriyle esterifikasyonunu içermektedir. Reaksiyonlarda palmitik asit, hekzanoik anhidrit ve laurik asit modifiye ajanı olarak kullanılmıştır. Bu modifiye ajanların hyaluronanın ana zincir yapısını bozmadan hyaluronanı asilleştirmesi hedeflenmiştir. Bu yöntemler kullanılarak toplamda 15 farklı HA türevi sentezlenmiştir. Modifikasyon reaksiyonları tamamlandıktan sonra çözünme testleri yapılarak modifiye ürünlerin su ve izopropil alkol karışımında nasıl davrandığı gözlemlenmiştir. Modifiye edilmiş HA türevleri FTIR ile karakterize edilerek asilleşme doğrulanmıştır. Daha sonra içlerinden seçilen örnekler elektroğirmedi denenerek Taylor konisi oluşturup oluşturmadığına bakılmıştır.

Üretilen türevlerin hepsinde modifikasyonun varlığı FTIR ile desteklenmektedir. Kullanılan farklı moleküler ağırlıklı saf hyaluronan örneklerinin modifikasyonda büyük bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bu da farklı biyomedikal uygulamalar için kullanılabilecek farklı moleküler ağırlıklara sahip hyaluronanın modifikasyonda kullanılabileceğini göstermektedir.

Su-izopropil alkol karışımı ile yapılan çözünme testlerinde laurik asit ve palmitik asit ile modifiye edilen örneklerin kısmen çözünme göstererek çözeltilde istenen bulanık görünümü oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan elektroğirme denemelerinde ise seçilen örneklerden fiber elde edilmesi sağlanamamıştır ancak palmitik asit, laurik asit ve hekzanoik anhidrit ile

modifiye edilmiş olan hyaluronan türevlerinin Taylor konisi oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bunun anlamı modifiye edilen örneklerin eğirilebilir (elektroeğirmede kullanılabilecek) özellikler taşıdığını göstermektir. İlerideki çalışmalarda bu modifikasyonlar kullanılarak nanolif elde edilebileceğine dair umut verici özellik göstermektedirler.

Bu çalışmada hyaluronanın çapraz bağlanma olmaksızın uzun alkil zincirleri kullanarak hidrofobik modifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen palmitik asit, hekzanoik anhidrit ve laurik asit ile modifiye edilmiş türevlerin biyomedikal alanda önemli uygulamalarda kullanılan elektroeğirme yönteminde kullanılabilecek türevler olduğu sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Hazeem, N. Z. A. (2018) “Nanofibers and Electrospinning Method”, *Novel Nanomaterials - Synthesis and Applications*. doi: 10.5772/INTECHOPEN.72060.
- Almeida, P. V vd. (2014) “Amine-modified hyaluronic acid-functionalized porous silicon nanoparticles for targeting breast cancer tumors †”. doi: 10.1039/c4nr02187h.
- Amorim, S. vd. (2021) “Extracellular Matrix Mimics Using Hyaluronan-Based Biomaterials”, *Trends in Biotechnology*, 39(1), ss. 90–104. doi: 10.1016/J.TIBTECH.2020.06.003.
- Boeriu, C. G. vd. (2013) “Production Methods for Hyaluronan”, *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2013, ss. 1–14. doi: 10.1155/2013/624967.
- Carson, R. S. ve Hendricks, C. D. (1965) “Natural pulsations in electrical spraying of liquids”, *AIAA Journal*, 3(6), ss. 1072–1075. doi: 10.2514/3.3056.
- Castro, K. C., Campos, M. G. N. ve Mei, L. H. I. (2021) “Hyaluronic acid electrospinning: Challenges, applications in wound dressings and new perspectives”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 173, ss. 251–266. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.01.100.
- Choi, S. M. vd. (2018) *Advances in Protein-Based Materials: From Origin to Novel Biomaterials, Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-981-13-0950-2_10.
- Cleland, R. L. (1968) “Ionic polysaccharides. II. Comparison of polyelectrolyte behavior of hyaluronate with that of carboxymethyl cellulose”, *Biopolymers*, 6(11), ss. 1519–1529. doi: <https://doi.org/10.1002/bip.1968.360061102>.
- Cooley, J. F. (1902) *APPARATUS FOR ELECTRICALLY DisPERSING FLUIDs*.
- Derakhshanfar, S. vd. (2018) “3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances”, *Bioactive Materials*, 3(2), ss. 144–156. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.11.008.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Diaz-Salmeron, R., Ponchel, G. ve Bouchemal, K. (2019) “Hierarchically built hyaluronan nano-platelets have symmetrical hexagonal shape, flattened surfaces and controlled size”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 133, ss. 251–263. doi: 10.1016/J.EJPS.2019.04.007.

Dicker, K. T. vd. (2014) “Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions”, *Acta Biomaterialia*, 10(4), ss. 1558–1570. doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.019.

Fallacara, A. vd. (2018) “Hyaluronic Acid in the Third Millennium”, *Polymers* 2018, Vol. 10, Page 701, 10(7), s. 701. doi: 10.3390/POLYM10070701.

Federico, S. vd. (2021) “Hyaluronan alkyl derivatives-based electrospun membranes for potential guided bone regeneration: Fabrication, characterization and in vitro osteoinductive properties”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, s. 111438. doi: 10.1016/J.COLSURFB.2020.111438.

Foglarová, M. vd. (2016) “Water-insoluble thin films from palmitoyl hyaluronan with tunable properties”, *Carbohydrate Polymers*, 144, ss. 68–75. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.02.027.

Garcia, C. G. vd. (2021) “Novel Nanofibers Made of Chitosan/Hyaluronan Electrostatic Complex”, *jnanoworld.com*, 7(1), ss. 8–12. doi: 10.17756/nwj.2021-086.

Garg, H. G. ve Hales, C. A. (2004) *Chemistry and Biology of Hyaluronan*.

H.G. Garg ve Hales, C. A. (2019) “Chemistry and Biology of Hyaluronan”, ss. 7–8. doi: 10.1016/B978-0-08-044382-9.50030-3.

Hargittai, I. ve Hargittai, M. (2008) “Molecular structure of hyaluronan: An introduction”, *Structural Chemistry*, 19(5), ss. 697–717. doi: 10.1007/s11224-008-9370-3.

Huerta-Angeles, G. vd. (2016) “Synthesis of photo-crosslinkable hyaluronan with tailored degree of substitution suitable for production of water resistant nanofibers”,

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Carbohydrate Polymers, 137, ss. 255–263. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.077.

Huerta-Ángeles, G. vd. (2020) “Formulation of hyaluronan grafted with dodecanoic acid as a potential ophthalmic treatment”, *Carbohydrate Polymers*, 246, s. 116578. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2020.116578.

Kogan, G. vd. (2007) “Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications”, *Biotechnology Letters*, 29(1), ss. 17–25. doi: 10.1007/s10529-006-9219-z.

Kuo, J. W., Swarm, D. A. ve Prestwich, G. D. (1991) “Chemical Modification of Hyaluronic Acid by Carbodiimides”, *Bioconjugate Chemistry*, 2(4), ss. 232–241. doi: 10.1021/bc00010a007.

Laurent, T.C. ; Balazs, E.A., E. . A. press: (1970) “Structure of hyaluronic acid”, içinde *Chemistry and the Molecular Biology in the Intracellular Matrix*. London, UK: Academic Press, s. 703.

Levene, P. A. ve Lopez-Suarez, J. (1918) “Mucin and mucoids”, *Journal of Biological Chemistry*, 36, ss. 105–126.

Li, N. vd. (2021) “3D printing to innovate biopolymer materials for demanding applications: A review”, *Materials Today Chemistry*, 20. doi: 10.1016/j.mtchem.2021.100459.

Manou, D. vd. (2019) “The Complex Interplay Between Extracellular Matrix and Cells in Tissues”, *Methods in Molecular Biology*, 1952, ss. 1–20. doi: 10.1007/978-1-4939-9133-4_1.

Matelová, A. vd. (2016) “Synthesis of novel amphiphilic hyaluronan containing-aromatic fatty acids for fabrication of polymeric micelles”, *Carbohydrate Polymers*, 151, ss. 1175–1183. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.06.085.

Meyer, K. ve Palmer, J. W. (1934) “the Polysaccharide of the Vitreous Humor”, *Journal of Biological Chemistry*, 107(3), ss. 629–634. doi: 10.1016/s0021-9258(18)75338-6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Morton, W. (1900) “Method of dispersing fluids.”, 691(705).

Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R. ve Ragadhita, R. (2019) “How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material”, *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), ss. 97–118. doi: 10.17509/ijost.v4i1.15806.

de Oliveira, J. D. vd. (2016) “Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms”, *Microbial Cell Factories*, 15(1), s. 119. doi: 10.1186/s12934-016-0517-4.

Pavan, M. vd. (2016) “Hyaluronic acid alkyl derivative: A novel inhibitor of metalloproteases and hyaluronidases”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 84, ss. 221–226. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2015.12.003.

Petta, D. vd. (2018) “3D bioprinting of a hyaluronan bioink through enzymatic-and visible light-crosslinking”, *Biofabrication*, 10(4). doi: 10.1088/1758-5090/AADF58.

Rahmati, M. vd. (2021) “Electrospinning for tissue engineering applications”, *Progress in Materials Science*, 117, s. 100721. doi: 10.1016/J.PMATSCI.2020.100721.

Rangaswamy, V. ve Jain, D. (2008) “An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*”, *Biotechnology Letters*, 30(3), ss. 493–496. doi: 10.1007/s10529-007-9562-8.

Reneker, D. H. ve Yarin, A. L. (2008) “Electrospinning jets and polymer nanofibers”, *Polymer*, 49(10), ss. 2387–2425. doi: 10.1016/J.POLYMER.2008.02.002.

Rinaudo, M. (2008) “Review Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials”, *Polymer International Polym Int*, 57, ss. 397–430. doi: 10.1002/pi.2378.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Russell, D. L. ve Salustri, A. (2006) “Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex”, *Seminars in Reproductive Medicine*, 24(4), ss. 217–227. doi: 10.1055/s-2006-948551.

Schanté, C. E. vd. (2011) “Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications”, *Carbohydrate Polymers*, 85(3), ss. 469–489. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.03.019.

Selyanin, M. vd. (2015) “The History of Hyaluronic Acid Discovery, Foundational Reserch and Initial Use”, *medien.ubitweb.de*. Available at: https://sci-hub.ren/https://medien.ubitweb.de/pdfzentrale/978/111/863/Leseprobe_1_9781118633793.pdf (Erişim: 20 Eylül 2021).

Séon-Lutz, M. vd. (2018) “Electrospinning in water and in situ crosslinking of hyaluronic acid / cyclodextrin nanofibers: Towards wound dressing with controlled drug release”. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.11.085.

Šmejkalová, D. vd. (2017) “Hyaluronan polymeric micelles for topical drug delivery”, *Carbohydrate Polymers*, 156, ss. 86–96. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2016.09.013.

Taylor, G. (1964) “Disintegration of water drops in an electric field”, *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 280(1382), ss. 383–397. doi: 10.1098/RSPA.1964.0151.

Tiwari, S. ve Bahadur, P. (2019) “Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications”, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., ss. 556–571. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.049.

Volpi, N., Schiller, J. ve Soltes, R. S. and L. (2009) “Role, Metabolism, Chemical Modifications and Applications of Hyaluronan”, *Current Medicinal Chemistry*, ss. 1718–1745. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/092986709788186138>.

Weigel, P. H. (2015) “Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior”, *International Journal of Cell Biology*. Editör H. B. Osborne, 2015, s. 367579. doi: 10.1155/2015/367579.

Weissmann, B. ve Meyer, K. (1954) “The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical Cord1, 2”, *Journal of the american chemical society*, 76(7), ss. 1753–1757.

Xue, F. vd. (2021) “Hyaluronic acid nanofibers crosslinked with a nontoxic reagent”, *Carbohydrate Polymers*, 259, s. 117757. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2021.117757.

Xue, J. vd. (2019) “Electrospinning and Electrospun Nano fi bers : Methods , Materials , and Applications”. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00593.

Zhu, Z.-N., Zhu, X.-H. ve Guo, X. (2017) “Coastal tomographic mapping of nonlinear tidal currents and residual currents”, *Continental Shelf Research*, 143, ss. 219–227. doi: <https://doi.org/10.1016/j.csr.2016.06.014>.

ÖZGEÇMİŞ

MERVE KANARGI

Eğitim Bilgileri

2020-2023 Yüksek Lisans

Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği

Tez Konusu: Biyomedikal Uygulamalar için Modifiye Hyaluronan Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu

2010-2016 Lisans

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Mühendisliği

Lisans Tezi: İlaç taşınımı için biyopolimerler

İş Deneyimleri

08. 2022- halen Yiğitoğlu Kimya A.Ş

Hotmelt Yapıştırıcılar -Satış Uzmanı

09. 2017- 02.2021 Er-sa Kimyevi Maddeler Ltd. Şti.

Endüstriyel Yapıştırıcılar – Teknik Satış Sorumlusu (Henkel)