

**PROTEİN İLAÇLARIN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN
POLİ(2-HİDROKSİETİL METAKRİLAT)-BAZLI
SÜPERGÖZENEKLİ HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF
POLY(2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE)-BASED
SUPERPOROUS HYDROGELS FOR CONTROLLED
RELEASE OF PROTEIN DRUGS**

PINAR TÜRKYILMAZ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2012

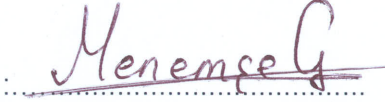
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

Başkan


.....
Prof. Dr. Mehlika PULAT


Üye (Danışman)


.....
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye


.....
Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye


.....
Prof. Dr. Selma MUTLU

Üye

.....
Doç. Dr. Dilek İMREN

ONAY



Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

PROTEİN İLAÇLARIN KONTROLLÜ SALIMI İÇİN POLİ(2-HİDROKSİETİL METAKRİLAT)-BAZLI SÜPERGÖZENEKLİ HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Pınar Türkyılmaz

ÖZ

Sunulan çalışmada, protein yapıdaki ilaçların oral kullanımına yönelik kontrollü salım sistemi geliştirmek amacıyla, poli(hidroksietil metakrilat), p(HEMA)-bazlı süpergözenekli hidrojeller (SPH), gaz köpükleştirici ajan sodyum bikarbonat varlığında serbest radikalik polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. Plazma proteinleri, sığır serum albümin (BSA) ve fibrinojen (FG) model ilaçlar olarak seçilmiştir. Hidrojellere ait karakterizasyon ve in vitro salım çalışmaları tamamlandıktan sonra, elde edilen sonuçlar protein ilaçların oral salımına yönelik hidrojel sistemin seçimi açısından değerlendirilmiştir.

Çalışma kapsamında, N,N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanan p(HEMA) SPH'lerin mekanik dayanım, gözeneklilik ve biyoadezyon özelliklerinin geliştirilmesi için yapıya jelatin, polietilen glikol (PEG 600) ve akrilik asit katılarak 6 farklı SPH sentezi gerçekleştirilmiş ve optimum sentez koşulları belirlenmiştir. Bu hidrojeller; p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, p(HEMA)-PEG SPH, p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leridir. Hazırlanan hidrojeller, boyutları 10-600 µm arasında değişen gözeneklere sahiptir.

Hidrojellerin yapay mide ortamı (SGF) (pH:2) ve yapay bağırsak ortamı (SIF) (pH:7) içerisinde yürütülen şişme çalışmaları, SPH'lerin kapiler etkiye bağlı olarak hızlı şekilde şişerek, kısa sürede (≈ 60 sn.) dengeye ulaştığını göstermiştir. Akrilik asit içeren örneklerin pH'ya bağımlı şişme davranışı gösterdiği belirlenmiş, p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerin en yüksek denge şişme oranına ($Q = 36.13 \pm 0.063$) sahip oldukları görülmüştür. Jelatin varlığında hazırlanan iç içe geçmiş ağ yapılar (IPN), hidrojellerin mekanik dayanımını iyileştirmiştir. En yüksek mekanik dayanıma sahip olan yapılar ise, p(HEMA)-PEG ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerdir ve elastik modül değerleri sırasıyla 0.030 ± 0.009 ve 0.035 ± 0.001 N/mm² olarak belirlenmiştir.

İki model protein, BSA ve FG; oda sıcaklığında ($\sim 25^\circ\text{C}$), çözelti emdirme (embedding) yöntemi ile geleneksel hidrojellere göre çok kısa sürede (<30 dk.) ve oldukça yüksek miktarlarda (BSA için 30-370 mg BSA/g kuru jel FG için 37-340 mg FG/g kuru jel) hidrojel disklere (12 mm çap and 4 mm kalınlık) yüklenmiştir. Hidrojellerden BSA ve FG salımı, yapay bağırsak ortamında (pH:7), 37°C 'de ve sabit derişim farkı sağlamak üzere salım ortamının sürekli yenilendiği (perfect sink conditions) koşullarda yürütülmüştür. BSA ve FG'in p(HEMA)-bazlı SPH'lerden kümülatif salım profilleri yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile 280nm'de yapılan ölçümler sonucu belirlenmiştir. İn vitro salım çalışmaları 24 saat boyunca sürdürülmüş ve proteinlerin SPH ve SPH-IPN'lerden salımının ilk 30 dk.lık ani salım (burst release) sonrası, BSA için 3 saat, FG için ise 6 saat devam ederek tamamlandığı belirlenmiştir. Her iki proteine ait % salım değerlerinin 80-100 arasında değişmesi, proteinlerin polimerik matris ile tersinmez etkileşime girmediklerini ifade etmektedir. Protein yüklü hidrojeller ile in vitro salım çalışmaları

öncesi ve sonrasında yürütölen FTIR-ATR analizleri de polimer matris ile proteinler arasında kimyasal bir etkileşim olmadığını desteklemiştir.

Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin yüksek şişme kapasitesi, pH-duyarlı özelliği ve biyoadeziv karakterine bağlı olarak, özellikle yüksek molekül ağırlığına sahip proteinlerin oral kullanımına yönelik uygun taşıyıcılar olduklarını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Süpergözenekli hidrojel, poli(2-hidroksietil metakrilat), gaz köpükleştirme, proteinlerin oral yollu salımı, BSA, FG.

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

DEVELOPMENT OF POLY(2-HYDROXYETHYL METHACRYLATE) BASED SUPERPOROUS HYDROGELS FOR CONTROLLED RELEASE OF PROTEIN DRUGS

Pınar Türkyılmaz

ABSTRACT

In the presented study, for peroral delivery of proteins novel poly(2-hydroxyethyl methacrylate) p(HEMA)-based superporous hydrogels (SPHs) were synthesized by free radical polymerization in the presence of blowing agent, sodium bicarbonate. Plasma proteins, bovine serum albumin (BSA) and fibrinogen (FG), were chosen as model drugs. After characterization studies and in vitro release studies, results were evaluated for the selection of suitable hydrogel system for oral delivery of protein drugs.

In order to enhance mechanical strength, porosity and bioadhesive properties of p(HEMA) SPH's that were crosslinked in the presence of N,N'-methylenebisacrylamide, gelatin, polyethylene glycol (PEG 600) and acrylic acid were added to the structure and synthesis parameters were optimized. Six different type hydrogels were prepared within the study. These hydrogels are; p(HEMA) SPH, p(HEMA)-gelatin SPH, p(HEMA)-gelatin SPH-IPN, p(HEMA)-PEG SPH, p(HEMA-co-AA) SPH and p(HEMA-co-AA)-PEG SPHs. All these hydrogels have pores ranging between 10-600 μm .

Swelling studies that were carried out in simulated gastric fluid (SGF) (pH:2) and simulated intestinal fluid (SIF) (pH:7) showed that SPHs reached equilibrium in very short time (≈ 60 sn) with rapid swelling due to the capillary effect. It is observed that SPHs that contain acrylic acid, showed pH dependent swelling and p(HEMA-co-AA)-PEG SPHs have the highest equilibrium swelling ratio ($Q = 36.13 \pm 0.063$). Interpenetrating structures (IPNs) that were prepared in the presence of gelatin, enhanced mechanical strength of hydrogels. p(HEMA)-PEG and p(HEMA-co-AA)-PEG SPHs showed great improvement in mechanical properties and their elastic modulus values were 0.030 ± 0.009 and 0.035 ± 0.001 N/mm², respectively.

Two model proteins, BSA and FG, were loaded to the hydrogel discs (12 mm diameter and 4 mm thickness) by embedding method in room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) in very short time (< 30 min) with very high capacities (varying between 30-370 mg BSA/g dry gel for BSA and 37-340 mg FG/g dry gel for FG) as a result of high swelling capacity of gels. The release of BSA and FG from hydrogels were performed in simulated intestinal fluid (37°C , pH:7) at perfect sink conditions. Cumulative release of BSA and FG from p(HEMA)-based SPHs were established with high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection at 280 nm. The in vitro release studies continued for 24 h and release profiles from SPHs and SPH-IPNs were characterized with initial burst of proteins during the first 30 min followed by a completed release in 3 h for BSA and 6 h for FG. Release amounts of both proteins in %, varied between 80 and 100 and these results implied that no irreversible interaction occurred between polymer and proteins. FTIR-ATR studies performed with loaded hydrogels before and after release

studies, supported that no chemical interaction occurred between polymer matrix and proteins.

The result of the studies indicated that high swelling capacity, pH-sensitivity and bioadhesive characteristic makes p(HEMA-co-AA)-PEG SPH suitable candidate systems especially for peroral delivery of high molecular weight protein drugs.

Keywords: Superporous hydrogel, poly(2-hydroxyethyl methacrylate), gas foaming, peroral delivery of proteins, BSA, FG.

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

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca değerli bilgileriyle her zaman yönlendirici, öğretici ve eğitici olan; lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca hoşgörüsü, sabrı ve heyecanı ile bana kazandırdığı değerler için her zaman minnettar olacağım sevgili ve çok değerli hocam Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na,

Umutlarımı, heyecanlarımı, sevinçlerimi, üzüntülerimi kısacası tüm hayatımı paylaştığım; bugüne gelmemde emeği çok büyük olan, çok sevdiğim, her şeyim annem ve babama,

Çalışmanın yürütülmesi için gerekli maddi desteği 111M337 numaralı proje kapsamında sağlayan TÜBİTAK, Mühendislik Araştırma Grubu'na,

Çalışmalarımın yürütülmesinde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak, değerli emekleri, hoşgörülerini ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan çok sevgili arkadaşlarım Ar. Gör. Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ'e ve Ar. Gör. Damla ÇETİN ALTINDAL'a,

Tez çalışmam süresince, bilgi ve deneyimleri ile bana her zaman yardımcı olan, danışmaktan çekinmediğim sevgili çalışma arkadaşlarım Tuğrul Tolga DEMİRTAŞ'a, Dr. Rahime Seda TIĞLI'ya, Anıl Sera ÇAKMAK'a ve Ar. Gör. Soner ÇAKMAK'a,

Aynı ortamda çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım, Ekin Özge TUNÇAY'a, Murat ŞİMŞEK'e, Müşra ZEREN'e, Ar. Gör. Merve ÇAPKIN YURTSEVER'e, Suna SOP'a, Müge Dağlı DURUKAN'a, Ezgi ŞENGÜL'e, Gökçe KAYNAK'a, Gülseren IRMAK'a ve Nazife ÜLKER'e,

En içten teşekkürlerimi ve sevgimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. TEMEL BİLGİLER	4
2.1. Hidrojeller.....	4
2.1.1. Süpergözenekli hidrojeller	5
2.1.2. Süpergözenekli hidrojellerin sentez yöntemleri	6
2.1.3. SPH'lerin sentezini etkileyen faktörler.....	7
2.2. Süpergözenekli Hidrojellerin Temel Özellikleri.....	9
2.3. Yeni Nesil Süpergözenekli Hidrojeller	11
2.3.1. Birinci nesil SPH'ler: Geleneksel SPH'ler	12
2.3.2. İkinci nesil SPH'ler: SPH kompozitler	12
2.3.3. Üçüncü nesil SPH'ler: SPH hibridler	13
2.4. Süpergözenekli Hidrojellerin Kullanım Alanları	17
2.5. Protein İlaçların Kontrollü Salımı.....	19
2.5.1. Hidrojel yapıdaki protein ilaç salım sistemleri.....	21
2.5.1.1. Protein salımında kullanılan hidrojellerin yapısı.....	22
2.5.1.2. Hidrojellere protein yükleme metotları.....	24
2.5.1.3. Hidrojellerden protein salımının mekanizması.....	26
2.5.2. Süpergözenekli hidrojellerin oral protein/peptid ilaç salımındaki kullanımları.....	27
2.6. Şişme ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi	31
2.6.1. Şişme kinetiği	31
2.6.2. Salım kinetiği	34
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.2. p(HEMA)-bazlı SPH'lerin Üretimi	38
3.2.1. p(HEMA) SPH'lerin üretimi	40
3.2.2. p(HEMA)-jelatin SPH'lerin üretimi.....	40

3.2.3. p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin üretimi	41
3.2.4. p(HEMA)-PEG SPH'lerin üretimi	41
3.2.5. p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin üretimi	42
3.2.6. p(HEMA-ko-AA)-PEG 600 SPH'lerin üretimi	42
3.3.p(HEMA)-Bazlı Süpergözenekli Hidrojellerin Yapısal Karakterizasyonu	42
3.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	42
3.3.2. FTIR-ATR analizi	43
3.3.3. Termal analiz	43
3.3.4. Şişme deneyleri	43
3.3.5. Mekanik dayanım testi	44
3.3.6. Yoğunluk analizi	44
3.4. In vitro Protein Salım Çalışmaları	45
3.4.1. Jellere protein yüklenmesi	45
3.4.2. Salım çalışmaları	45
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI.....	48
4.1.p(HEMA)-Bazlı SPH'lerin Üretimi.....	48
4.1.1. p(HEMA) SPH'lerin üretimi	53
4.1.1.1.Çapraz bağlayıcı (Bis) miktarının ve NaHCO ₃ eklenme zamanının etkisi	53
4.1.2. p(HEMA)-jelatin yarı-IPN SPH'lerin üretimi.....	54
4.1.2.1. Çapraz bağlayıcı (Bis) miktarının etkisi	55
4.1.3. p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin üretimi.....	55
4.1.3.1. Jelatin miktarının etkisi	56
4.1.4. p(HEMA)-PEG SPH'lerin üretimi	57
4.1.4.1. PEG miktarının etkisi.....	57
4.1.5. p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin üretimi.....	58
4.1.5.1. Köpükleştirici ajan sodyum bikarbonat (NaHCO ₃) miktarının etkisi.....	59
4.1.6. p(HEMA-ko-AA)-PEG600 SPH'lerin üretimi	60
4.2.Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları	62
4.2.1. FTIR-ATR analizi	62
4.2.2. Termal analiz	64
4.2.3. Şişme çalışmaları	69
4.2.3.1. Şişme kinetiğinin incelenmesi.....	69
4.2.3.2. Şişme kinetiğinin matematiksel analizi	74
4.2.4. Mekanik dayanım analiz sonuçları.....	79
4.2.5. Yoğunluk analizi	81
4.2.Hidrojellerden Protein Salımı ile İlgili Sonuçlar ve Tartışılması	82

4.3.1. Hidrojellere protein yüklenmesi	83
4.3.1.1. Protein ilaçların karakterizasyonu	85
4.3.2. Protein salım kinetiği ile ilgili sonuçlar.....	89
4.3.2.1. BSA salım kinetiği ile ilgili sonuçlar.....	90
4.3.2.2. Fibrinojen salım kinetiği ile ilgili sonuçlar	93
4.3.3. Protein salım kinetiğinin matematiksel analizi	97
4.3.4. Protein yüklü ve salım sonrası hidrojellerin FTIR-ATR ile analizi.....	98
4.3.4.1. BSA yüklü ve salım sonrası hidrojellere ait FTIR-ATR analizleri.....	98
4.3.4.2. FG yüklü ve salım sonrası hidrojellere ait FTIR-ATR analizleri.....	99
4.3.5. Yükleme ve salım koşullarının proteinlerin stabilitesi üzerindeki etkisi.....	101
5. GENEL SONUÇLAR	102
KAYNAKLAR DİZİNİ	105
EKLER	115
EK-1.....	115
EK-2.....	117
EK-3.....	120
EK-4.....	123
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Süpergözenekli hidrojellerin sentezinde köpüklenme prosesi ve harmonize jelleşme (Chen et al., 1999).....	8
Şekil 2.2. SPH'lerin hızlı (~30 saniye) ve yüksek şişme oranları.	10
Şekil 2.3. SPH'lerin çevresel değişikliklere (pH ve sıcaklık) karşı şişme ve büzüşme davranışı (Peppas, 1997).....	11
Şekil 2.4. Farklı nesil SPH'lerin yapısal, şişme ve mekanik özellikleri.	12
Şekil 2.5. IPN yapının şematik gösterimi (Lin et al., 2011).	15
Şekil 2.6. Temel IPN sentez metotları (Sperling et al., 1994).	16
Şekil 2.7. Protein salın hidrojel sistemler (a) Sulu durumda protein içeren rezervuar sistem (b) Protein ve hidrofilik polimerin toz karışımının sıkıştırılmasıyla oluşturulan susuz salım cihazı (matris sistem) (Fu and Kao, 2010).	22
Şekil 2.8. Hidrojel-bazlı ilaç salım sisteminin hazırlanma basamaklarının şematik gösterimi (Gupta et al., 2002).....	25
Şekil 2.9. SPHC-SPH bazlı yeni oral peptid ilaç salım sisteminin çalışma mekanizmasının şematik gösterimi (a) Taşıyıcı gövde içerisine yerleştirilen çekirdek formülasyonu (b) Taşıyıcı gövde üzerine yerleştirilen çekirdek formülasyonu (Dorkoosh et al., 2001).	29
Şekil 2.10. Normal (a) ve zaman-kontrollü (b) ilaç salım profillerinin şematik gösterimi (Dorkoosh et al., 2001).	30
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bazı maddelerin kimyasal yapıları.	38
Şekil 3.2. p(HEMA) SPH'ine ait sentez basamakları: Monomer karışımı (A) hazırlandıktan sonra polimerizasyonun başlaması ve karbondioksit baloncukları oluşturmak üzere NaHCO ₃ eklenir (B). Köpük kararlı olduğunda polimerizasyon tamamlanır (C). Uygun işlem basamaklarından sonra (Bölüm 3.2.1) disk şeklindeki, süpergözenekli hidrojel elde edilir (D).....	39
Şekil 3.3. Proteinlere ait HPLC kromatogramları (280 nm); (a) BSA'e ait kromatogram, (b) FG'e ait kromatogram.	46
Şekil 3.4. Proteinlere ait kalibrasyon grafikleri (0.01-1 mg/mL); (a) BSA'e ait kalibrasyon grafiği, (b) FG'e ait kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil 4.1. p(HEMA) polimerine ait serbest radikal polimerizasyon mekanizması (a,b,c,d).	52

Şekil 4.2. p(HEMA) SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 50 µL Bis içeren (b) 100 µL Bis içeren (NaHCO ₃ 20 sn. içerisinde eklendi), (c) 100 µL Bis içeren örnekler (NaHCO ₃ 80.s'de eklendi, detay görüntü büyütme oranı ×1000).	54
Şekil 4.3. p(HEMA)-jelatin SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 250 µL, (b) 450 µL (detay görüntü büyütme oranı ×1000), (c) 750 µL jelatin içeren örnekler. 55	55
Şekil 4.4. p(HEMA)-jelatin SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 50 µL, (b) 100 µL, (c) 200 µL Bis içeren örnekler.....	55
Şekil 4.6. Tam-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'e ait SEM görüntüsü (x100) (750 µL jelatin, detaya ait büyütme ×1000).....	56
Şekil 4.5. Jelatinin GP varlığında çapraz bağlanma mekanizması (Moura et al., 2011).	56
Şekil 4.7. p(HEMA)-PEG SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 500 µL, (b) 750 µL (detaya ait büyütme ×1000), PEG varlığında sentezlenen örnekler.....	57
Şekil 4.9. p(HEMA-ko-AA) SPH'ine ait SEM görüntüsü (x100), (120 mg sodyum bikarbonat, detaya ait büyütme ×1000).....	59
Şekil 4.8. p(HEMA-ko-AA) kopolimerine ait serbest radikal polimerizasyon mekanizması (Şekil 4.1'in a ve b basamaklarının devamı niteliğinde, yukarıdaki c ve d basamakları ifade edilmiştir).	59
Şekil 4.10. p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'ine ait SEM görüntüsü (x100), (160 mg sodyum bikarbonat) (detaya ait büyütme ×1000).....	60
Şekil 4.11. Süpergözenekli hidrojellere ait FTIR spektrumları: (a) p(HEMA) SPH, (b) p(HEMA)-jelatin SPH, (c) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (d) p(HEMA)-PEG SPH, (e) p(HEMA-ko-AA) SPH, (f) p(HEMA-ko-AA) SPH.....	63
Şekil 4.12. p(HEMA)-bazlı süpergözenekli hidrojellere ait termogramlar; (a) p(HEMA) SPH, (b) p(HEMA)-jelatin SPH, (c) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (d) p(HEMA)-PEG SPH, (e) p(HEMA-ko-AA) SPH, (f) p(HEMA-ko-AA) SPH.....	67
Şekil 4.13. p(HEMA)-bazlı doku iskelelerinin genel görüntüsü: (a) p(HEMA) SPH, (b) p(HEMA)-jelatin SPH, (c) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (d) p(HEMA)-PEG SPH, (e) p(HEMA-ko-AA) SPH, (f) p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH; kuru halde (en altta), SGF içerisinde şişme sonrası (ortada), SIF içerisinde şişme sonrası (en üstte)...	69
Şekil 4.14. Hidrojellerin yapay mide ortamı (pH:2) içerisinde şişme kinetiği grafiği.	70
Şekil 4.15. Hidrojellerin yapay bağırsak ortamı (pH:7) içerisinde şişme kinetiği grafikleri; (a) p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH, (b) p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH....	71
Şekil 4.16. SPH ve SPH-IPN'lerin yapay mide ortamı (pH:2) içerisinde kesirsel şişme (F)-zaman eğrileri.....	74

Şekil 4.17. SPH ve SPH-IPN'lerin yapay bağırsak ortamı (pH:7) içerisinde kesirsel şişme (F)-zaman eğrileri; (a) p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH, (b) p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH.	75
Şekil 4.18. Proteinlere ait FTIR-ATR spektrumu; (a) BSA, (b) FG.....	89
Şekil 4.19. Hidrojellerden BSA salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg BSA salımı (b) % BSA salımı.	90
Şekil 4.20. p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin BSA salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg BSA salımı, (b) % BSA salımı .	91
Şekil 4.21. p(HEMA) SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerinin FG salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg BSA salımı, (b) % BSA salımı.....	94
Şekil 4.22. p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin FG salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg FG salımı, (b) % FG salımı	95
Şekil 4.23. (a) p(HEMA) SPH, (b) BSA yüklü p(HEMA) SPH ve (c) salım sonrası p(HEMA) SPH'e ait FTIR spektrumları.	99
Şekil 4.24. (a) p(HEMA) SPH, (b) FG yüklü p(HEMA) SPH ve (c) salım sonrası p(HEMA) SPH'e ait FTIR spektrumları.	100
Şekil 4.25. BSA (a) ve FG'e (b) ait 24 saatlik HPLC kromatogramları.....	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Gözenekli hidrojellerin gözenek çap aralıkları.	6
Çizelge 3.1. Yapay mide ortamı ve yapay bağırsak ortamı bileşimleri.	44
Çizelge 4.1. Süpergözenekli hidrojellerin sentez reçeteleri.	61
Çizelge 4.2. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin gözenek boyutları ve gözenek boyut aralıkları.	62
Çizelge 4.3. Hidrojellere ait IR spektrum verileri ve değerlendirilmesi.	64
Çizelge 4.4. Termal analiz sonuçları.	68
Çizelge 4.5. Hidrojellerin farklı pH değerlerindeki denge şişme oranları (Q)	72
Çizelge 4.6. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'ler için n, k ve R ² değerleri	77
Çizelge 4.7. SPH ve SPH-IPN örneklerinde suyun farklı pH'lardaki difüzyon katsayıları (Disk yarıçapı= 6mm).	78
Çizelge 4.8. Hidrojel disklerin denge şişmesine ulaşma süreleri.	79
Çizelge 4.9. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin elastik modül değerleri.	80
Çizelge 4.10. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin yoğunluk değerleri.	81
Çizelge 4.11. Hidrojellerin SIF (pH:7) ve PBS (pH:7.4) içerisinde şişme oranlarının karşılaştırılması.	84
Çizelge 4.12. Hidrojellerin kuru kütleleri başına yüklenen BSA miktarları.	84
Çizelge 4.13. Hidrojellerin kuru kütleleri başına yüklenen FG miktarları.	85
Çizelge 4.14. Çalışmada kullanılan model proteinlerin özellikleri.	87
Çizelge 4.15. Salım kinetiğinin matematiksel analizine yönelik toplu sonuçları	97

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

M_t	Polimerden t anında absorplanan veya desorplanan kütle
M_∞	Polimerden dengede ($t=\infty$) absorplanan veya desorplanan kütle
k	Ampirik hız sabiti
t	Zaman
n	İlaç salım mekanizmasını belirten transport üsteli
τ	Hidrojin karakteristik şişme süresi (s)
D	Difüzyon katsayısı (m^2/s)
D_0	Proteinin sudaki difüzyon katsayısı (cm^2/s)
r	Disk halindeki kuru jelin yarıçapı (mm)
L	Hidrojin karakteristik uzunluğu (m)
r_p	Ortalama gözenek çapı (mm)
R^2	Regresyon katsayısı
V_d	Hidrojin hacmi (cm^3)
W_d	Hidrojin kuru ağırlığı (g)

KISALTMALAR

AA	Akrilik asit
APS	Amonyum Persülfat
Bis	N,N'-metilenbisakrilamid
BSA	Sığır Serum Albümin
FTIR-ATR	Fourier Transform Infrared- Attenuated Total Reflection
GI	Gastro-Intestinal (Mide-Bağırsak)
GP	Gliserol Fosfat Disodyum Hidrat Tuzu
HEMA	2-Hidroksietil Metakrilat
HPLC	High Performance (Pressure) Liquid Chromatography
IPN	Interpenetrating Network (İç İçe Geçmiş Ağ Yapı)
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit
NHMAAm	N-hidroksimetil akrilamid
NIPAAm	N-İzopropil Akrilamid
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PEG	Poliyeten Glikol
PF 127	Pluronik F127
p(HEMA)	Poli(2-Hidroksietil Metakrilat)
Q	Swelling Ratio (Şişme Oranı)
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
SGF	Simulated Gastric Medium (Yapay Mide Ortamı)
SIF	Simulated Intestinal Medium (Yapay Bağırsak Ortamı)
SPH	Süpergözenekli Hidrojel
SPH IPN	Süpergözenekli IPN (iç içe geçmiş ağ yapı) Hidrojel

TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamin
TGA	Thermogravimetric Analyzer (Termogravimertik Analizör)
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI

Son yıllarda biyoteknolojideki hızlı gelişmeler sonucu birçok hastalığın tedavisinde kullanılan polipeptid ve protein gibi hidrofilik ve makromoleküler ilaçların sayısındaki hızlı artış, bu ilaçların etkin dağıtımını sağlayacak sistemlerin geliştirilmesi gerekliliğini de beraberinde getirmiştir (Dorkoosh et al., 2002b).

Protein bazlı ilaçlar hemofili, diyabet, kanser, kistik fibröz, sedef hastalığı ve kalıtsal hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Peptid ve protein yapıdaki ilaçların enjeksiyon yoluyla uygulandığı klasik tedavi yönteminde, ilacın plazma konsantrasyon değerinin sırasıyla maksimum ve minimum yönde ani değişimi, tutarlı ve yararlı bir tedavinin sağlanabilmesi için yeterli olmamaktadır. Etkin maddenin optimum plazma konsantrasyon değeri, sık aralıklarla yüksek dozda ilaç alımıyla sağlanabilmektedir. Bu nedenle protein ilaçlar için en uygun yöntem; verilecek doz sayısını azaltan ve ilacın kararlılığını koruyarak istenen süre boyunca salımını sağlayabilecek bir kontrollü salım sistemi ile uygulanmasıdır.

Protein yapıdaki ilaçların kullanımında klinik açıdan en uygun yöntem oral yolla kontrollü salım olsa da, mide-bağırsak ortamının asidik özelliği ve içerdiği proteolitik enzimler, protein ilaçların hızlı bir şekilde bozunarak aktivitelerini kaybetmesine neden olmaktadır. Ayrıca, hidrofilik yapıdaki protein moleküllerinin biyoyararlanımı, bağırsak duvarının düşük membran geçirgenliği nedeniyle yeterli düzeyde olmamaktadır. Bu durum protein ilaçların, oral yolla uygulanmasını büyük ölçüde kısıtlamaktadır. (Manning et al., 1989; İmren et al., 2010). Tedavi-edici dozlarda tahmin edilebilir ve tekrarlanabilir absorpsiyon elde edebilmek için ilaçların bölgeye özgü salımı; istenilen tedavi edici etkinin sağlanması için ise zayıf biyoyararlanımın geliştirilmesi ile mukozadan geçişin ve metabolik engellerin aşılması, etkin ilaç dağıtımını sağlayacak sistem tasarımında önemli noktalardır (Bai et al., 1995; Fix, 1996). Bölgeye-özümlü peptid ilaç dağıtımı için; manyetik sistemler, genişleyebilen sistemler, mukoadeziv sistemler ve yakın zamanda geliştirilen bağırsak duvarına mekaniksel olarak tutunabilen sistemler gibi çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır (Dorkoosh et al., 2001).

Yapılan son çalışmalarda genellikle polimerlerin kullanıldığı kontrollü etkin madde salım sistemleri geliştirilmiştir. Polimerler arasında hidrojeller, biyoyumlu, kolay formülasyon, çapraz bağlı çözünmez ağ yapıları sonucu yüksek oranda çözücü

absorplayabilme, etkili ilaç yükleme ve kontrollü kütle aktarımı gibi özellikleriyle, protein yapıdaki ilaçların kontrollü salımı için etkin ve uygun bir sınıf oluşturmaktadır (Peppas et al., 2000; Jeong et al., 1999). Hidrojeller, geliştirilebilir mekanik özellikleri, çevredeki değişkenlere (sıcaklık, pH, elektrik vb.) duyarlı yapıları ve biyoadeziv özellikleri ile ilaçların etki yerine hedeflendirilmesine (bölgeye özgü salım) en iyi yanıt verecek sistemlerdir. Poliakrilik asit ve türevleri, kollajen, aljinat ve kitosan gibi biyoadeziv özellik taşıyan hidrojeller, istenilen bölgede lokalize olmakta ve böylece bölgesel etkin madde absorpsiyonunu iyileştirebilmektedirler. Ancak gözeneksiz bu hidrojeller etkin ilaç salımında kullanımlarını kısıtlayan, yavaş şişme ve düşük protein yükleme kapasitesi gibi dezavantajlara sahiptirler (Yin et al., 2007).

Son yıllarda, yeni nesil hidrojeller olan süpergözenekli hidrojel (SPH) ve süpergözenekli hidrojel kompozit (SPHC) polimerlerden hazırlanan ve oral yolla peptid ve proteinlerin dağıtımının artırılmasını hedefleyen ilaç dağıtım sistemleri geliştirilmiştir. Dorkoosh ve grubu tarafından (2002) geliştirilen akrilamid-bazlı peptid yüklü süpergözenekli hidrojeller, bağırsağa ulaştığı zaman, yapıda hapsedilen peptid ilacının salımına kadar olan süreçte, yüksek gözeneklilik oranına bağlı olarak bağırsaktaki luminal akışkanları emmekte ve hızlı bir şekilde şişmektedir. Böylelikle sistem belirli bir zaman periyodu boyunca bağırsak epiteline mekanik olarak tutunabilmekte ve mekanik basınç ile hücreler arası sıkı bağlantı bölgelerini açmaktadır. Dorkoosh ve grubu tarafından (2002) yapılan çalışmada, mukoadezyondan farklı olarak, bağırsak duvarına mekanik olarak tutunabilen ve tutunma sonrası ani salım yapabilen sistemler geliştirilmiş ve bu sistemlerin birkaç protein temelli ilacın (buserelin, octreotid, insulin ve desmopressin) intestinal emilimini arttırdığı yapılan in vitro ve in-vivo çalışmalarla gösterilmiştir (Dorkoosh et al., 2001; 2002b).

Ancak süpergözenekli hidrojeller ve süpergözenekli kompozit hidrojeller stres altında oldukça kırılgandır, bu nedenle protein ilaçların oral yollu salımında taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmeleri için mekanik özellikleri geliştirilmelidir. Süpergözenekli hidrojel, ikinci bir polimerin yapıya dahil edilmesi ile iç içe geçmiş ağ yapıya dönüştürüldüğünde, polimerin mekanik dayanımı ve elastik özellikleri

arttırılabildiğinden, iç içe geçmiş ağ yapıdaki süpergözenekli hidrojel temelli taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Qui and Park, 2003;Yin et al., 2007).

Yukarıdaki literatür çalışmaları ışığında sunulan tez kapsamındaki çalışmanın amacı, protein ilaçların oral yollu kullanımına yönelik taşıyıcı sistem özelliklerine sahip p(HEMA)-bazlı süpergözenekli hidrojellerin geliştirilmesidir. Literatürde mevcut süpergözenekli taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında, daha çok akrilat-bazlı (metil metakrilat, metakrilik asit, akrilik asit) polimerler tercih edilmiştir. (Dorkoosh et al., 2000; Yin et al., 2007). Mevcut çalışma kapsamında hazırlanacak taşıma sistemleri için, literatürdeki çalışmalardan farklı olarak yüksek biyouyumluluğu, hidrofiliği, yumuşaklığı ve geçirgen olması gibi özelliklerinden dolayı poli (2-hidroksietil metakrilat) p(HEMA) tercih edilmiştir. p(HEMA)-bazlı taşıma sistemlerinin sentezi, gaz köpükleştirme prosesi ile eş zamanlı yürütülen serbest radikalik polimerizasyon ile gerçekleştirilmiştir. Gaz köpükleştirme yöntemi uygulama açısından basit bir yöntem olup, süpergözenekli hidrojellerin hızlı bir şekilde hazırlanmasına olanak sağlamaktadır.

Çalışma kapsamında hazırlanan p(HEMA)-bazlı süpergözenekli hidrojellerin mekanik dayanımlarının arttırılması, gözeneklilik oranının arttırılması ve biyoadeziv özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla, yapıya jelatin, polietilen glikol (PEG 600) ve akrilik asit ilave edilmiştir. Sentez için optimum koşullar belirlenerek 6 farklı SPH sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu SPH'ler; p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, p(HEMA)-PEG SPH, p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leridir. Hazırlanan taşıma sistemlerinin kimyasal ve yapısal özellikleri yapılan karakterizasyon çalışmaları ile belirlenmiştir. Ayrıca, bu hidrojellerin model proteinler olarak seçilen plazma proteinlerinin (sığır serum albumin (BSA) ve fibrinojen (FG)) taşınımı ve kontrollü salımı için kullanılabilirliklerini belirlemek amacıyla in vitro salım çalışmaları yürütülmüştür. Karakterizasyon ve in vitro salım çalışmalarının sonuçları incelenerek, yapısal özellikleri ve salım karakteristiği bakımından en uygun sistem tercihi yapılmıştır.

2. TEMEL BİLGİLER

Bu bölümde sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgisi beş ana başlık altında sunulmuştur. İlk olarak hidrojeller hakkında geniş bilgi verilmiş, sonrasında süpergözenekli hidrojeller tanımlanmış; sentez yöntemleri, sentezi etkileyen faktörler ve temel özelliklerine değinilmiştir. İkinci bölümde yeni nesil süpergözenekli hidrojeller hakkında detaylı bilgi verilmiştir. Takip eden bölümde süper gözenekli hidrojellerin kullanım alanlarına değinilmiştir. Dördüncü bölümde protein ilaçların kontrollü salımı açıklanmış; hidrojel yapıdaki protein ilaç salım sistemleri ve süpergözenekli hidrojellerin oral protein/peptid ilaç salımındaki kullanımları hakkında detaylı bilgi verilmiştir. Son bölümde ise, şişme ve salım kinetiğinin matematiksel analizi hakkında genel bilgiye yer verilmiştir.

2.1. Hidrojeller

Hidrojeller, hidrofilik polimer zincirlerinin kimyasal veya fiziksel olarak çapraz bağlanması ile oluşan üç boyutlu ağı yapılarıdır (Park, 2004). Ana zincirler arasındaki hidrojen bağları veya van der Waals etkileşimleri gibi bağlanmaların varlığı hidrojelleri çözünmez hale getirir (Gümüşderelioğlu, 2002). Bir hidrojinin suyu seven (hidrofilik) karakteri, ana zincir ya da yan dallarında hidroksil, karboksil, karbonil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğine sahip hidrofilik grupların varlığı sonucudur (Üzüm, 2008). Böylelikle bir hidrojel kendi ağırlığının en az %10'u kadar suyu bünyesine alabilir. Su içeriği toplam ağırlığın %95'ini aşarsa hidrojel " süperabsorbent " (SAP) olarak adlandırılır (Park, 2004).

Hidrojeller, biyotıp uygulamaları açısından sahip oldukları üstün özellikler nedeniyle son 30 yıldır ilgi odağı olmuşlardır (Peppas and Langer, 1994). Hidrojeller diğer sentetik biyomalzemelere nazaran canlı dokulara daha fazla benzemektedirler. Bu durum hidrojellerin yüksek su tutma kapasitelerinden ve yumuşak yapısından kaynaklanmaktadır. Hidrojellerin yüksek biyoyumlulukları onların; kontakt lens, biyosensörler için membran, yapay deri materyali ve ilaç salım sistemlerinde kullanımına olanak sağlamaktadır (Meyer et al., 1985).

Camsı yapıdaki kuru hidrojel sulu bir ortam ile etkileştiğinde, su, hidrojel yüzeyindeki makromolekül zincirleri arasındaki boş alanlara nüfuz etmeye başlar. Yapıya giren su molekülleri hidrofilik gruplar ile etkileşir, bu sırada ağı yapı şişer.

Suyun hidrojel tarafından emilmesi denge şişme seviyesine ulaşana kadar devam eder ve hidrojin türüne bağlı olarak dakikalarca ya da günlerce sürebilir (Gümüşderelioğlu, 2010).

2.1.1. Süpergözenekli hidrojeller

Hidrojeller kuru haldeyken genellikle şeffaftırlar ve su içinde şişmeleri uzun zaman alır. Yavaş şişme, yoğun polimer zincirleri içerisine suyun yavaş bir biçimde difüzenmesinden kaynaklanmaktadır. Yavaş şişme özelliğine sahip hidrojeller çeşitli uygulamalar için avantajlıyken, bazı uygulamalarda kuru hidrojin çok hızlı biçimde şişmesi istenir (Dorkoosh et al., 2000). Hızlı şişme genellikle, kuru hidrojelleri çok küçük partiküller haline getirerek başarılmaktadır. Ancak boyutları ve biçimine rağmen, çok kısa sürede şişen geniş, kuru hidrojeller yapmak için polimerin hazırlanmasında yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur (Park, 2004).

Kinam Park ve grubu (1998) tarafından kontrollü ilaç salımı için geliştirilen vinil monomer bazlı hidrojeller hızlı şişme kinetiğine ve süperabsorbent özelliklerine sahiptir. Bu hidrojellerin sahip oldukları içsel bağlı mikroskobik gözenekler, kapiler güç ile hızlı ve çok miktarda suyu emebilmektedir. Bu şekildeki bir yapının hazırlanmasındaki en basit yol ise; gaz köpükleştirme tekniğidir (Omidian et al., 2005). Gaz köpükleştirme tekniği vinil monomerlerinin çapraz bağlanma reaksiyonu sırasında, gaz baloncuklarının oluşturulması ve bunların yapı içerisinde hapsedilmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan gözeneklerin çapları 100 µm'ye veya daha yükseğe çıkarılabilmektedir. Makrogözenekli hidrojellerin gözenek çaplarının 100 nanometre ile 10 mikrometre aralığında olduğu düşünülürse, bu yeni boyuttaki gözeneklere sahip hidrojellere "süpergözenekli hidrojeller" (SPH) adı verilmektedir (Chen et al., 1999). Çizelge 2.1'de hidrojellerin standart gözenek çap aralığı verilmektedir.

Çizelge 2.1. Gözenekli hidrojenlerin gözenek çap aralıkları.

Hidrojel	Gözenek Boyutu
Mikrogözenekli	10 – 100 nm
Mezogözenekli	100 – 1000 nm
Makrogözenekli	1 – 10 µm
Süpergözenekli	10 – 1000 µm

SAP'ler, SPH'lere benzer şekilde yapısal olarak çapraz bağlı, hidrofilik polimerlerdir. SAP'ler kısa zaman aralıklarında kendi ağırlıklarının veya hacimlerinin yaklaşık 10-1000 katı suyu ya da sulu akışkanı emebilirler. Her iki hidrojel türü de gözenekli bir yapıya sahiptir ancak, üretim prosesi ve kullanılan malzemeye bağlı olarak SAP'lerin şişme hızı dakikadan saatlere kadar değişmektedir. Hızlı şişme SAP örneklerin küçük boyutta olmalarına bağlıdır. Diğer taraftan SPH'lerin şişme kinetikleri boyuta bağlı olmaksızın daima hızlıdır. Bu durum SPH'lerin eşsiz özelliklerinden biri olan birbirine bağlı açık gözenek yapısı ile açıklanabilir (Omidian et al., 2005).

2.1.2. Süpergözenekli hidrojenlerin sentez yöntemleri

Gözenekli hidrojenlerin hazırlanmasında farklı yöntemler kullanılabilir. Porojen tekniği, faz ayrımı tekniği, bağımsız hidrojel partiküllerinin çapraz bağlanması ve dondurarak kurutma tekniği bunlardan başlıcalarıdır. Porojen tekniğinde; mikronize sukroz, sodyum klorür (NaCl) ve polietilen glikol (PEG) gibi suda çözünebilir, gözenek yapıcı ajanların varlığında gözenekli hidrojel sentezlenmektedir. Polimer ağının donmuş halde hazırlandığı durumlarda suyun kendisi de gözenek oluşturucu (porojen) olarak kullanılabilir. Porojen tekniği ile hazırlanan hidrojenlerin gözenek boyutları, kullanılan porojenin boyutlarına bağlı olarak değişir. Faz ayrımı tekniğinde, polimer uygun çözücü içerisinde çözüldükten sonra, polimerce zengin ve polimerce yoksul fazlar (çözücü fazı) oluşmaktadır. Çözücü fazının uzaklaşmasıyla geriye kalan polimerce zengin fazın katılaşması sonucu süngerimsi ve gözenekli bir yapı oluşmaktadır. Bu yöntemdeki temel kısıtlama; çok sınırlı çeşitte (poli-hidroksietil metakrilat, p(HEMA) ve poli-N-

izopropil akrilamid, p(NIPAAm)) ve kontrol edilemeyen gözenekliliğe sahip hidrojenlerin sentezlenebilmesidir. Gözenekli hidrojenlerin hazırlanmasındaki diğeri bir yöntem ise; hidrojel partiküllerinin çapraz bağlanmasıdır. Bu teknik ile üretilen hidrojenlerin partiküller arası boşluklardan oluşan gözeneklerinin boyutları, partiküllerden daha küçüktür ve bu yöntem yüzeyde kimyasal olarak aktif fonksiyonel gruplara sahip adsorban partiküller için bazı kısıtlamalara sahiptir (Chen et al., 1999). Dondurarak kurutma metodu ile hazırlanan hidrojenler ise, şişme sonrası gözenek yapılarını koruyamamakta, gözenek kayıpları gözlenmekte ve kalın duvarlara sahip homojen olmayan gözenekler oluşmaktadır (Gemeinhart et al., 2000; Annabi et al., 2009).

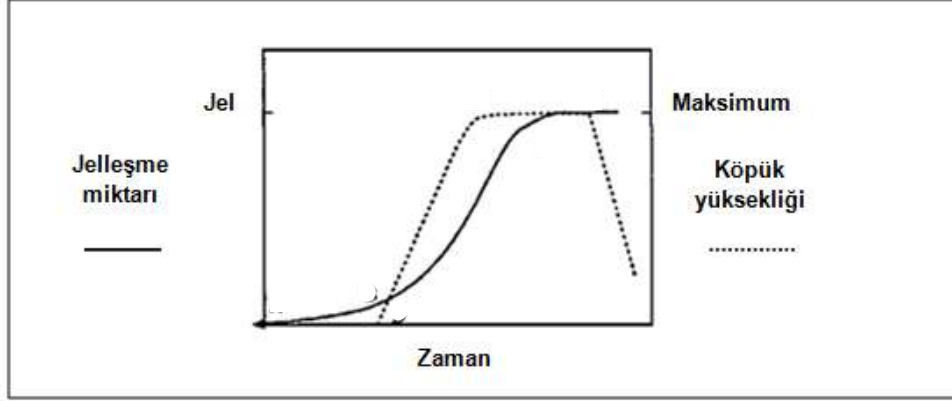
Mikrogözenekli hidrojenler, gözeneksiz hidrojenlere göre çok daha hızlı şişmektedir. Ancak bu şişme, difüzyon mesafesinin fazla olduğu birçok uygulama için yeterli değildir. Bu durum, mevcut gözenek yapısının, sıvı transferini aktarım yolu ile sağlayan içsel bağlı yapıda olmamasından kaynaklanmaktadır. Süpergözenekli hidrojenlerin sahip olduğu içsel bağlı gözenekler, bu yapıların geleneksel hidrojenlere göre daha hızlı bir şişme kinetiğine sahip olmalarını sağlamıştır.

İçsel bağlanmış gözenek yapısına sahip süpergözenekli hidrojenleri hazırlamanın en uygun yolu; monomerin çapraz bağlanma reaksiyonu sırasında gaz baloncuklarının oluşması ve polimerizasyon boyunca yapıya hapsedilmesi temeline dayanan “gaz köpükleştirme” tekniğidir (Chen et al., 1999). Gaz köpükleştirme tekniği ile boyutu birkaç yüz mikrometre olan ve birbirine içsel olarak bağlı gözeneklere sahip hidrojenler hazırlanabilmektedir. Böylece, boyutu ne olursa olsun hidrojenin herhangi bir bölgesi suyla temas ettiği anda, çok kısa bir süre içerisinde orijinal boyutunun çok üst mertebelerine ulaşabilmektedir (Chen et al., 1999).

2.1.3. SPH'lerin sentezini etkileyen faktörler

Geleneksel hidrojenler ve süpergözenekli hidrojenlerin hazırlanma yöntemlerindeki başlıca farklar, gaz baloncuklarının oluşumunu sağlayan köpükleştirici ajan ve oluşan gaz baloncuklarını uzun süre stabilize ederek, polimerizasyon süresince birbirine bağlı içsel gözeneklerin oluşmasını sağlayan yüzey aktif maddenin (köpük stabilizörü) monomer karışımına eklenmesidir. Bu yöntemle hazırlanan süpergözenekli hidrojenlerin gözenek çapları çoğunlukla gaz köpükleşme miktarı ile

belirlenir. Köpükleşme ve polimerizasyon prosesinin eş zamanlı ve kontrollü yürütülmesi, süpergözenekli hidrojel içerisinde homojen ve açık kapiler kanalların oluşumu için en önemli faktördür (Gemeinhart and Guo, 2004) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Süpergözenekli hidrojellerin sentezinde köpükleşme prosesi ve harmonize jelleşme (Chen et al., 1999).

Süpergözenekli hidrojellerin yüzeyindeki gözeneklerin oluşumu, polimerizasyon kabının yüzeyinden etkilenmektedir. Polimerizasyon kaplarının yüzeyi, farklı polarite ve iyonik bileşime sahip çeşitli silan molekülleri ile modifiye edildiğinde oluşan hidrofobik yüzeyler "gözenekli" yüzey yapıları oluştururken, hidrofilik yüzeyler ise "gözeneksiz" yüzey yapıları oluşturur. Gaz baloncukları, polimerizasyon kabının hidrofilik yüzeyinde kapanma eğilimindedir. Ancak, mevcut yüzey morfoloji farklılıklarına rağmen, farklı polimerizasyon kaplarında üretilen süpergözenekli hidrojellerin şişme kinetiklerinde büyük bir farklılık gözlenmemiştir (Gemeinhart et al., 2000). Bu durum yapıdaki gözeneklerin, oluşan gaz akımı boyunca birbirlerine içsel bağlanmaları ile açıklanabilir.

Süpergözenekli hidrojellerin yapısını etkileyen bir diğer faktör; kurutma prosesidir. Kurutma sırasında kapalı ya da parçalanmış gözenek oluşmadığı zaman SPH'lerin şişme kinetiği ve oranı korunmaktadır. Organik kurutma (örneğin, aseton veya etanol ile kurutma) veya dondurarak kurutma yöntemleri, doğrudan hava ile kurutma yöntemlerinden daha iyi sonuç vermektedir. Sonuçta, küçük boyutlarda süpergözenekli hidrojeller hazırlanmak istendiğinde dahi, uygun koşullar altında homojen ve birbirine bağlı gözenek yapısı elde edilebilir (Dorkoosh et al., 2000).

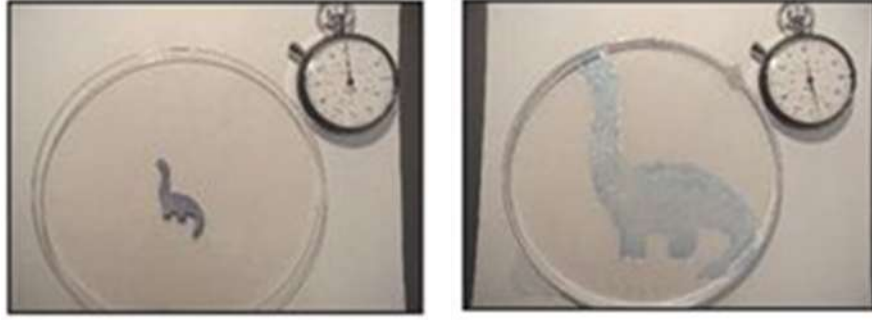
Taramalı elektron mikroskobu (SEM), gözenekli kuru hidrojel örneklerin morfolojik yapısını incelemek için uygun bir yöntemdir. Çogu araştırmacı hidrojelleri kuru halde incelemiş ve bu hidrojellerin dondurarak kurutma gibi bir kurutma prosesi sonrası oluşmuş, uygun gözenek yapısına sahip olduklarını kaydetmiştir (Gemeinhart ve Guo, 2004). Süpergözenekli hidrojeller, yapılarında su varken CryoSEM tekniğiyle incelendiklerinde de, birbirine bağlı açık kapiler kanalların varlığı tespit edilmiştir (Gemeinhart, 1999).

2.2. Süpergözenekli Hidrojellerin Temel Özellikleri

Su emici polimer sistemlerin farklı ve gelişmiş bir kategorisi olan süpergözenekli hidrojeller ilk olarak Park ve grubu tarafından üretilmiştir. Park ve grubunun kurucusu olduğu Akina Inc. tarafından geliştirilen ve Aquagel® olarak adlandırılan bu hidrojeller, pek çok üstün özelliğe sahiptirler, bu özellikler aşağıda özetlenmektedir.

Hızlı-duyarlılık: Geleneksel hidrojeller pek çok uygulama için çevresel değişikliklere karşı çok yavaş bir biçimde yanıt (şişme veya büzülme şeklinde) vermektedirler. Süpergözenekli hidrojel teknolojisi; büyüklükleri ne olursa olsun, bir dakika gibi kısa bir sürede çevresel değişikliklere karşı boyutlarını değiştirebilen hidrojel sistemlerin hazırlanmasına izin vermektedir.

Yüksek şişme oranı: Süpergözenekli hidrojeller sadece hızlı değil, aynı zamanda çok büyük boyutlara şişmektedirler (Şekil 2.2). Şişme oranı (şişmiş hidrojel ağırlığı/kuru hidrojel ağırlığı) birkaç yüz kadar büyük olabilir. Tamamen şişmiş bir hidrojinin mekanik dayanımını sağlamak için şişme oranı, çapraz bağlanma yoğunluğunun artırılmasıyla 100'den daha küçük değerlere düşürülebilir. Arttırılmış mekanik özellik, süpergözenekli hidrojel kompozitlerin ve/veya elastik süpergözenekli hidrojellerin hazırlanmasıyla da elde edilebilir.



Şekil 2.2. SPH'lerin hızlı (~30 saniye) ve yüksek şişme oranları.

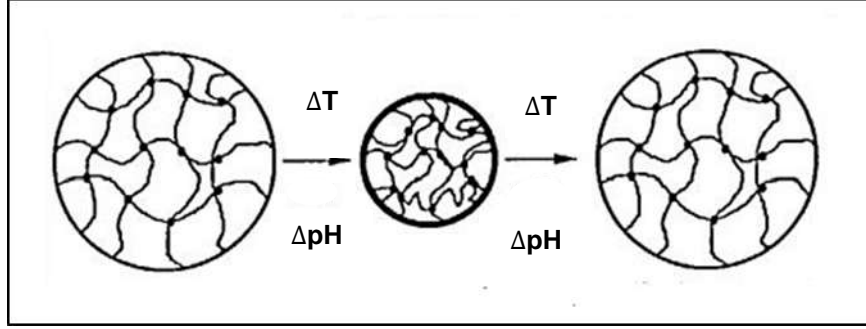
Elastiklik: Süpergözenekli hidrojeller büyüklükleri ne olursa olsun bir dakikadan daha kısa sürede su içerisinde şişerler. Şişmiş süpergözenekli bir hidrojelin ağırlığının %90'ından fazlası su olduğundan SPH'ler mekanik yönden zayıftırlar. Akina Inc. tarafından geliştirilen elastik özellikteki SPH'ler, şişmiş formda kopmadan yaklaşık iki katına kadar uzayabilirler. Yüksek elastiklik özelliği süpergözenekli hidrojelleri, mekanik yönden daha dirençli materyallere dönüştürmektedir. Elastik SPH'ler, oral kontrollü salım formülasyonlarından doku mühendisliği uygulamalarına kadar çeşitli uygulama alanları için idealdir.

Sol-jel faz-geçiş özelliği: Sol-jel faz-geçiş sistemlerinin; eczacılık, biyomedikal ve malzeme gibi pek çok alanda uygulaması bulunmaktadır. Akina Inc., yaygın olarak bulunan selüloz polimer bazlı yeni sıcaklık-duyarlı polimerler geliştirmiştir. Bu sıcaklık-duyarlı faz-geçişli hidrojeller, çevre duyarlı ilaç salım sistemlerinden ticari ürünlere kadar geniş bir alanda yüksek derecede ilgi çekici materyallerdir.

Çevresel uyaranlara duyarlılık: Pek çok sistemde olduğu gibi SPH'lerin de çevredeki değişimlere (pH, sıcaklık, iyonik kuvvet, manyetik alan gibi) karşı duyarlı formları hazırlanabilmektedir. Örneğin; pH-duyarlı ve hızlı şişebilen poli(akrilamid-ko-akrilik asit), p(AAm-ko-AA), SPH'ler sentezlenmiştir (Gemeinhart and Guo, 2004). Bu polimerler, yapısındaki karboksil gruplarının varlığına bağlı olarak çevresel pH değişimlerine karşı şişerek ya da büzülerek cevap verirler. pH:1.2 ortamında şiştikten sonra pH:7.5 ortamına transfer edilen p(AAm-ko-AA) SPH'lerin, benzer boyutlardaki gözeneksiz hidrojellere göre, yüksek mertebelerde daha hızlı şiştikleri belirlenmiştir. Takibinde, şişen bu SPH'lerin pH:7.5 ortamından pH:1.2 ortamına alındıklarında yaklaşık bir dakika içinde büzüstükleri gözlenmiştir.

Çeşitli pH değerlerine sahip tampon çözeltilerde şişen SPH'lerin gözenek çapları, CryoSEM çalışmalarıyla tespit edilmiş ve pH 2'den 4'e arttığında gözenek çapının yaklaşık olarak aynı kaldığı, ancak pH 4'ten 7.4'e yükseldiğinde gözenek çapının önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Akrilik asitin pKa'sı yaklaşık 4.5 olduğundan bu beklenen bir durumdur.

Poli(N-izopropilakrilamid-ko-akrilamid) SPH'ler ise, sıcaklık duyarlı ve hızlı şişme karakteristiklerine sahip polimerlerdir. Bu SPH'ler, 10°C ve 45°C'daki tampon çözeltileri arasında dönüşümlü olarak yer değiştirdiklerinde, hızlı şişme ve büzüşme kinetiği göstermişlerdir. Bu tip hidrojeller, diğer çeşit hidrojellerden farklı olarak, çevredeki değişimlere karşı hızlı biçimde yanıt vermektedirler (Gemeinhart ve Guo,2004) (Şekil 2.3).





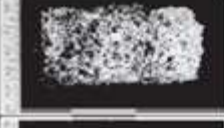



Şekil 2.3. SPH'lerin çevresel değişikliklere (pH ve sıcaklık) karşı şişme ve büzüşme davranışı (Peppas, 1997).

2.3. Yeni Nesil Süpergözenekli Hidrojeller

Süpergözenekli hidrojellerin benzersiz özellikleri, onları pek çok alanda kullanışlı hale getirirse de, tamamen şişmiş durumda mekanik yönden zayıf olmaları pratik kullanımlarını engelleyen ana nedendir (Qui and Park, 2003).

SPH'ler farklı özelliklere sahip 3 nesile ayrılırlar. Bunlardan birinci nesil (geleneksel) SPH'ler; hızlı şişme, yüksek şişme oranı ve zayıf mekanik özellikleriyle karakterize edilirler. İkinci nesil SPH'ler olan SPH kompozitler (SPHC); hızlı şişme, orta derecede şişme oranı ve gelişmiş mekanik özellikleriyle değerlendirilirler. Üçüncü nesil SPH hibridler (SPHH) ise; sahip oldukları elastik özellikleriyle pek çok eczacılık ve biyotıp uygulamasında oldukça kullanışlı olabilirler (Omidian et al., 2005). Şekil 2.4'te SPH'lerin farklı nesillerine ait

hidrojellerin kimyasal yapıları, şişme özellikleri ve mekanik özellikleri karşılaştırılmıştır.

	Polimer yapısı	Şişme özellikleri	Mekanik özellikler
Birinci nesil	Polimer zinciri Çapraz bağlayıcı		
İkinci nesil	Kompozit ajan		
Üçüncü nesil	Hibrid ajan		

Şekil 2.4. Farklı nesil SPH'lerin yapısal, şişme ve mekanik özellikleri.

2.3.1. Birinci nesil SPH'ler: Geleneksel SPH'ler

Geleneksel SPH'lerin sentezi için en yaygın kullanılan monomerler, yüksek derecede hidrofilik olan akrilamid, akrilik asit ve sülfopropil akrilat tuzlarıdır. Kuru SPH'ler sert ve kırılındırlar, fakat polimerlerin hidrofilik doğaları sayesinde, bu sert yapılar yumuşak ve esnek yapılara dönüşürler (Omidian et al., 2005). Geleneksel süpergözenekli hidrojellerin üretimi ilk olarak 1999 yılında Chen ve grubu tarafından gerçekleştirilmiştir (Chen et al., 1999). Sonrasında Chen ve Park yüksek şişme özelliğine sahip sukroz temelli süpergözenekli hidrojellerin üretimini gerçekleştirmiştir (Chen and Park, 2000a).

Geleneksel SPH'ler, bükme ve çekme streslerine karşı kırılındırlar. Çok küçük basınçlar altında bile yapıları kolaylıkla parçalanır. Birinci nesil SPH'lerin zayıf mekanik özellikleri, ikinci nesil SPH'lerin geliştirilmesine neden olmuştur.

2.3.2. İkinci nesil SPH'ler: SPH kompozitler

SPH kompozitleri hazırlamak için kompozit ajanlar kullanılır. Bu ajanlar, sentez sonucu oluşan polimer zincirleri arasında fiziksel çapraz bağlı bölgeler olarak rol oynamaktadırlar. Kompozit bir ajan, çapraz bağlı ve su emici hidrofilik bir polimerdir ve suyu absorplayabilen bu yapısı ile monomer çözeltisini, çapraz

başlayıcı ajanı, başlatıcıyı ve sentez sonucu reaksiyona girmeden kalan bileşenleri absorplayabilir.

SPH kompozit materyallerde kompozit ajan varlığı, geleneksel SPH'lere göre SPH kompozitlere gelişmiş mekanik özellikler sağlamaktadır, ancak SPH kompozitler hala kırılmandır ve belirli stres altında parçalanırlar (Omidian et al., 2005). Son yıllarda, ikinci nesil SPH'ler olan SPH kompozit materyaller, oral yolla alınan bağırsağa yönelik ilaç salım uygulamaları için ilgi çekici bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Chen ve Park, midede alıkonmak için mekanik açıdan oldukça zayıf olan akrilamid-bazlı süpergözenekli hidrojel, Ac-Di-Sol® adlı kompozit ajan ile geliştirerek süpergözenekli kompozit hidrojel sentezlenmiş ve sistemin midede alıkonma süreci iyileştirilmiştir (Chen and Park, 2000b). Dorkoosh ve grubu, akrilamid-bazlı süpergözenekli hidrojel ve süpergözenekli kompozit hidrojellerin sentezini gerçekleştirmiştir (Dorkoosh et al., 2000). Kim ve Park (2004), polietilenimini kompozit ajan olarak kullanmış ve poli(akrilamid-ko-akrilik asit) temelli süpergözenekli hidrojel sentezlemiştir (Kim and Park, 2004). Yang ve grubu (2004), sülfopropil akrilat-ko-akrilik asit süpergözenekli hidrojellerin mekanik özelliklerini geliştirmek amacı ile kompozit ajan olarak poli(vinil alkol) kullanmıştır (Yang et al., 2004). Grubumuz tarafından yürütülen bir çalışmada ise kemik doku mühendisliği için hidroksiapatit içeren süpergözenekli kompozit hidrojel üretimi gerçekleştirilmiştir (Demirtaş et al., 2008). Chavda ve Patel (2010) tarafından yürütülen bir çalışmada geleneksel SPH'lerin mekanik açıdan dayanıksız olmaları göz önünde bulundurularak, kompozit ajan karboksimetilselüloz sodyum (NaCMC) varlığında poli(akrilamid-ko-akrilik asit), p(AAm-ko-AA)-bazlı süpergözenekli hidrojellerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen kompozit süpergözenekli hidrojellerin gastrik bölgede kalış süreleri ve mekanik dayanımları incelenmiştir (Chavda and Patel, 2010).

2.3.3. Üçüncü nesil SPH'ler: SPH hibridler

Çok yüksek mekanik ya da elastik özelliklere sahip SPH'leri sentezlemek için, SPH hibridleri temel alan üçüncü nesil SPH'ler geliştirilmiştir. SPH kompozitlerden farklı olarak SPH hibridler, SPH oluşumu sırasında çapraz bağlanabilen hibrid bir ajanın eklenmesiyle hazırlanırlar. Bu hibrid ajan, kimyasal veya fiziksel çapraz bağlanma süresince ikinci bir çapraz bağlı yapıyı oluşturabilen suda-çözünen ya da suda-

dağılan bir polimerdir. İkinci ağ yapı oluştuğu zaman tüm sistem, iç içe geçmiş polimerik ağ yapılara (interpenetrating network, IPN) benzer bir yapı oluşturur. Bu çeşit bir mekanizma, iç içe geçmiş ağ yapı oluşumuna benzer bir durum sergilemektedir.

SPH hibrid yapılara örnek olarak, sodyum aljinat varlığında akrilamid-bazlı SPH'lerin sentezi ve sonrasında aljinat zincirlerinin kalsiyum iyonları varlığında çapraz bağlanması verilebilir. SPH hibridlerin eşsiz özelliklerinden bir tanesi şişmiş halde sahip oldukları yüksek elastik özelliklerdir. SPH'ler ve SPH kompozitlerle karşılaştırıldıklarında, SPH hibridler çekme stresi uygulandığında kolay kırılmazlar. SPH hibridlerin elastik ve kauçuğumsu özellikleri onları, esnek ve dayanıklı jellerin tercih edildiği çeşitli uygulamalar için uygun malzeme haline getirmektedir.

Suda şişmiş SPH hibrid yapılar; gerilme, sıkıştırma, bükme ve çekme gibi çeşitli streslere karşı direnç gösterebilmektedir. Bu durumun temel etmeni IPN yapıların varlığı olup, aşağıda IPN yapılara ait bilgi sunulmuştur.

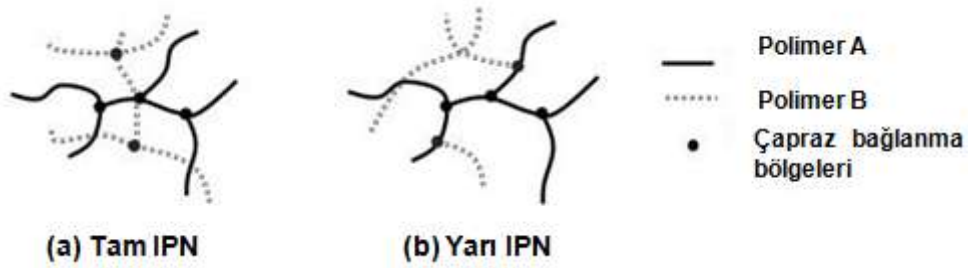
IPN yapılar

Son yıllarda, hidrojellerin mekanik kuvvet ve dayanımlarını arttırmak amacıyla; hidrojel ağına polimer partiküllerinin eklenmesi (Zhang et al., 2005), soğuk muamele (cold-treatment) (Zhang and Zhuo, 1999) veya soğutarak dondurma (Kato et al., 2003), polimer yapısına kil katılması (Haraguchi et al., 2003) ve iç içe geçmiş ağ yapıların oluşturulması (Hou and Siow, 2001) gibi birçok yöntem denenmiştir. Hidrojelleri mekanik dayanım yönünden iyileştirmek için en etkin yöntemin iç içe geçmiş ağ yapıların (interpenetrating network, IPN) oluşturulması olduğu düşünülmektedir (Hou and Siow, 2001).

İç içe geçmiş ağ yapılar ilk olarak Millar (1960) tarafından ortaya atılmıştır. İç içe geçmiş polimerik ağ yapı (IPN), iki ya da daha fazla polimerden en az bir tanesinin diğerlerinin varlığında sentezlenmesi ve/veya çapraz bağlanması sonucu oluşmaktadır (Sperling, 1981). Aralarında kovalent bağlanmanın gerçekleşmediği farklı ağ yapıların, yalnızca fiziksel bağlanmalar yoluyla kısmen ya da tam olarak birbiri içine girmesi sonucu oluşan bu ağ yapılar, ideal açıdan homojen bir yapıya sahip olmalıdır (Klempner and Berkowski, 1987). Ancak genellikle, kullanılan polimerlerin özelliklerinden dolayı homojenite sağlanamaz. IPN yapıyı oluşturan

polimerler arasında kimyasal bağ bulunmadığından, ana yapı içerdiği her bir polimerik ağ yapının özelliklerini gösterir. Böylelikle, aranan özelliklere sahip bir yapı üretilebilmektedir. Örneğin, pH-duyarlı bir hidrojelin yapısına katılan sıcaklık-duyarlı ikinci polimer, bu yapının pH duyarlılığını koruyarak onu aynı zamanda sıcaklık-duyarlı hale de getirebilir (Park et al., 1993).

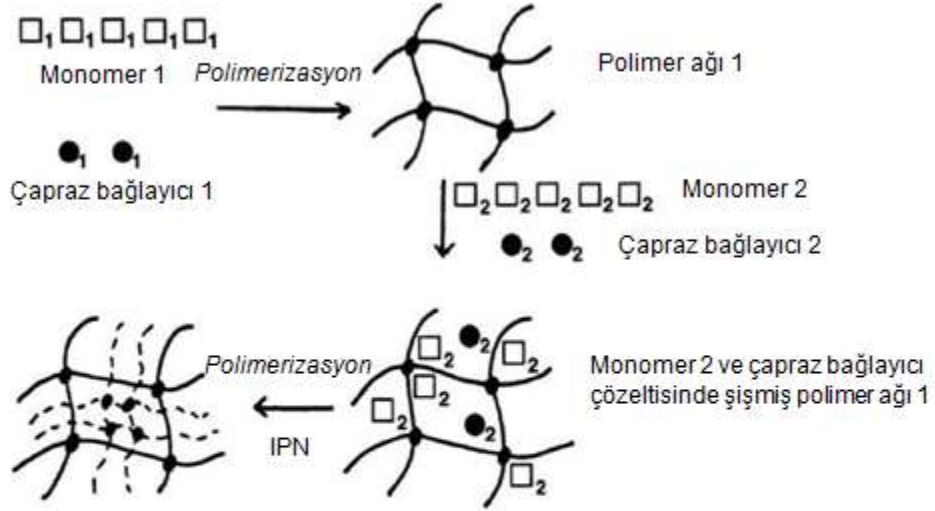
IPN sistemlerde, polimerlerden biri çapraz bağlı iken diğerinin doğrusal ya da dallanmış formda olduğu sistemler “yarı-IPN” yapı olarak adlandırılmaktadır. Polimerlerin her ikisinin de çapraz bağlandığı durumda ise oluşan sistemler “tam-IPN” olarak adlandırılır ve ideal iç içe geçmiş ağ yapıyı oluştururlar (Sperling et al., 1994).



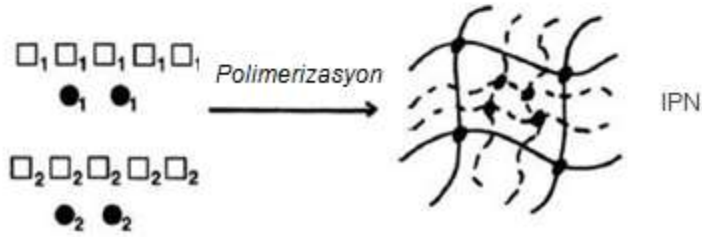
Şekil 2.5. IPN yapının şematik gösterimi (Lin et al., 2011).

IPN yapılar, temel olarak i) ardışık polimerizasyon ve ii) eş-zamanlı polimerizasyon olmak üzere 2 şekilde sentezlenirler. Şekil 2.6’da bu iç içe geçmiş ağ yapı sentez yöntemleri şematik olarak gösterilmiştir. Ardışık polimerizasyonda öncelikle monomer 1 çapraz bağlanarak polimer ağı 1 oluşturulur. Sonrasında hazırlanan bu çapraz bağlı yapı; monomer 2, çapraz bağlayıcı ve başlatıcının bulunduğu çözelti içerisinde şişerken monomer 2 polimerleşir ve ikinci ağ yapı oluşur. Böylelikle ikinci polimer ağı, birinci polimer ağı içinde şekillenir. Eş zamanlı polimerizasyonda ise her iki bileşenin monomerleri, bu monomerlere özgü çapraz bağlayıcı ve başlatıcı varlığında aynı anda polimerleşir. Polimerizasyon reaksiyonlarının eş zamanlı olarak gerçekleşebilmesi için reaksiyonlar birbirini engellememelidir. Eş zamanlı polimerizasyonda birbirini engellemeyen radikal polimerizasyonu ve kondenzasyon polimerizasyonu birlikte kullanılabilir (Sperling et al., 1994).

(a) Ardışık polimerizasyon yöntemi



(b) Eş zamanlı polimerizasyon yöntemi



Şekil 2.6. Temel IPN sentez metotları (Sperling et al., 1994).

IPN yapılar diğer çoklu polimer kombinasyonlarına göre birçok üstün özelliğe sahiptir. IPN yapının oluşturulması çapraz bağlı polimer yapıları birbiri içinde tamamen karıştırılabilmek için tek yoldur. Pek çok polimer termodinamik açıdan birbiriyle uyumsuz olduğundan faz ayrımı olmaksızın homojen bir yapının oluşumu; çapraz bağlı polimer yapıların birbiri içinde tamamen karışabildiği iç içe geçmiş ağ yapının oluşmasıyla sağlanmaktadır (Frisch et al., 1981).

Birçok çalışmada IPN formda polimer yapı hazırlamak için, doğal ve sentetik polimerler kullanılmıştır. 2003 yılında yapılan bir çalışmada midede alıkonan sistemlerin geliştirilmesi amacı ile üretilen akrilamid-bazlı süpergözenekli hidrojenlerin yapısına, ikinci bir polimer olarak poliakrilonitril katılmıştır. Elde edilen IPN yapının mekanik açıdan daha yüksek dayanıma sahip olduğu gözlenmiştir (Qui and Park, 2003). Kemik doku mühendisliği için p(HEMA)-bazlı süpergözenekli hidrojenlerin incelendiği bir diğer çalışmada, hidrojenleri mekanik açıdan

güçlendirmek ve biyouyumluluğunu arttırmak için yapıya jelatin eklenerek yarı-IPN ve IPN yapıdaki SPH'lerin üretimi başarıyla gerçekleştirilmiştir (Çetin et al., 2010).

IPN yapıların karakteristik özellikleri çeşitli analitik teknikler ile belirlenebilmektedir. Bu yöntemler; statik ve dinamik mekanik analiz, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), kızılötesi spektroskopi (IR), elektron mikroskobu, X-ışınları ve nötron saçılması gibi polimerik materyaller için kullanılan geleneksel metotlardır (Sperling, 1985).

DSC yöntemi, IPN'leri oluşturan polimer zincirlerinin iç içe geçme derecesinin nitel olarak belirlenmesinde kolaylık sağlamaktadır. Ağ yapılı polimerlerin DSC eğrisinde birden fazla T_g değerinin gözlenmesi; fazlar arası ayrılmanın olduğunu, tek bir T_g değerinin bulunması ise; fazlardaki iç içe geçmenin daha iyi ve uyumlu olduğunu göstermektedir (Bischoff and Cray, 1999).

IPN'lerin mikro yapılarının incelenmesinde yaygın olarak kullanılan metotlardan birisi, elektron mikroskobudur (Michaud and Camberlin, 1988). Geçirimli elektron mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (TEM ve SEM), ağ yapılı sistemlerde çoklu-fazın boyut ve şekillerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

2.4. Süpergözenekli Hidrojellerin Kullanım Alanları

Süpergözenekli hidrojeller; ağızdan alınan peptid ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi, midede alıkonan cihazların geliştirilmesi, anevrizma tedavisi, diyete yardımcı besin maddesi ve diğer kullanımlar olmak üzere çeşitli uygulamalarda yer almaktadırlar. Aşağıda bu uygulamalar kısaca açıklanmıştır.

Midede alıkonan cihazların geliştirilmesi

Süpergözenekli hidrojeller ilk olarak, midede alıkonulan cihazları hazırlamak amacıyla geliştirilmişlerdir. Bu uygulamayla amaçlanan, ağızdan alınan ilaç yüklü hidrojelin hızlı bir biçimde şişerek yeterli büyüklüğe ulaşması ve midenin on iki parmak bağırsağına açılan kısmından geçemeyerek, ilaç salımının uzun sürede gerçekleşmesinin sağlanmasıdır. Hızlı şişmenin başlangıçtaki amacı, 20 dakika içerisinde maksimum şişmeye ulaşmaktır. Çünkü su mide içerisinde 30 dakika boyunca kalabilir.

Polivinilpirolidon (PVP) süpergözenekli hidrojel kullanılarak yapılan hayvan deneylerinde, hidrojinin midede 24 saatten fazla kalabildiği ve etkin ilaç salımının sağlandığı görülmüştür (Shalaby et al., 1992).

Chen ve grubu 1998 yılında yaptıkları çalışmada, midede alıkonan cihaz hazırlamak amacıyla akrilat-bazlı süpergözenekli hidrojelini geliştirmiştir. Chen ve grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada, akrilat-bazlı süpergözenekli hidrojelinin yapısına Ac-Di-Sol® eklenerek SPH kompozitler hazırlanmıştır. Bu SPH kompozitler kullanılarak yapılan hayvan deneylerinde, hidrojelinin midede alıkonma özellikleri incelenmiş ve sonuç olarak mide içerisinde 24 saatten fazla kalabildikleri gözlenmiştir. Üretilen SPH kompozitlerin gastrik alıkonma için üç önemli özellik olan hızlı şişme, yüksek şişme oranı ve yüksek mekanik dayanıma sahip olmaları, midede uzun süreli alıkonan cihazlar olarak kullanılabileceklerini göstermiştir (Chen et al., 2000).

Anevrizma tedavisindeki uygulama

Damarın belli bir bölgesinin genişlemesinden oluşan şişlik olarak tanımlanan “anevrizma” tedavisi için geliştirilen yeni biyomedikal cihazlarda da süpergözenekli hidrojel kullanılmaktadır. Özel bir görüntüleme yöntemiyle, anevrizmanın şekli ve büyüklüğü saptandıktan sonra, daha ufak boyutlarda, fakat aynı şekilde süpergözenekli hidrojel sentezlenebilir. Anevrizmanın olduğu bölgeye süpergözenekli hidrojel yerleştirildiği zaman, hızlı bir şişme meydana gelerek o bölgeyi doldurur ve kanın pıhtılaşmasını sağlar (Ciceri et al., 2002). Seyrek de olsa, süpergözenekli hidrojel parçacıkları, kanın tümörlere doğru akışını engellemek için dolaşımı bloke edici ajan olarak da kullanılabilir.

Diyete yardımcı besin maddesi olarak kullanımı

Kilo kontrolü sağlamada, süpergözenekli hidrojel kullanılarak, karın boşluğunda anlamlı bir alan kaplanır ve böylece diğer besinler için yer azaltılmış olur. Bu şekilde iştah bastırılmış olur (Park, 2004).

Diğer uygulamalar

Süpergözenekli hidrojel ilaç ve biyomedikal ürünler dışında farklı uygulama alanlarında da kullanılmışlardır. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi süpergözenekli

hidrojelin değişik Őekillerde hazırlanabilmesi ve hızlı Şişme özelliğinden dolayı çocuklar için ilgi çekici bir oyuncak olabileceği düşünölmüŐtür.

Bir SPH, kuru ağırlığının birkaç katı kadar suyu emme özelliğine sahiptir. Bu özelliği kullanarak, çevrede istenmeyen sıvıların herhangi bir yere rastlantısal olarak dökölmesine engel olunabilmektedir. Sıvı solösyonlar, parçacık formunda veya uygun biçim ve boyutta hazırlanabilen süpergözenekli hidrojeller tarafından çevrelenerek muhafaza edilebilirler. Süpergözenekli hidrojeller, neme hassasiyeti olan malzemelerin içerisine su girişine engel olmak için de kullanılmaktadır. Bu tür malzemeler, süpergözenekli hidrojellerle kaplanır ve böylece herhangi bir neme maruz kaldığında su, Hidrojel tabakası tarafından tutulur. Hızlı ve yüksek Şişme özellikleri süpergözenekli hidrojellere çok önemli bir yetenek kazandırmaktadır. Suyu emerek ŐiŐtiklerinde, Şişme boyunca dış tarafa doğru anlamlı bir kuvvet uygulamaktadırlar. Yarım gram ağırlığında bir SPH, ŐiŐtięi zaman 100 gram ağırlığındaki bir maddeyi bir dakika gibi kısa bir zamanda yukarı kaldırabilmektedir. Bu özellik SHP'ler için oldukça etkileyicidir ve birçok uygulamada kullanılabilirler. Hidrojenin uyguladığı bu kuvvet, bir alarm sisteminin tetikleyicisi olarak kullanıldığında su baskınları tespit edilebilmektedir (Park, 2004).

Oral peptid salım sistemlerinin geliştirilmesi

Hemofili, diyabet, kanser, kistik fibröz, sedef hastalığı ve kalıtsal hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan peptid ve proteinler gibi hidrofilik ve makromoleküler yapıdaki ilaçların, oral yollu kontrollü salımı klinik açıdan hastaya ilaç verme yolları arasında da en güvenilir ve en uygun olanıdır (Torres-Lugo and Peppas, 1999). SPH'lerin bu amaçla kullanımı klinik açıdan araştırılmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında sentezlenen SPH'lerin protein bazlı ilaçların kontrollü salımı amacıyla kullanımı hedeflendiğinden, aşağıda öncelikle "protein ilaçların kontrollü salımı" konusunda bilgi verilecek ve daha sonra SPH'lerin oral peptid salım sistemlerinde kullanımına yönelik çalışmalar özetlenecektir.

2.5. Protein İlaçların Kontrollü Salımı

Moleküler biyoloji alanındaki son gelişmeler, büyük molekül ağırlığına sahip protein ve peptid bazlı ilaçların çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanımına imkan vermiŐtir (Peppas et al., 2000). Çoğu protein yüksek molekül ağırlığının yanı sıra,

sınırlı kararlılığa sahiptir. Ayrıca, proteinlerin kan dolaşımında kısa yarı ömre sahip olmaları nedeniyle tedavi edici etki bu ilaçların sık tekrarlanan enjeksiyonu yoluyla sağlanmaktadır (Manning et al., 1989).

Peptid ve protein yapıdaki ilaçların enjeksiyon yoluyla uygulandığı klasik tedavi yönteminde, ilacın plazma konsantrasyon değerinin sırasıyla maksimum ve minimum yönde ani değişimi, tutarlı ve yararlı bir tedavinin sağlanabilmesi için yeterli olmamaktadır. Etkin maddenin optimum plazma konsantrasyon değeri, sık aralıklarla yüksek dozda ilaç alımıyla sağlanabilmektedir. Bu nedenle protein ilaçlar için en uygun uygulama yöntemi; verilecek doz sayısını azaltan ve ilacın kararlılığını koruyarak istenen süre boyunca salımını sağlayabilecek bir kontrollü salım sistemidir.

Geleneksel küçük moleküllü ilaçların salımı için; oral (Knuth et al., 1993), parenteral, bukal (Nagai and Machida, 1992), transdermal, oküler (Lallemand et al., 2003), intravajinal (Knuth et al., 1993), rahim içi, pulmoner ve nazal yollu kontrollü salım sistemleri geliştirilmiştir. Bu salım yöntemlerinden her birisi, hedef bölgelerinin fizyolojik yapısına bağlı olarak, özgün avantajlara ve zorluklara sahiptir. Farklı olarak büyük molekül ağırlığı ve düşük kararlılığa sahip proteinlerin bahsedilen yöntemlerden herhangi birisi ile kontrollü salımı özel formülasyon yöntemlerini gerektirmektedir. Bu kategorideki ilaçların kontrollü salımı için klinik açıdan en uygun yöntem oral yolla kontrollü salım olsa da, mide-bağırsak ortamının asidik özelliği ve içerdiği proteolitik enzimler, protein ilaçların hızlı bir şekilde bozunmasına neden olmaktadır. Ayrıca, hidrofilik yapıdaki protein moleküllerinin biyoyararlanımı, bağırsak duvarının düşük membran geçirgenliği nedeniyle oldukça düşüktür. Bu durum protein ilaçların, oral yolla uygulanmasını büyük ölçüde kısıtlamaktadır (Manning et al., 1989; İmren et al., 2010).

Protein temelli hidrofilik ve makromoleküler ilaçların ağız yoluyla alındığı uygulamalarda artırılmış biyoyararlanımın hedeflendiği çok sayıda çalışma yürütülmüştür (Dorkoosh et al., 2001; 2002a; 2002b). Tedavi-edici dozlarda tahmin edilebilir ve tekrarlanabilir absorpsiyon elde edebilmek için ilaçların bölgeye özgü salımı, istenilen tedavi edici etkinin sağlanması için ise zayıf biyoyararlanımın geliştirilmesi ile mukozadan geçişin ve metabolik engellerin aşılması etkin ilaç dağıtımını sağlayacak sistem tasarımı önemli noktalardır (Bai et al., 1995; Fix,

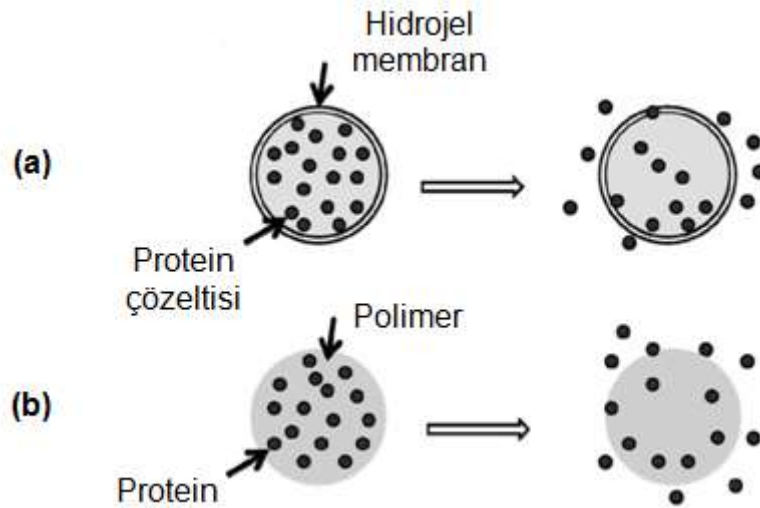
1996). Sistem tasarımıında bir diğer önemli nokta ise mide-bağırsak (GI) bölgesinde çok kısa yarı ömre sahip olan peptid ve protein ilaçların bağırsak epitelinden hızlı ve etkili emilimine imkan vererek, etkin plazma değerine ulaşılmasını sağlayan ani salım (burst release) profilinin yaratılmasıdır (Dorkoosh et al., 2001).

2.5.1. Hidrojel yapıdaki protein ilaç salım sistemleri

Hidrojellerin ağ yapıları ve termodinamik özellikleri; difüzyonal davranışları ve yapılarına katılan biyoaktif ajanların moleküler stabiliteleri açısından önemli rol oynamaktadır (Peppas, 1997). Hidrofilik polimerlerden protein salımını etkileyen önemli değişkenler, düşük molekül ağırlıklı ilaçlardaki gibi, salım mekanizmasına ve cihazın özelliklerine bağlıdır. Ayrıca çözünenin moleküler boyutu; difüzyonu ve hidrofilik polimerlerden salımı istenmeyen şekilde engellemektedir (Ende, 1993). Protein ve peptid ilaçların yapısının bozunmaya uğramaması için, uygun sıcaklık, pH ve karıştırma koşullarında kontrollü salım cihazı tasarlanmalıdır (Lewis et al., 1990). Proteinlerin farmakokinetiklerinin ve salım kinetiklerinin değerlendirilmesi, uygun salım mekanizmasının seçilmesine yardımcı olur (Tracy, 1998).

Hidrojel sistemlerden protein salımını etkileyen bir diğer unsur da; cihazda proteinin doğal yapısının korunamamasıdır. Suyun başlıca taşıma ortamı olduğu difüzyon-kontrollü taşıma sistemlerinde, protein çözeltisinin kararlılığı cihazın tipini tayin eder. Rezervuar tipi sistemlerle (Şekil 2.7,a), yüksek kararlılığa sahip proteinler için salım süresi arttırılabilir (Langer, 1990). Alternatif olarak, protein ve hidrofilik polimerin toz karışımının bir matris tablet şeklinde doğrudan sıkıştırılmasıyla, susuz taşıma sistemleri yaratılabilir (Şekil 2.7,b).

Protein ile biyolojik akışkanın temasını önlemek veya geciktirmek için, hidrofilik polimer/protein çekirdek etrafına hidrofobik tabakaların kaplanması gibi ek önlemlerin alınması gerekir (Langer and Folkman, 1976). Böyle bir cihaz, difüzyon başlayana kadar biyolojik sıvı ile proteinin temasını önler, uygun zaman, pH ve durumda salım gerçekleşir. Bu sayede depolama ve raf ömrü uzar.



Şekil 2.7. Protein salan hidrojel sistemler (a) Sulu durumda protein içeren rezervuar sistem (b) Protein ve hidrofilik polimerin toz karışımının sıkıştırılmasıyla oluşturulan susuz salım cihazı (matris sistem) (Fu and Kao, 2010).

2.5.1.1. Protein salımında kullanılan hidrojellerin yapısı

Hidrojelden protein salımı, çevresel etkenlere bağlı olarak komplekstir. Kontrollü salım uygulamalarında kullanılan hidrofilik polimerler; gözeneksiz, mikrogözenekli ve makrogözenekli hidrojeller olarak 3 ana sınıfta toplanabilir (Peppas and Meadows, 1983).

Gözeneksiz hidrojeller; 3-boyutlu ağ şeklindeki kovalent ya da iyonik çapraz-bağlı makromoleküler zincirler içerirler ve gözenek boyutları ile karakterize edilirler. Gözenek boyutu makromoleküler bağlantı uzunluğuna eşdeğer olup, 10 ile 100 Å° arasındadır. Genelde, bu tip hidrojellerden protein salımı polimer zincirlerinin yoğun olarak bloklaştığı ağlarından gerçekleşir. Bu durumda, salım prosesi polimer zincirinin hareketliliğine bağlıdır ve aslında protein difüzyonu bir katıdan gerçekleşir. Gözeneksiz bir hidrojel hazırlamak için kullanılan metotlardan biri, denge değeri altındaki çözücü seviyesi ile polimerleştirmedir. Gözeneksiz membranlar bir bariyer gibi çalışırlar, bu nedenle protein salımı cihazın başka bir kısmında gerçekleşir.

Mikrogözenekli hidrojeller; makromoleküler bağlantı uzunluğundan daha büyük gözenekler içermektedir. Gözenekler genellikle su ile doludur ve karakteristik boyutları ortalama gözenek yarıçapı (r_p) ile tanımlanır. Protein salımı, suyun gözeneklerden geçerek beraberinde çözünenin de taşındığı difüzyon ve

konveksiyonun birleşimiyle gerçekleşir. Mikrogözenekli jeller 0.01-0.10 µm arasında gözenek boyutuna sahiptir.

Makrogözenekli hidrojeller ise genellikle 0.1 µm'den büyük çaplarda, büyük gözeneklere sahiptirler. Kütle aktarım mekanizması, su dolu gözeneklerden difüzyon ve konveksiyon şeklindedir. Gözenekli sistemlerde, protein difüzyonunu tanımlayan salım modelleri klasik hidrodinamik temeline dayanır (Satterfield et al., 1973). Makrogözenekli hidrojeller; denge değerinden fazla miktardaki çözücü ile sentezlenebilir. Bu durumda faz ayrımı çözücü havuzlarını yaratır ve dolayısıyla büyük gözenekler ve kanallar oluşur. Büyük gözenek boyutlarını elde etmek için kullanılan yollardan bir tanesi de polimerizasyonu çözücüsüz gerçekleştirmektir.

Polimerizasyon koşullarının değiştirilmesiyle kontrollü salım sistemlerinde kullanılacak çok sayıda hidrofilik polimer sentezlenmiştir. Bunlardan başlıcaları; poli(2-hidroksietil metakrilat), poli(metil metakrilat), poli(akrilik asit), poliakrilamid, poli(vinil alkol), poli(N-vinil pirolidon), poli(etilen glikol), poli(metakrilik asit), poli(etilen-ko-vinil asetat), polilaktidler, poliglükolidler, poliortoesterler, polianhidritler ve polisakkaritlerdir (Korsmeyer, 1991).

pH-duyarlı hidrojellerin çevresel etkilere cevap verebilme özellikleri, onların protein ve peptidlerin oral salımı için kullanımlarına olanak sağlamaktadır (Torres and Peppas, 1999). Protein yapıdaki ilaçların oral yollu salımında, ilacı mide-bağırsak kanalından geçişi sırasında karşılaştığı pH değişimlerinden korumak için geliştirilen pH-duyarlı sistemler aracılığı ile kolona özgü ilaç salımı sağlanabilmektedir (Gümüşderelioğlu and Kesgin, 2005). Kalın bağırsak, düşük enzim aktivasyonu ve uzun geçiş süresi nedeniyle protein ilaçların absorpsiyonu için uygun bölge olarak değerlendirilmektedir. Ancak ilaç formülasyonlarını içeren taşıyıcı sistemlerinin yalnızca pH-duyarlı hidrojellerden hazırlanması yeterli değildir, çünkü ince bağırsak ve kolonun pH değeri yaklaşık aynıdır. Ancak kolondaki mikroorganizma konsantrasyonu ince bağırsak ve midedekinden 5 kat daha yüksektir ve kolonda salım mikrobiyal enzim aktivitesinin etkisiyle gerçekleşir. Önerilen yöntem; yalnızca kolonda mevcut mikrobiyal enzimler yardımıyla parçalanarak ilacı salabilecek polimerik taşıyıcıların hazırlanmasıdır. Kısacası hem pH-duyarlı ve hem de biyobozunur hidrojellerin sentezi gereklidir (Kesgin, 2002).

Bölgeye-özgü peptid ilaç dağıtımı için; manyetik sistemler, genişleyebilen sistemler, mukoadesiv sistemler ve yakın zamanda geliştirilen bağırsak duvarına mekaniksel olarak tutunabilen sistemler gibi çeşitli yaklaşımlar da kullanılmıştır (Dorkoosh et al., 2001). Mukozal emilimin artırılması için geliştirilen enzim inhibitörleri, mukoadesiv polimerler ve hücreler arası bağlantı bölgelerini açabilecek bileşimler genel adıyla “absorpsiyon arttırıcı” olarak kabul edilmektedir (Luessen et al., 1996). Mukoadesiv sistemler, absorpsiyonun yapıldığı bağırsak epiteli ile yakın temas sağlayabilmesi ve bağırsak kanalında alıkonma süresini arttırması nedeniyle tercih edilmektedir (Junginger, 1990; Lehr, 1994; Bai et al, 1995). Mukoadesiv özelliğe sahip hidrojel salım sistemlerinin geliştirilmesinin ardından, bu sistemlerin in vitro/in vivo mukoadesiv kuvvetlerinin ve etken maddenin biyoyararlanımı üzerindeki etkilerinin incelendiği in vitro ve in vivo çalışmalar yürütülmüştür (Tang et al., 2005; Goto et al., 2006, Yin et al., 2007). Ancak mukoadesyonun tek başına kullanımı, alıkonma süresi ve etken madde emilimini yeterince sağlayamamaktadır (Goto et al., 2006).

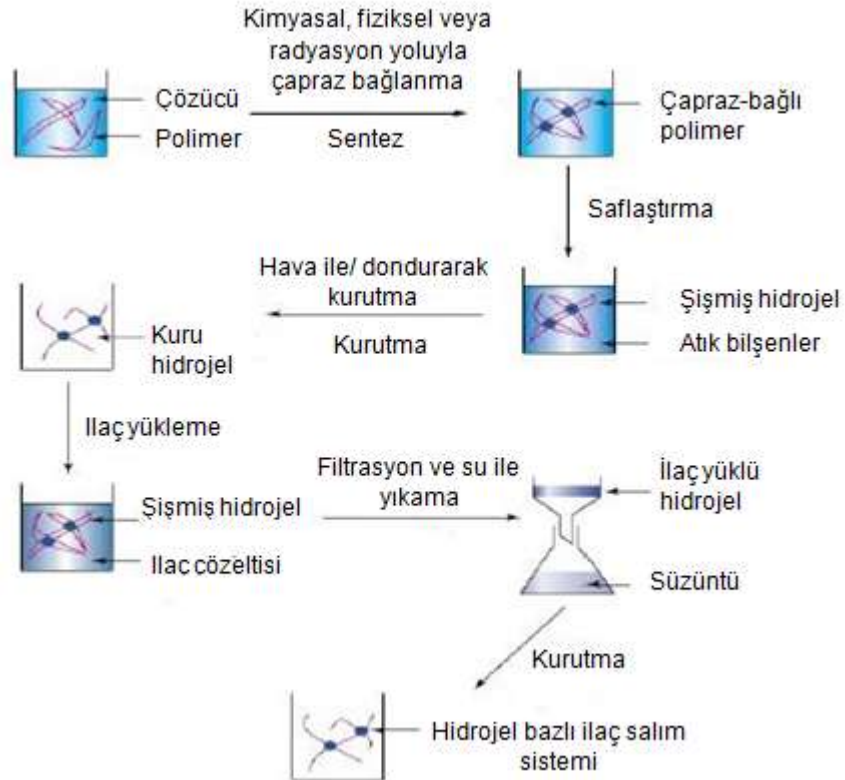
Dorkoosh ve grubu tarafından (2002) yapılan çalışmada, mukoadesiyondan farklı olarak, bağırsak duvarına mekanik olarak tutunabilen ve tutunma sonrası ani salım yapabilen sistemler geliştirilmiş ve bu sistemlerin birkaç protein temelli ilacın (buserelin, octreotid, insülin ve desmopressin) intestinal emilimini arttırdığı gözlenmiştir (Dorkoosh et al., 2002b).

2.5.1.2. Hidrojellere protein yükleme metotları

Vücut içerisine implante ya da enjekte edilebilen, vücut ile biyouyumlu protein yüklü hidrojel taşıma sistemlerinin hazırlanması için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu metotlardan herhangi biri ile yükleme yapılırken; protein yapısının denatürasyona uğramaması, homojen bir dağılımın elde edilmesi, protein yükleme etkinliğinin yüksek olması, yükleme koşullarının ve proses parametrelerinin kontrol edilebilmesi gibi faktörler göz önünde bulundurulmalıdır (Al-Musa et al., 1999). Hidrojellere protein yüklemek için kullanılan yöntemler; elektroforetik yükleme (Shalaby et al., 1993), protein tutuklama (Jeffery et al., 1993), “coacervation” yükleme (Donbrow, 1992), çözelti yükleme (Carelli, 1989) ve ekstrüzyon ve spreyleme yükleme ana başlıkları altında toplanabilir. Bunlardan en yaygın

kullanılanı ve sunulan çalışmada da kullanılan yöntem olması nedeniyle aşağıda çözelti yükleme, diğer adıyla “emdirme” yöntemine değinilmiştir.

Çözelti Yükleme (Emdirme): Hidrojel-bazlı ilaç salım sistemlerinin hazırlanmasında en yaygın kullanılan metottur. Polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra uygun çözücünün kullanımı ile hidrojel içerisine proteinler yüklenebilir. Çözücü seçiminde önemli olan, protein için bir çözünürlük ajanı ve hidrojel için bir şişme ajanı gibi davranabilme yeteneğidir. Hidrojel protein çözeltisine daldırılır, proteinin hidrojel içine girmesi ve ayrışması için gerekli zaman verilir. Denge sağlandıktan sonra, protein yüklü hidrojeller çözeltiden çıkarılır ve yavaşça kurutulur. Bu teknik Carelli (1989) tarafından da belirtildiği gibi çözünürlük limitleri altında yükleme degerleri elde etmek için geniş bir kullanıma sahiptir. Polimer örgüye giriş için gözeneklerin boyutu protein boyutlarından büyük olmalıdır. Diğer bir ifadeyle, baskın proses “adsorpsiyon” olmalıdır. Şekil 2.8’de bu metodun basamakları şematize edilmiştir.



Şekil 2.8. Hidrojel-bazlı ilaç salım sisteminin hazırlanma basamaklarının şematik gösterimi (Gupta et al., 2002).

2.5.1.3. Hidrojellerden protein salımının mekanizması

Kontrollü salım sistemleri salım mekanizmalarına göre difüzyon kontrollü sistemler, biyoaşınır veya biyobozunur sistemler, çözücünün harekete geçirdiği sistemler ve ayarlanabilen sistemler şeklinde sınıflandırılmıştır (Langer, 1990; Langer and Peppas, 1983; Bajpai et al., 2008).

Yüzey aşınabilir sistemlerde, bir polimer zincirine ya da cihazın içine tutuklanan protein, hidrolitik ya da enzimatik bozunmanın polimer yüzeyini aşındırması sonucu sistemden salınır. Salınan protein, daha sonra biyolojik akışkanda çözünür. Biyobozunma yüzeyde olabileceği gibi (yüzey erozyonu), yığın (katı) erozyonu şeklinde de olabilir. Biyobozunur sistemlerin avantajları; implantasyon sonrası cerrahi işlemle uzaklaştırılmalarına gerek olmaması, boyutlarının küçük olması ve daha ucuz olmalarıdır. Ancak parçalanma ürünleri toksik ve kanserojen olmamalıdır (Bajpai et al., 2008). Poli(glikolik asit-ko-D,L-laktik asit) (PGLA) biyobozunur, hidrofilik bir polimerdir ve kontrollü salım uygulamalarında oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir (Jeffery et al., 1993). Bu sistemlerde bozunma, ester bağlarının hidrolize uğramasıyla gerçekleşir. Franssen ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada ise, polisakkarit bazlı hidrojellerden, uzun süreli protein salımı enzimatik bozunma yoluyla gerçekleştirilmiştir (Franssen et al., 1999).

Çözücünün harekete geçirdiği sistemlerde ilaç salımı, “şişme” ve “ozmoz” olmak üzere iki mekanizmayla gerçekleşmektedir. Şişme kontrollü sistemler, çözücünün başlangıçta camsı olan polimerin içine difüzyonu sırasında etken maddenin polimerden dışarı doğru difüzyonu esasına dayanmaktadır (Başbağ, 2010). Başlangıçta susuz olan hidrojeller, biyolojik akışkanla temas ettiği zaman polimer zincirleri gevşeyerek bu tür salım davranışı gösterirler. Ozmotik kontrollü sistemler ise, ilaç içeren bir çekirdek ile çekirdeği saran ve ilacın dışarı doğru çıkmasına imkan veren bir deliği olan yarı geçirgen bir polimer membrandan oluşmaktadır. Bu sistem su veya biyolojik sıvı ile temas ettiğinde, su yarı-geçirgen membranın gözeneklerinden içeri girer ve ilacı çözmeye başlar. İlaç bu membrandan difüzlenemeyeceğinden, oluşan basınç farkı sonucu polimerde bulunan delikten salınır. Bu sistemlerde salım genellikle sıfırıncı derecedendir ve ozmoz olayı ile kontrol edilmektedir (Bajpai et al., 2008).

Ayarlanmış sistemlerde ilaç salımı, sıcaklık, pH, iyonik güç, elektriksel alan ve UV ışığı gibi dış uyarıcılar tarafından kontrol edilmektedir. Bu sistemlerde dış uyarılara cevap verebilen hidrojeller diğer bir deyişle “akıllı polimerler” kullanılmaktadır (Bajpai et al., 2008; Lin and Metters, 2006). Özellikle pH'ya duyarlı hidrojeller oral uygulanan kontrollü salım formülasyonlarında en sık kullanılan polimerlerdir (Qui ve Park., 2003).

Difüzyon kontrollü sistemler protein salımında en yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Bu sistemlerde protein salımı, sulu polimerden konsantrasyon değişiminin neden olduğu difüzyon yoluyla gerçekleşir. Böyle bir taşıma sistemi, konsantrasyon farkının sürücü güç olduğu Fick yasasına göre modellenebilir.

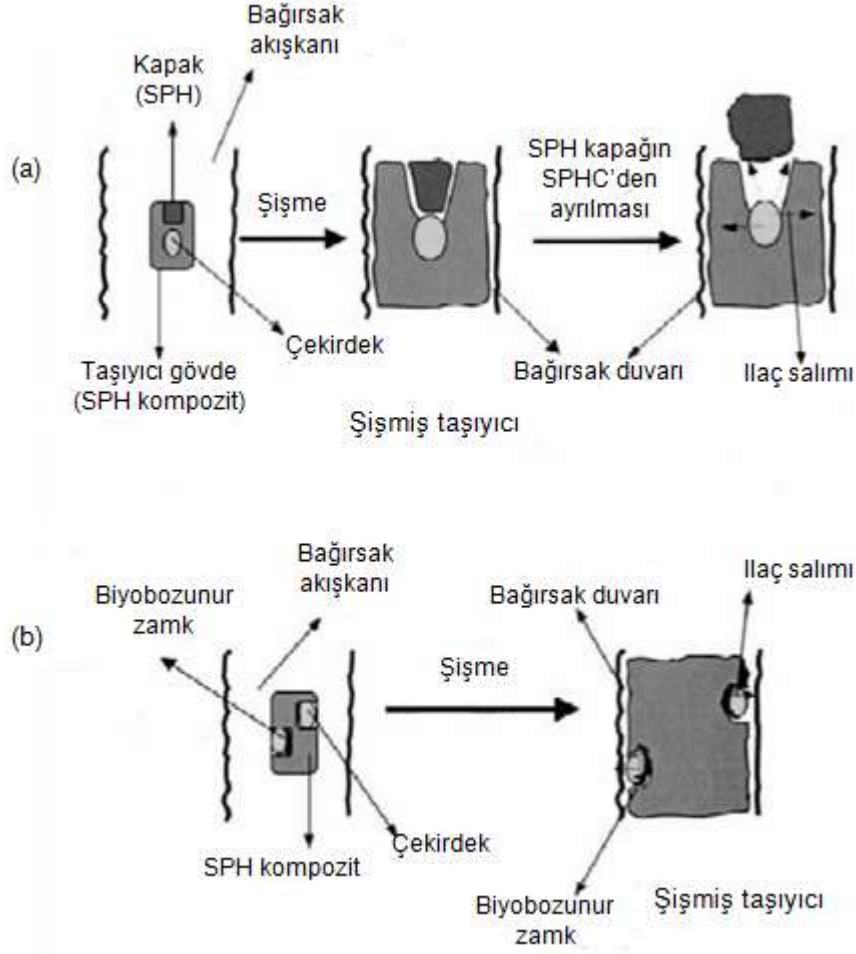
2.5.2. Süpergözenekli hidrojellerin oral protein/peptid ilaç salımındaki kullanımları

Protein ve peptid ilaçların ağız yoluyla alımı için tasarlanan yeni ilaç salım sistemleri ile arttırılmış biyoyararlanım hedeflenmektedir. Bu kategorideki ilaçların etkin dağıtımı için uygun salım sistemlerinin tasarımında dikkat edilecek birkaç önemli konu vardır. Bunlar; bölgeye özgü ilaç salımı ile tedavi edici dozlarda tahmin edilebilir ve tekrarlanabilir absorpsiyonun sağlanması, zayıf biyoyararlanımın geliştirilmesi ve istenilen tedavi edici etkinin sağlanabilmesi için mukozadan geçişin ve metabolik bariyerlerin aşılmasıdır (Dorkoosh, 2001). Protein ve peptid gibi moleküller gastro-intestinal yolla uygulandıklarında, büyük molekül ağırlıkları epitel dokudan geçişlerini zorlaştırır. Bu nedenle, protein ve peptid yapısındaki moleküllerin mukozadan geçişi (emilimi) epitel dokunun hücre arası bağlantı bölgelerinden (paracelluler pathways) sağlanmaktadır (Bai et al., 1995). Peptid ve protein moleküllerin çoğu, gastro-intestinal bölgedeki enzim aktivitesi nedeniyle yüksek kararsızlık göstermektedir (Fix, 1996). Oral yolla uygulanacak peptid ve protein salım sistemlerinin geliştirilmesinde; enzim inhibisyonu, hücresel sıkı bağlantı bölgeleri'nin (tight junction) açılması ve ilacın bağırsak absorpsiyon bölgelerine hedeflenmesinde dikkate alınması gereken diğer konulardır (Dorkoosh et al., 2001).

Çeşitli peptid ve protein ilaçların ağız yoluyla alımında, salım sistemi olarak süpergözenekli hidrojeller (SPH) kullanılabilir. Yakın zamana kadar protein yapıdaki ilaçlar, çabuk denatüre olan yapıları nedeniyle damar, kas ve deri altı

enjeksiyonu gibi klasik yöntemlerle vücuda verilmekteydi ve süpergözenekli hidrojel uygulamalarına dek, ağız yoluyla verilememekteydi. İlk defa Prof. Hans E. Junginger (2001), süpergözenekli hidrojelere kullanarak oral peptid salım sistemleri geliştirmeye çalışmıştır (Park,2004). Kendi yaklaşımıyla, süpergözenekli hidrojelere (SPH) ve süpergözenekli hidrojel kompozitleri (SPHC) kullanmıştır. Süpergözenekli hidrojel ve kompozitleri, yüksek gözeneklilik ve değiştirilebilir şişme oranı, kolay ve yüksek miktarda ilaç yükleme kapasiteleri ve mekanik açıdan yüksek dayanıklılık gibi özellikleri nedeniyle, peptid ve proteinlerin oral yollu alımında uygun taşıyıcı sistem olarak düşünülmüştür. Tasarlanan salım sistemi uygun formülasyondaki model ilacı içeren bir çekirdek kısmı (partikül ya da tablet formülasyonu) ve bu çekirdeği taşıyan süpergözenekli hidrojel ve süpergözenekli kompozit hidrojel bileşenlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.9). İlaç içeren çekirdek (partikül ya da tablet formülasyonu), taşıyıcı gövdenin (SPHC) merkezine (A) veya yüzeyine (B) yerleştirilerek iki farklı formülasyon hazırlanmıştır. Çekirdek formülasyonunun taşıyıcı gövde içerisine yerleştirildiği sistemde, taşıyıcı gövde olarak mekanik açıdan daha dayanıklı olan SPH kompozit seçilmiştir. Gövde uygun şekilde oyularak, bu parça çıkartılmış ve ilaç içeren mikropartiküller açılan merkeze yerleştirilmiştir. Gövdede açılan bu delik, daha yüksek şişme oranına sahip olan SPH kapak ile kapatılarak ilacın merkezde kalması sağlanmıştır. SPH kompozite göre daha yüksek şişme hızı ve oranına sahip olan SPH kapak, salım ortamında daha hızlı ve yüksek oranda şişerek gövdeden ayrılacak ve böylelikle peptid ilaçların salımında istenilen “patlayan salım profili” elde edilebilecektir.

Çekirdek formülasyonunun taşıyıcı gövde üzerine yerleştirildiği sistemde, taşıyıcı gövdenin (SPHC) her iki yüzeyine ilaç taşıyan mini tabletlerin yerleştirileceği delikler açılmış ve mini tabletler biyobozunur bir zambak yardımıyla bu deliklere yerleştirilmiştir. Biyobozunur zambak yardımı ile mini tabletler gövde şiştikten sonra delikler içerisinde tutulmuş ve böylece tabletlerin absorpsiyonun yapıldığı bağırsak epiteli ile temasta bulunması sağlanmıştır.

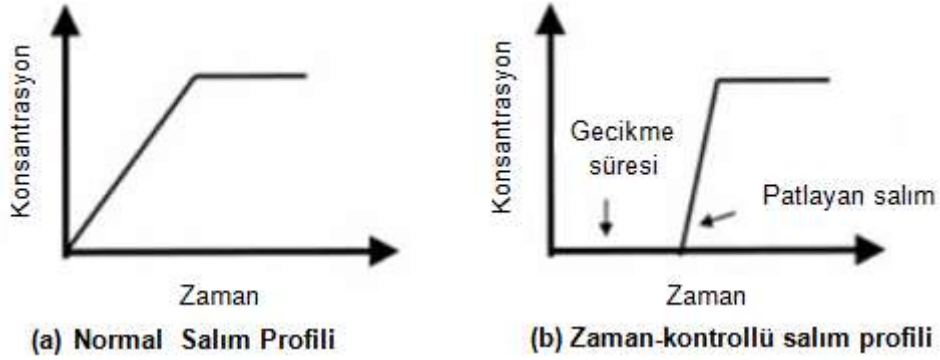


Şekil 2.9. SPHC-SPH bazlı yeni oral peptid ilaç salım sisteminin çalışma mekanizmasının şematik gösterimi (a) Taşıyıcı gövde içerisinde yerleştirilen çekirdek formülasyonu (b) Taşıyıcı gövde üzerine yerleştirilen çekirdek formülasyonu (Dorkoosh et al., 2001).

SPH ve SPH kompozitten oluşan bu yeni oral peptid salım sistemleri, bağırsak akışkanı içerisinde yüksek miktarda şişmiş ve taşıyıcı (SPHC) gövdenin hacmi yüksek miktarda artmıştır. Bu hacim artışı SPH kompozitin bağırsak duvarına mekanik olarak yapışmasına izin vererek çekirdek formülasyonu içerisindeki ilacın doğrudan bağırsak çeperine salınmasını sağlamıştır (Şekil 2.9). Peptid ilaçları salınıp, bağırsak çeperi tarafından emildikten sonra, süpergözenekli hidrojeller, fazladan su alarak bağırsak hareketleriyle parçalanır ve kolayca uzaklaştırılırlar (Dorkoosh et al., 2001; 2002a; 2002b).

Geliştirilmiş bu yeni sistemlerde, peptid ve protein ilaçların emilimi için gerekli zaman kontrollü salım profilinin elde edilmesi mümkündür. Normal bir dozaj formuna ait salım profilinde salım sıfırından itibaren başlamaktadır. Bu durum,

bağırsak akışkanı içerisinde dozaj formundan ilaç salımının hemen başladığına işaret eder. Peptidler ve proteinler gibi hidrofilik yapıdaki makromoleküllerin etkin emilimi için proteolitik bağırsak enzimlerinin inaktif olması ve tight junction'ların açılması için 20-30 dakikalık bir gecikme süresine ihtiyaç vardır. Takibinde ise kısa bir zaman periyodunda dozaj formundan peptid ya da proteinin tamamen salınabilmesi için patlayan salım gereklidir. Bu tip salım profili zaman-kontrollü salım profili olarak adlandırılır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Normal (a) ve zaman-kontrollü (b) ilaç salım profillerinin şematik gösterimi (Dorkoosh et al., 2001).

Geliştirilen peptid taşıma sistemlerinin kullanıldığı in vivo domuz deneylerinde, ostreotid peptidine ait mutlak biyoyarlanımın %8 ile %16 arasında olduğu belirlenmiştir (Dorkoosh et al., 2002c). Ayrıca bu taşıma sistemleri ile gönüllü denekler üzerinde yapılan yeni bir γ -sintigrafik çalışma; SPH ve SPHC polimerlerden hazırlanan bu sistemlerinin, sahip oldukları kimyasal tutunma özelliklerine bağlı olarak bağırsak bölgesindeki alıkonma süresini en az bir saat arttırdıklarını ve kullanımlarının güvenli olduğunu göstermiştir (Dorkoosh et al., 2004).

Polnok ve grubu (2004) tarafından yürütülen bir çalışmada, peptid bazlı bir ilaç olan desmopressinin, akrilamid bazlı SPH ve kompozit ajan varlığında üretilen kompozit SPH sistemler aracılığı ile domuz bağırsak epitel dokusundan in vitro emiliminin artırılması hedeflenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Polnok et al., 2004).

Ancak süpergözenekli hidrojel ve süpergözenekli kompozit hidrojel stres altında oldukça kırılgandır, bu nedenle protein ilaçların oral yollu salımında taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi için mekanik özellikleri geliştirilmelidir.

2.6. Şişme ve Salım Kinetiğinin Matematiksel Analizi

Kontrollü salım sistemlerinde, çözücünün polimerik matrise difüzyonu ve ardından ilaç salımının gerçekleşme prosesine ait mekanizmayı açıklayabilmek için pek çok matematiksel model geliştirilmiştir. Modellerin büyük çoğunluğu, sistem parametrelerinin (polimer, ilaç, çözücü) özelliklerinden faydalanılarak, karmaşık diferansiyel denklemler yardımıyla türetilmiştir (Lustig and Peppas, 1987).

2.6.1. Şişme kinetiği

Polimerik ve kopolimerik yapıların şişme kinetiği ve difüzyon türünün açıklanmasında kullanılan en temel yasalar Fick yasalarıdır (Peppas and Franson, 1983; Ende and Peppas, 1996; Peppas and Ende, 1997). Polimerlerin dinamik şişme özellikleri; çözücü absorpsiyon hızını, denge şişmesine yaklaşım hızını ve çözücü ilerleme hızını kontrol eden transport mekanizmasını içermektedir. Çözücü absorpsiyon hızı birim zamanda yapıya giren çözücü gösterir ve doğrudan polimerin denge şişme derecesiyle bağlantılıdır. Dengeye yaklaşım hızı, Fickian transport mekanizması olması durumunda, difüzyon katsayısıyla karakterize edilebilir. İçteki şişmemiş camsı kısmı, dıştaki şişmiş kauçuğumsu kısımdan ayıran çözücü ilerleme hızı (solvent front velocity), ilaç salım uygulamalarında ve transport mekanizmasının karakterizasyonunda önemlidir (Hennink et al., 1997).

Peppas (1985), bir polimerin şişmesini zamana bağlılığını en basit anlamda “güç kanunu modeli” (power law model) ile tanımlamıştır. Difüzyon ve gevşemenin birbirine göre önemini belirten transport mekanizması, absorpsiyon verilerinin ($M_t/M_\infty \leq 0.6$ durumunda veya çok kısa bir süre için) güç kanunu modeline uydurulmasıyla Eş. 2.1 yardımıyla hesaplanabilir.

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad (2.1)$$

Bu denklemde M_t / M_∞ , polimer içine hareket eden çözücünün dengedeki koşullara göre normalize edilmiş halini ifade eder. M_t ve M_∞ sırasıyla t anında ve dengede ($t=\infty$) absorplanan veya desorplanan küttedir, n ve k ise difüzyon katsayıları ve

transport mekanizması ile ilişkilendirilebilen sabitler olup sırasıyla difüzyon üsteli ve orantı sabiti olarak adlandırılır (Brazel and Peppas, 2000). Eş. 2.1 çözücünün polimerdeki genel transport davranışını tanımlamak için kullanılır ve n değerlerine bağlı olarak difüzyon mekanizmasının türünü açıklar.

Film halindeki bir materyal için; n=0.5 değeri Fickian difüzyonu, n=1.0 değeri Case II (gevşeme kontrollü) transportu, bu değerler arasındaki n değerleri ise Non-Fickian (anomali) transportu gösterir. n>1 ise Süper Case II transportu tanımlar. Farklı maddelerin absorpsiyon ve desorpsiyon hızlarını karşılaştırmada kullanılan bu eşitliğin kullanımındaki zorluk; k değerinin n değerine bağlı olmasıdır. Bundan dolayı, yalnızca aynı n değerine sahip maddeler için direkt olarak k değerlerinin karşılaştırılması mümkündür. Silindirik şekildeki bir malzeme için; n=0.45-0.50 değerleri Fickian difüzyonu, 0.50<n<1 non-Fickian difüzyonu gösterir (Kesgin, 2002).

Bazı araştırmacılar; jelin denge kütlesi veya hacminin belirli yüzdesine ulaşmak için gerekli olan süre üzerinde dururlar. Ancak bu yanıltıcı olabilir, çünkü bazı örnekler başlangıçta hızlı bir hacim değişimi ve denge değerine giderken yavaş bir ilerleme gösterirken, bazıları uniform bir hızda ilerler. Ayrıca denge süresi, kalınlığa çok bağlıdır. Gerçekte difüzyon kontrollü bir proses için denge süresi, karakteristik difüzyonel uzaklığın karesiyle değişir.

Bununla birlikte; kauçuğumsu polimerik jellerin ve uyarı-cevap polimerik jellerin şişmesi veya büzüşmesi genelde basit difüzyon-kontrollü prosesle olur. Bu durumda sistemin kinetiği tek bir parametre (difüzyon katsayısı) ile karakterize edilebilir. Düzlemsel geometri için difüzyon katsayısı D, uygun sınır koşulları Fick yasasına uygulanarak Eş. 2.2'ye göre hesaplanabilir (Kabra et al., 1991).

$$M_t/M_\infty = 1 - \sum_{n=0}^{\infty} [8/(2n+1)^2 \pi^2] \times \exp[-(2n+1)^2 \pi^2 (Dt/L^2)] \quad (2.2)$$

Burada; L, tabakanın başlangıçtaki kalınlığıdır. Difüzyon katsayısının, jel içindeki pozisyondan ve konsantrasyondan bağımsız olduğu, yüzey konsantrasyonunun anlık olarak denge değerine ulaştığı ve difüzyif olmayan akışkanların (konveksiyon gibi) ve hız sınırlayıcı basamakların (ısı transferi gibi) olmadığı kabul edilir. Bu formülün geliştirilmesinde kullanılan kabullerin geçersizliği durumunda eşitlikten

sapmalar olabilir. Bununla birlikte; özellikle sapmalar çok büyük değilse, en iyi yaklaşımla bulunmuş D , çok farklı jel örneklerin hacim değişim kinetiğinin karşılaştırılmasında kullanılabilir. Net karşılaştırma yapabilmek için en iyi yöntem kinetik veri elde etmektir, ancak pratikte bu mümkün olmaz. Kısa zaman yaklaşımı yapılarak (2.2) no'lu eşitlik düzlemsel geometri için, Eş. 2.3 ile ifade edilebilir.

$$M_t / M_\infty = 4[Dt/\pi L^2]^{1/2} \quad (2.3)$$

Difüzyon katsayısı D , uygun sınır koşulları Fick yasasına uygulanarak, Eş. 2.4'e göre silindirik geometri için de hesaplanabilir (Polishchuck et al., 1993).

$$M_t / M_\infty = 4[Dt/\pi L^2]^{1/2} - \pi[Dt/\pi r^2] - \pi/3[Dt/\pi r^2]^{3/2} + \dots \quad (2.4)$$

Bu denklemde, D difüzyon katsayısı (m^2/s), t zaman (s) ve r silindirik polimer örneğin yarıçapıdır (m). Eş. 2.1 ile Eş. 2.4 grafiksel olarak karşılaştırıldığında, $n=0.50$ ve $k= 4[D/\pi r^2]^{1/2}$ olduğu (2.1) no'lu yarı ampirik eşitliği gösterir.

M_t/M_∞ değerleri $t^{1/2}$ değerlerine karşı grafiğe geçirilerek, eğimden (k) D değeri hesaplanabilir.

SPH'lerin şişme kinetikleri, geleneksel (gözeneksiz, mikrogözenekli ve makrogözenekli) hidrojellere göre çok hızlıdır. Geleneksel hidrojellerin şişme sonrası dengeye gelmesi için saatler hatta günler gerekirken, SPH'ler, kapiler gözenek yapıları saniyeler içerisinde dengeye gelmektedir. Şişmedeki bu fark, iki tip hidrojelin morfolojik yapısıyla açıklanmaktadır. Geleneksel hidrojellerin küçük (~ 10 nm) ve çoğunlukla kapalı ağ yapıları kütle transferini kısıtlamaktadır. SPH'ler ise, çok büyük çapta gözeneklere ve yüzeyini kapiler etkilerle suyun girişine uygun hale getiren birbiriyle bağlantılı kapiler kanallara sahiptir. Eşitlik 2.5'te sıvının hidrojel içerisine alım hızı $\partial l/\partial t$, kapilerin çapı d , sıvının yüzey gerilimi γ_l , hidrojel ve sıvı arasındaki temas açısı θ ve çözeltinin viskozitesi η ile ilişkilidir.

$$\frac{\partial l}{\partial t} = \frac{d\gamma_l \cos\theta}{8\eta l} \quad (2.5)$$

Kapiler yükselme difüzyondan çok daha hızlıdır. Dar bir kapiler (~ 100 μm) içerisinde 1 cm'lik sıvı yükselişi için gereken süre milisaniyeler mertebesindedir. Kapiler yükselişten sonra gözeneklerden polimer ağı içerisine difüzyon gerçekleşir.

Akışkanın difüzyonu geleneksel hidrojeldeki gibi gerçekleşmektedir fakat toplam hidrojel hacmi içerisinde polimer ağı hacmi göreceli olarak küçük olduğundan, difüzyon mesafesi geleneksel hidrojelere göre daha kısadır (Gemeinhart et al., 2000; Gemeinhart and Guo, 2004).

2.6.2. Salım kinetiği

İlaç salımının, hidrojel matrise çözücü moleküllerinin girişi ve ardından matrisin şişmesiyle kontrol edildiği sistemlere “şişme kontrollü sistemler” denir. Bu sistemlerde, ilaç başlangıçta camsı polimerde çözünür veya dağıtılır. Biyolojik akışkanla temas haline geldiğinde ise, polimer matris şişmeye başlar ve polimerde iki ayrı faz gözlenir. İlaç molekülleri polimerin kauçuğumsu fazından dışarı difüze olabilirler, polimerin camsı kısmından ise dışarı ilaç difüze olmaz. Bu nedenle; ilaç salımı camsı-kauçuğumsu ara yüzeyin hızı ve pozisyonuyla kontrol edilir. Camsı-kauçuğumsu ara yüzeyde ilaç salımını önemli ölçüde etkileyen makromoleküler gevşeme olayı meydana gelir. Deneysel verilerin (2.1) no’lu güç kanunun eşitliğine uydurulmasıyla, makromoleküler gevşemenin ilaç salım mekanizması üzerindeki bağıl etkisi kolayca tayin edilebilir (Peppas et al., 2000). Ancak bu eşitlik, salınan toplam ilaç miktarının ilk %60’ı için uygulanabilir. Burada M_t ve M_∞ , sırasıyla t anında ve dengede salınan ilaç miktarını, k bir oran sabitini ve n difüzyonel üsteli gösterir (Peppas et al., 2000). Ritger ve Peppas, n katsayısına dayanarak, Fickian ve non-Fickian davranışını incelemişler ve farklı geometrik şekillerdeki polimerik sistemlerden salım için modeller geliştirmişlerdir (Ritger ve Peppas, 1987).

Şişme kontrollü ilaç salım sistemlerinde çözünenin salım davranışı, Case I (Fick yasasına uyan difüzyon) ve Case II transport için sırasıyla “difüzyon katsayısı” ve “karakteristik gevşeme sabiti” gibi tek bir parametre ile tanımlanabilir. Fick yasasına uymayan davranışı tanımlamak için ise difüzyon ve gevşeme olaylarını içeren bir veya daha fazla parametre gerekebilir (İmren, 2003).

İnce Polimerik Filmden Fick Yasasına Uyan İlaç Salımı:

Orta derecede şişen ince polimerik filmlerden salım için daha önce de bahsedilen Eş. 2.2 ve kısa zaman yaklaşımı uygulanmış Eş. 2.3 kullanılabilir. Burada, M_t/M_∞

salınan ilaç kesrini, D difüzyon katsayısını, L başlangıçtaki film kalınlığını ve t salım zamanını gösterir.

İnce Polimerik Filmden Case II İlaç Salımı:

Case II transportunun analizini yapmak için A kesit alanına sahip ve L kalınlığında bir filmde Case II transport salım olduğunu düşünelim. İlerleyen kısmın (advancing front) pozisyonu X olduğunda, $X \leq x \leq L/2$ ile tanımlanan şişmiş bölgede, ilaç konsantrasyonunda doğrusal bir değişim vardır. $0 \leq x \leq X$ ile tanımlanan camsı bölgede ise ilaç difüzyonu olmaz. Salım kinetiğinin, ilerleyen kısımda gerçekleşen hız sınırlayıcı gevşeme olayıyla kontrol edildiği kabul edilir. k_0 , Case II gevşeme sabiti olarak düşünülürse, salımı tanımlayan birinci derece kinetik ifadesi (2.6) no'lu eşitlikle tanımlanır.

$$dM_t/dt = k_0A \quad (2.6)$$

Herhangi bir t anında V hacmindeki ($V=A(L/2 - X)$) şişmiş bölgeden salınan ilaç miktarı (M_t) (2.7) no'lu eşitlikten bulunur.

$$M_t = C_0A[L/2 - X] \quad (2.7)$$

M_t eşitliği kinetik ifade de yerine konulursa, Eş. 2.8 elde edilir.

$$dX/dt = -k_0/C_0 \quad (2.8)$$

Eş. 2.8, X için çözümlenip Eş. 2.7'da yerine konulursa (2.9) no'lu eşitlik elde edilir.

$$M_t / M_\infty = 1 - [1 - (k_0t/C_0a)]^N \quad (2.9)$$

Eş. 2.9 aşağıdaki şekilde yazılabilir:

$$M_t = [2C_0A/L] * [2k_0t/C_0L] \quad (2.10)$$

$2C_0A/L$, uzun sürede salımı gösterir. Eş. 2.10 sadece $t=C_0L/2k_0$ değerinin üstündeki değerlere uygulanır; bu sürede M_∞ değerinde keskin bir değişim gözlenir. Bu yüzden (2.10) no'lu eşitlik aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$M_t / M_\infty = 2k_0 t / C_0 L \quad (2.11)$$

(2.11) no'lu esitlikten de anlasilacagi gibi, ince bir polimerik filmde Case II ilaç salımı, ilaç salımının zamana dogrusal bagımlılığıyla karakterize edilebilir. Düzlemsel geometri için Case II özümü, M_t/M_∞ 'un boyutsuz zaman, τ 'ya ($\tau=2k_0t/C_0L$) karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Bu model diğer geometriler için genelleştirilirse Eş. 2.12 ifadesi elde edilir.

$$M_t / M_\infty = 1 - [1 - (k_0 t / C_0 a')^N] \quad (2.12)$$

Burada; a' , örneğin difüzyonel uzunluğu olup, küresel ve silindirik örnekler için yarıçapa, düzlemsel geometriler için filmin yarı kalınlığına eşittir. N üsteli, örnek geometrisine göre belirlenir. Film, silindirik ve küresel örnekler için sırasıyla 1, 2 ve 3 değerini alır (İmren, 2003).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile ilgili detaylı bilgi sunulmuştur. İlk olarak, çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler özetlenmiştir. Sonrasında, p(HEMA)-bazlı SPH'lerin sentez yöntemleri anlatılmıştır. Takip eden bölümde, dinamik şişme deneyleri ve hidrojellerin yapısal karakterizasyonu amacıyla yürütülen (SEM, FTIR, TGA, mekanik dayanım ve yoğunluk analizi) çalışmalar açıklanmıştır. Son olarak, p(HEMA)-bazlı SPH'lere sığır serum albümin (BSA) ve fibrinojen (FG) proteinlerinin yüklenmesi ve salımı ile ilgili in vitro çalışmalar detaylı olarak anlatılmıştır.

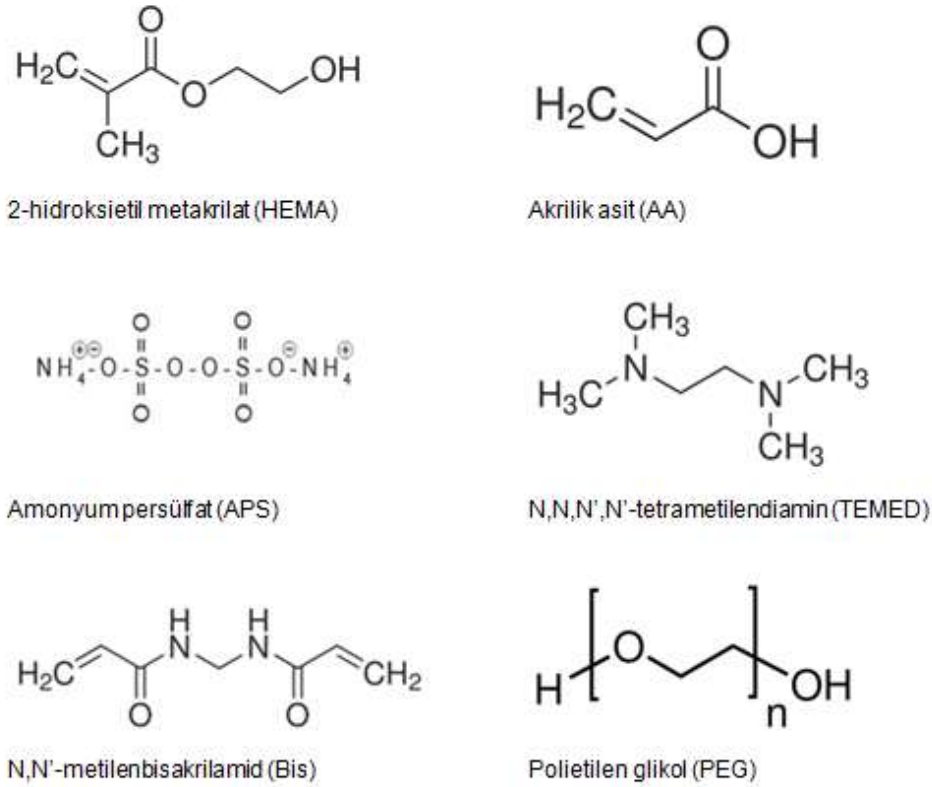
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında geliştirilen hidrojellerin sentezinde monomer olarak, Sigma (Almanya) firmasından temin edilen 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve Acros Organics Firmasından temin edilen akrilik asit (AA, %99) kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan N,N'-metilenbisakrilamid (Bis), köpük stabilizatörü olarak kullanılan Pluronik F127 (PF127), polimerizasyon başlatıcısı amonyum persülfat (APS), başlatıcı katalizleyici N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED) ve köpükleştirici ajan sodyum bikarbonat (NaHCO_3) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Gözenek oluşturucu ajan olarak kullanılan polietilen glikol (PEG 600) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Hazırlanan homopolimerleri IPN formuna getirmek amacıyla kullanılan domuz derisinden elde edilen jelatin (tip A) ve çapraz bağlayıcı ajan gliserol fosfat disodyum hidrat tuzu (GP) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Şişme çalışmalarında kullanılan yapay mide ortamının (SIF, pH:2) bileşenleri olarak sodyum klorür (NaCl) ve hidroklorik asit (HCL, %37) Merck (Almanya) firmasından, yapay bağırsak ortamını (SGF, pH:7) hazırlamak için kullanılan potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) Riedel (Almanya) firmasından, sodyum hidroksit (NaOH) pelletleri ise Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Yoğunluk tayininde kullanılan n-hekzan ise Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

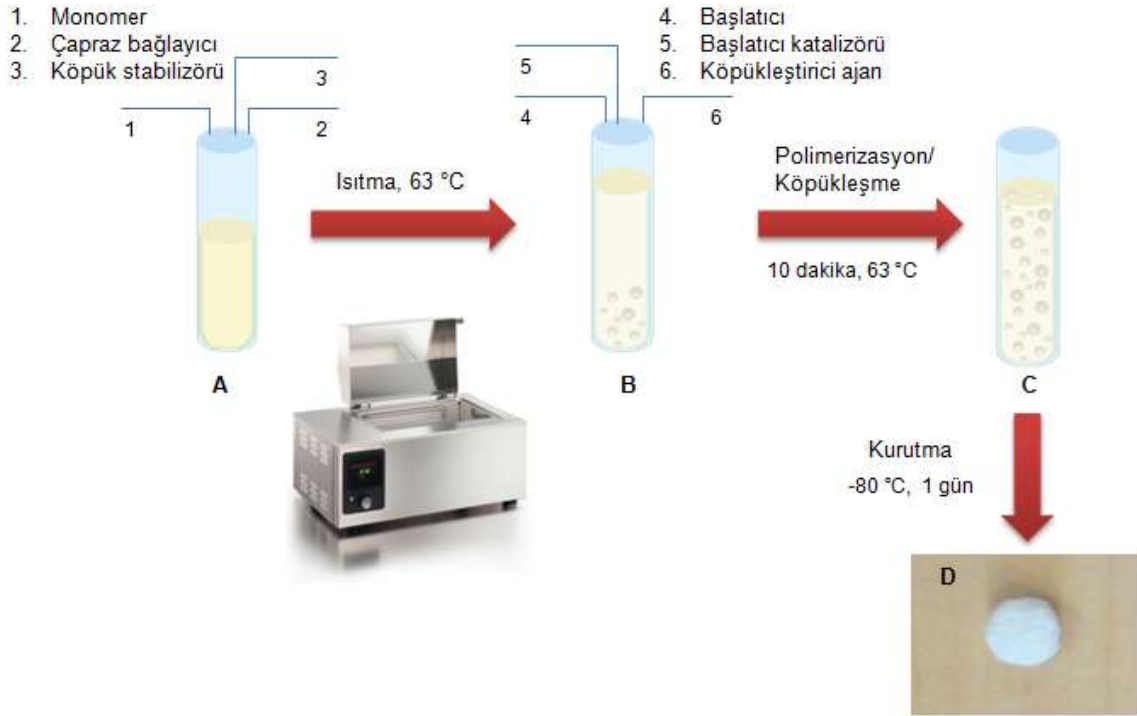
Model protein ilaçlar olarak, Sığır Serum Albümin (BSA; MA=65 000, Fraction V, Sigma) ve Fibrinojen (FG; MA: 340 000, Type I-S, Sigma) kullanılmıştır. SIF içerisinde yürütülen protein salım deneyleri sırasında mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla salım ortamına, Sigma firmasından temin edilen sodyum azid (NaN_3 , %0.09 w/v) eklenmiştir. HPLC analizinde kullanılan asetonitril (HPLC saflıkta) Sigma (Almanya), triflora asetik asit Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin sentezinde kullanılan bazı maddelerin kimyasal yapıları Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bazı maddelerin kimyasal yapıları.

3.2. p(HEMA)-bazlı SPH'lerin Üretimi

Sunulan tez çalışması kapsamında gaz köpükleştirme prosesi ile eş zamanlı olarak yürütülen serbest radikalik polimerizasyon sonucunda p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN yapıların sentezi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'de, örnek olarak p(HEMA) SPH'inin gaz köpükleştirme yöntemi ile sentezi şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. p(HEMA) SPH'ine ait sentez basamakları: Monomer karışımı (A) hazırlandıktan sonra polimerizasyonun başlaması ve karbondioksit baloncukları oluşturmak üzere NaHCO_3 eklenir (B). Köpük kararlı olduğunda polimerizasyon tamamlanır (C). Uygun işlem basamaklarından sonra (Bölüm 3.2.1) disk şeklindeki, süpergözenekli hidrojel elde edilir (D).

Hidrojellerin sentezi için, monomer, çapraz bağlayıcı (Bis) ve köpük stabilizatöründen (PF 127) oluşan karışım su banyosu içerisinde 63°C 'ye ulaşıldıktan sonra, başlatıcı (APS) ve başlatıcı katalizörü (TEMED) bu karışıma eklenmiştir. Sonrasında, karbondioksit baloncukları oluşturmak üzere reaksiyon ortamına köpükleştirici ajan olan NaHCO_3 eklenmiştir. Köpük kararlı hale geldiğinde polimerizasyon tamamlanmış ve sentezlenen polimer deney tüpünden çıkarılmıştır. Bu yöntemle;

- p(HEMA) SPH,
- p(HEMA)-jelatin SPH,
- p(HEMA)-jelatin SPH-IPN,
- p(HEMA)-PEG SPH,
- p(HEMA-ko-AA) SPH,
- p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH

yapıları sentezlenmiştir. Hazırlanan bu 6 farklı hidrojel yapının sentezi aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.2.1. p(HEMA) SPH'lerin üretimi

p(HEMA) SPH sentezi için; sırasıyla 750 µL monomer (HEMA), 50, 100 ve 200 µL olmak üzere üç farklı miktarda %2.5'lük Bis ve 100 µL %10'luk PF 127'den oluşan karışım Pyrex® cam deney tüpüne (12x100 mm boyutlarında) eklenerek, oluşan karışım tüp karıştırıcıda (Heidolph REAX top, Almanya) iyice karıştırılmıştır. Tüplerin ağzı Parafilm ile kapatılarak 63°C'deki su banyosuna konmuştur. Karışım su banyosu içerisinde 63°C'ye (~10 dk.) ulaştıktan sonra sırasıyla 50 µL % 10'luk APS ve 50 µL %10'luk TEMED, polimerizasyon ortamına eklenmiştir. Son olarak 20 s içerisinde belirli miktarda köpükleştirici ajan NaHCO₃ eklenmiş ve yapı içerisinde homojen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla tüp karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra ağızları kapatılarak tekrar 63°C'deki su banyosuna konulmuştur. Böylece, polimerizasyon gerçekleşirken, bir yandan da gaz köpükleştirme yöntemi ile yapı içerisinde gözeneklerin oluşması sağlanmış ve yaklaşık 10 dk. içerisinde SPH'lerin üretimi tamamlanmıştır. İstenilen özelliklere sahip en uygun hidrojin sentezlenmesi için ayrıca, NaHCO₃'ün monomer karışımına eklenme zamanının da (20 s içerisinde veya 80.s) hidrojel yapısına olan etkisi incelenmiştir. Polimerizasyon sonrasında silindir formundaki hidrojeller, deney tüpünden çıkarılmış ve saf suda şişirilerek yapılarındaki reaksiyona girmemiş monomerin ve diğer safsızlıkların uzaklaşması sağlanmıştır. Saf sudan alınan örnekler, kurutulmadan önce bir bisturi yardımıyla dilimlenerek, aynı boyutlara sahip SPH diskler elde edilmiştir (çap:12 mm, kalınlık:4 mm). Son olarak, gözeneklerinin vakum altında çökmesini önlemek için öncelikle -20°C'de 2-3 saat bekletilerek dondurulan disk formundaki hidrojeller dondurarak-kurutma cihazında (Christ, Almanya) -80°C'de tamamen kurumaları için 1 gün boyunca liyofilize edilmiştir (Şekil 3.2).

3.2.2. p(HEMA)-jelatin SPH'lerin üretimi

Yarı IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH'lerin sentezi için uygun değerleri belirlemek amacıyla jelatin ve çapraz bağlayıcı miktarları değiştirilmiştir. Sırasıyla 750 µL HEMA, 50,100 ve 200 µL olmak üzere üç farklı miktarda %2.5'lük Bis, 100 µL %10'luk PF 127 ile 450 ve 750 µL olmak üzere iki farklı miktarda %10'luk jelatin

deney tüpüne eklenmiştir. Oluşan bu karışım iyice karıştırıldıktan sonra ağzı kapalı bir Şekilde 63°C'deki su banyosuna konmuştur. Karışım bu sıcaklığa ulaştıktan sonra polimerizasyon ortamına 50 µL %20'lik APS ve 50 µL %20'lik TEMED eklenmiştir. Son olarak, 20 sn. içerisinde NaHCO₃ eklenmiş ve yapı içerisinde homojen dağılması için deney tüpü iyice karıştırılmıştır. Sonraki işlemler p(HEMA) SPH'lerin sentezinde anlatıldığı Şekilde yürütülmüştür.

3.2.3. p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin  retimi

Tam IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin sentezi için optimum değerleri belirlemek amacıyla jelatin miktarı farklı iki sentez gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla, 750 µL HEMA, 100 µL %2.5'luk Bis, 100 µL %10'luk PF 127 ile 450 ve 750 µL olmak üzere iki farklı miktarda %10'luk jelatin deney tüpüne eklenmiştir. Hazırlanan karışım iyice karıştırıldıktan sonra ağzı kapatılarak 63°C'deki su banyosuna konmuştur. Karışım bu sıcaklığa ulaştıktan sonra, reaksiyon ortamına sırasıyla 78.8 µL %50'lik GP, 50 µL %20'lik APS ve 50 µL %20'lik TEMED eklenmiştir. Son olarak, 20 sn. içerisinde NaHCO₃ eklenmiş ve yapı içerisinde homojen bir Şekilde dağılması için iyice karıştırılmıştır. Sonrasında, p(HEMA) SPH sentezinde anlatılan işlemler uygulanmıştır.

3.2.4. p(HEMA)-PEG SPH'lerin üretimi

p(HEMA)-PEG SPH'lerin sentezi için optimum değerleri belirlemek amacıyla köpük oluşturucu PEG miktarları farklı iki SPH  retilmiŐtir. Sırasıyla, 750 µL HEMA, 100 µL %2.5'luk Bis, 100 µL %10'luk PF 127 ile 500 ve 750 µL olmak üzere iki farklı miktarda PEG deney tüpüne eklenmiştir. Hazırlanan karışım iyice karıştırıldıktan sonra ağzı kapatılarak 63°C'deki su banyosuna konmuştur. Karışım su banyosu içerisinde bu sıcaklığa ulaştıktan sonra, reaksiyon ortamına sırasıyla 50 µL %20'lik APS ve 50 µL %20'lik TEMED eklenmiştir. Son olarak, 80.sn.'de NaHCO₃ eklenmiş ve yapı içerisinde homojen bir Şekilde dağılması için iyice karıştırılmıştır. Polimerizasyon sonrasında deney tüpünden çıkarılan hidrojeller yapıdaki PEG' n uzaklaşması için 4 gün boyunca saf suda bekletilmiştir. Sonrasında, p(HEMA) SPH sentezinde anlatılan işlemler uygulanmıştır.

3.2.5. p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin üretimi

p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin sentezi için uygun değerleri belirlemek amacıyla köpükleştirici ajan NaHCO_3 miktarları değiştirilerek üç sentez gerçekleştirilmiştir. Sırasıyla, 750 μL HEMA, 500 μL AA, 250 μL %2.5'lük Bis ve 75 μL %10'lük PF 127 deney tüpüne eklenmiştir. Hazırlanan karışım iyice karıştırıldıktan sonra ağzı kapatılarak 63°C'deki su banyosuna konmuştur. Karışım su banyosu içerisinde bu sıcaklığa ulaştıktan sonra, reaksiyon ortamına sırasıyla 50 μL %20'lik APS ve 50 μL %20'lik TEMED eklenmiştir. Son olarak 80. sn.'de 100, 120 ve 160 mg olmak üzere üç farklı miktarda NaHCO_3 deney tüpüne eklenmiş ve yapı içinde homojen bir şekilde dağılması için iyice karıştırılmıştır. Sonrasında, p(HEMA) SPH sentezinde anlatılan işlemler uygulanmıştır.

3.2.6. p(HEMA-ko-AA)-PEG 600 SPH'lerin üretimi

p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH sentezi için optimum değerleri belirlemek amacıyla köpükleştirici ajan NaHCO_3 miktarları değiştirilerek hidrojeller sentezlenmiştir. Sırasıyla, 750 μL HEMA, 250 μL AA, 250 μL %2.5'lük Bis, 75 μL %10'lük PF 127 ile 750 μL PEG deney tüpüne (12x200 mm) eklenmiştir. Hazırlanan karışım iyice karıştırıldıktan sonra ağzı kapatılarak 63°C'deki su banyosuna konmuştur. Karışım su banyosu içerisinde bu sıcaklığa ulaştıktan sonra, reaksiyon ortamına sırasıyla 50 μL %20'lik APS ve 50 μL %20'lik TEMED eklenmiştir. Son olarak 80. sn.'de 120 ve 160 mg olmak üzere iki farklı miktarda NaHCO_3 deney tüpüne eklenmiş ve yapı içinde homojen bir şekilde dağılması için iyice karıştırılmıştır. Polimerizasyon sonrasında deney tüpünden çıkarılan hidrojeller yapıdaki PEG'ün uzaklaşması için 4 gün boyunca saf suda bekletilmiştir. Sonrasında, p(HEMA) SPH sentezinde anlatılan işlemler uygulanmıştır.

3.3. p(HEMA)-Bazlı Süpergözenekli Hidrojellerin Yapısal Karakterizasyonu

Tez kapsamında hazırlanan p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin yapısal özellikleri aşağıda özetlenen analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

3.3.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Liyofilize edilmiş kuru hidrojel disklerden bir bisturi yardımıyla uygun kesitler alınarak, disklerin yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss

Evo 50, Almanya) ile incelenmiştir. Analiz öncesi örnekler altın-paladyum ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir.

3.3.2. FTIR-ATR analizi

Jelatinin yapıya katılıp/katılmadığı, çapraz bağlanıp/bağlanmadığının belirlenmesi, akrilik asitin yapıya katılması ile elde edilen kopolimer yapılarda HEMA ve AA etkileşiminin incelenmesi, model proteinler BSA ve FG'in yapısında yer alan atomik grupların incelenmesi ve protein-polimer etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla FTIR-ATR (Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflection) spektrometresi (Thermo Scientific Nicolet iS10, ABD) kullanılmıştır. Toz haline getirilen kuru örneklerin spektrumları 500-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında alınarak değerlendirilmiştir.

3.3.3. Termal analiz

Çalışmada kullanılan hidrojellerin termal davranışları termogravimetrik analizör (TG/DTA 6300 SII EXSTAR 6000, Seiko Instruments Inc., ABD) ile incelenmiştir. TGA çalışması; 25-600°C sıcaklık aralığında, 10°C/dk. ısıtma hızı ile azot ortamında yürütülmüştür.

3.3.4. Şişme deneyleri

Çalışma kapsamında hazırlanan SPH'lere ve SPH-IPN'lere ait dinamik şişme deneyleri kuru halde 12 mm çap ve 4 mm kalınlığa sahip disk formunda hidrojellerle yürütülmüştür. Şişme deneyleri 37°C' deki sabit sıcaklık ortamında (Nüve EN 500, Türkiye), 25 mL yapay mide ortamı (SGF, pH:2) ve 25 mL yapay bağırsak ortamı (SIF, pH:7) içerisinde 3 paralel örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortam bileşimleri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Belirli zaman aralıklarında şişme ortamından uzaklaştırılan örneklerin yüzey nemi alınmış ve hassas terazide tartıldıktan sonra tekrar şişme ortamına konulmuştur. Bu işlem, hidrojeller her iki pH'da dengeye ulaşana kadar sürdürülmüştür. Her bir hidrojele ait denge şişme oranları (Q), gravimetrik tayin yöntemi (Eşitlik 3.1) kullanılarak kuru temelde hesaplanmış ve \pm standart sapma değerleriyle verilmiştir.

$$\text{Şişme oranı} = (\text{şişmiş ağırlık} - \text{kuru ağırlık}) / \text{kuru ağırlık} \quad (3.1)$$

Çizelge 3.1. Yapay mide ortamı ve yapay bağırsak ortamı bileşimleri.

Ortam	Bileşim
Yapay Mide Ortamı Modeli, pH:2, (Sarkar et al., 2010)	2g NaCl 7mL HCl (%37) 1L deiyonize su (HCL, %37 ile pH ayarlanır)
Yapay Bağırsak Ortamı Modeli, pH:7, (Stippler et al., 2004)	6.805g KH ₂ PO ₄ 0.896 g NaOH 1L deiyonize su (1M NaOH ile pH ayarlanır)

3.3.5. Mekanik dayanım testi

Hazırlanan SPH ve SPH-IPN'lerin mekanik dayanım testleri 12 mm çapa ve 4 mm kalınlığa sahip disk formundaki hidrojeller ile gerçekleştirilmiştir. Analizden önce fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH:7.4) içerisinde şişmiş forma getirilen örneklerin sıkıştırma testleri 2 mm/dk. sabit çapraz başlık hızında, 20 N yük ile gerçekleştirilmiştir (Zwick, Almanya). Test sonucu şişmiş formdaki hidrojel disklerin gerilim-gerinim eğrileri elde edilmiştir. Gerilim-gerinim ilişkisinin doğrusal olmaya başladığı noktadan alınan eğim ile hidrojellerin elastik modül değeri (E) hesaplanmıştır.

3.3.6. Yoğunluk analizi

Yoğunluk tayini için 12 mm çapa ve 4 mm kalınlığa sahip disk formundaki kuru hidrojeller kullanılmıştır. Analitik terazi ile tartımları yapılarak kütleleri (W_d) belirlenen jellerin hacmi (V_d) ise çözücü yer değiştirme yöntemiyle bulunmuştur. Bu amaçla hidrofobik bir organik çözücü olan ve SPH'ler tarafından absorplanmayan n-hekzan kullanılmıştır. Hidrojel disk, pens yardımıyla n-hekzana daldırılmış, daldırılmadan önce ve sonra okunan hacim değerleri arasındaki fark alınarak kuru hidrojel diskin hacmi belirlenmiştir. Üç paralel örnek ile yürütülen çalışmada, hidrojellerin yoğunluğu aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.2) kullanılarak hesaplanmıştır (Chen et al., 1999).

$$\text{Yoğunluk} = W_d / V_d \quad (3.2)$$

3.4. In vitro Protein Salım Çalışmaları

Hazırlanan SPH ve SPH-IPN yapıların protein salım karakteristiklerini incelemek amacı ile hazırlanan hidrojel diskler öncelikle model protein ilaç olarak seçilen sığır serum albümin (BSA) yüklenmiş ve yüklü hidrojellerden protein salımı in vitro koşullarda gerçekleştirilmiştir. BSA'ye ait salım çalışmaları sonrası uygun özellikleri taşıyan SPH ve SPH-IPN'ler seçilmiştir. Seçilen bu hidrojellere BSA'ye göre daha yüksek molekül ağırlığına sahip bir protein olan fibrinojen (FG) yüklenmiş ve aynı şekilde yüklü hidrojellerden protein salımı in vitro koşullarda incelenmiştir.

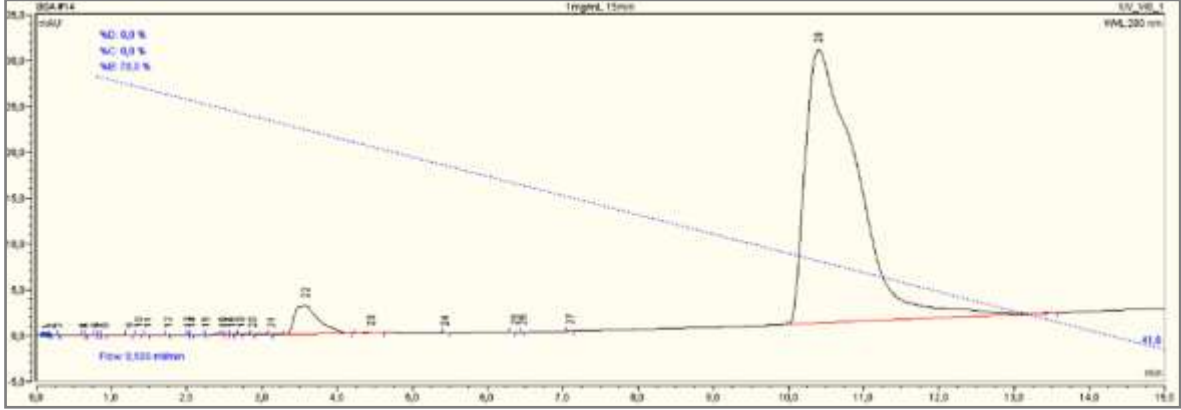
3.4.1. Jellere protein yüklenmesi

Yükleme ortamı oluşturmak için sığır serum albümin (BSA) ve fibrinojen (FG) fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH:7.4) ve yapay bağırsak ortamı (SIF, pH:7) çözeltisi içerisinde çözülerek, 10 mg/mL derişime sahip stok protein çözeltileri hazırlanmıştır. On iki mm çap ve 4 mm kalınlığa sahip hidrojel diskler, çözelti emdirme yöntemi (embedding) kullanılarak mikro pipet yardımı ile geleneksel hidrojellere göre hızlı ve yüksek kapasitelerde protein yüklenmiştir. Ön yükleme çalışmaları doğrultusunda, proteinin hidrojele difüzyonu, hidrojel şişmeye devam ederken gerçekleşeceğinden, hidrojellerin denge şişme oranları ve süreleri göz önünde bulundurulmuştur. Yükleme oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Jellere yüklenen ilaç miktarları, yüklenen çözelti hacmi (V, mL) ve konsantrasyonundan (C, mg/mL) yararlanılarak ($W=C.V$) hesaplanmıştır. Son olarak, bu diskler -80°C'de dondurarak-kurutma cihazında 3 gün boyunca liyofilize edilmiş ve protein yüklü SPH ve SPH-IPN diskler elde edilmiştir.

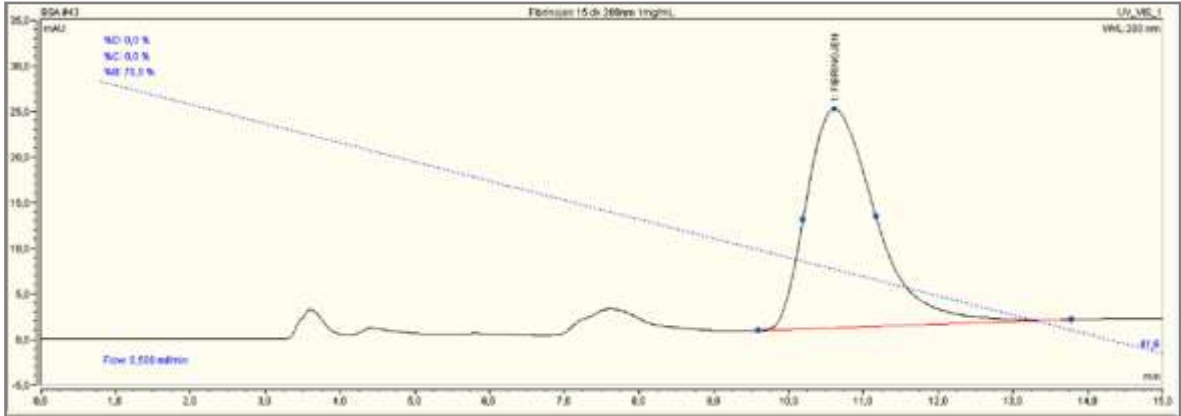
3.4.2. Salım çalışmaları

SPH ve SPH-IPN'lerin protein salım karakteristiklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen in vitro salım çalışmaları, termostatlı çalkalayıcıda (Memmert, Almanya) 37°C sabit sıcaklıkta ve 50 rpm hızda yürütülmüştür. BSA ve fibrinojen yüklü kuru hidrojel diskler, 25 mL'lik yapay bağırsak ortamı (pH:7) içeren rodajlı erlenlere yerleştirilmiş ve salım çalışmaları başlatılmıştır. BSA ve fibrinojenin ortamdaki kümülatif salımı, Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC, Ultimate® 3000, Dionex, USA), C4 kolon ile 280 nm'de (UV) tayin edilmiştir. HPLC analiz methodu; %0.15 (w/v) trifloroasetik asit (TFA) içeren asetonitril:distile su (95:5, v/v) karışımı (A) ve %0.15 (w/v) TFA içeren distile su (B) olmak üzere iki hareketli faz varlığında

gradient sistem ile yürütülmüştür. Başlangıçta 30/70 olan A/B oranı, doğrusal bir artış ile 15 dk. içerisinde 60/40 değerine ulaşmış ve analiz tamamlanmıştır. Analizler 0.5mL/dk. akış hızında, oda sıcaklığında (~25°C) gerçekleştirilmiştir. Proteinlere ait kromatogramlar ise Şekil 3.3.a ve b'de verilmiştir. BSA ve FG'ye ait alıkonma süreleri ise ~10.7 dk. olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.3.a ve b).



(a)

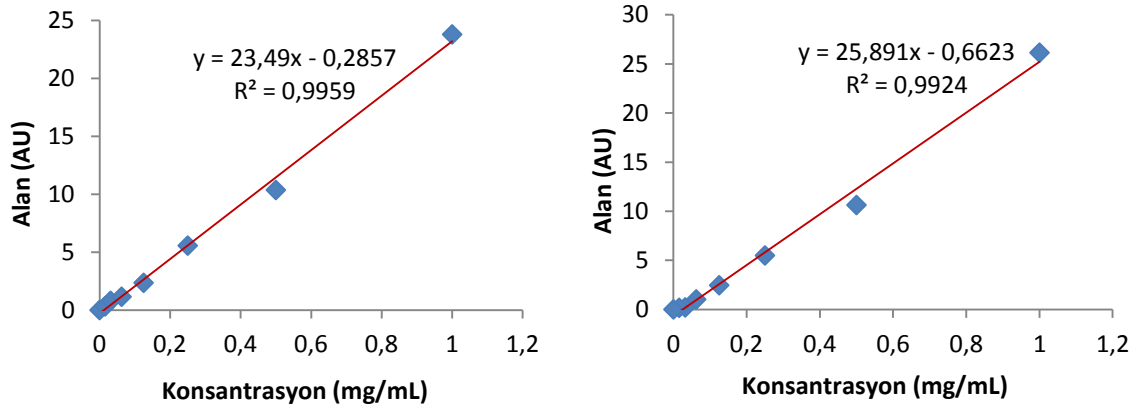


(b)

Şekil 3.3. Proteinlere ait HPLC kromatogramları (280 nm); (a) BSA'e ait kromatogram, (b) FG'e ait kromatogram.

Salınan protein miktarının ölçülebilmesi için öncelikle, SIF içerisinde farklı konsantrasyonlarda (0.01 mg/mL – 0.50 mg/mL ve 0.25 mg/mL – 1.00 mg/mL) bir grup BSA ve FG çözeltisi hazırlanmış ve elde edilen piklerin altında kalan alan değerleri derişim değerlerine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Ardından bu grafikler kullanılarak, salınan BSA ve FG'e ait derişim değerleri belirlenmiştir. BSA'e ve FG'e ait kalibrasyon grafikleri (0.01-

1.00mg/mL) sırasıyla Şekil 3.4.a ve b'de verilmiştir. BSA ve fibrinojene ait kümülatif salım değerleri ile ilgili örnek hesaplama Ek 3'te sunulmuştur.



Şekil 3.4. Proteinlere ait kalibrasyon grafikleri (0.01-1 mg/mL); (a) BSA'e ait kalibrasyon grafiği, (b) FG'e ait kalibrasyon grafiği.

Salım süresince belirli aralıklarla uzaklaştırılan numuneye eşit miktarda (2.5 mL) taze tampon çözeltisi (SIF) ile ortam yenilenerek sürücü güç olan konsantrasyon farkı sabit tutulmaya (perfect sink condition) çalışılmıştır. Mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla, salım ortamına sodyum azid (%0.09 w/v) eklenmiştir.

Salım çalışmaları her bir hidrojel için 3 paralel örnek üzerinden yürütülmüştür. Salınan protein miktarı, ilk 6 saat boyunca birer saat aralıklarla izlenmiş ve salım 24 saat sonunda tamamlanmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞILMASI

Bu bölümde, çeşitli protein ilaçların oral yolla salımında kullanılmak üzere p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin hazırlanması, yapısal karakterizasyonu ve model protein ilaçların in vitro salımına yönelik olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerine gerekli tartışmalar yapılmıştır.

4.1. p(HEMA)-Bazlı SPH'lerin Üretimi

Sunulan çalışmada protein ilaçların oral kullanımında model ilaç salım cihazı olarak kullanılacak, p(HEMA)-bazlı hidrojel yapılar hazırlanmıştır. Protein ilaçların makromoleküler boyutta olmalarından dolayı taşıyıcı sistem olarak makromoleküler gözenek boyut aralığının üzerinde gözenek boyutlarına sahip süpergözenekli hidrojel sistemler tercih edilmiştir. Geliştirilen süpergözenekli hidrojellerin hızlı şişme özellikleri, hızlı yükleme prosesine (< 1 dk.) elverişli olmalarını sağlamış, böylece kolay denatüre olabilen peptid ve protein gibi büyük molekül ağırlığına sahip ilaçların yükleme basamağındaki aktivite kaybı önlenebilmiştir. Ayrıca, süpergözenekli hidrojellerin yüksek derecede şişebilme özellikleri sonucu protein ve peptid yapıdaki ilaçların yükleme verimi artırılmış ve geleneksel hidrojelere göre çok daha yüksek kapasitelerde ilaç yüklenmesi sağlanmıştır.

Süpergözenekli hidrojeller, gözeneksiz ve 100 nm'den daha küçük gözenek boyutuna sahip olan geleneksel hidrojellerin aksine, 100 µm ve yukarısında gözenek boyutu aralığına sahip yeni nesil hidrojellerdir. Gözeneksiz olarak adlandırılan hidrojeller, camısı yapıda olup, kütle transferi yalnızca polimer zincirleri arasındaki boşlukların oluşturduğu moleküler boyuttaki (birkaç nanometre ya da daha az) boşluklardan (free volumes) difüzyon aracılığıyla sağlanmaktadır Bu durum absorpsiyon hızını ve absorplanabilen veya salınabilen maddelerin boyutlarını kısıtlamaktadır. Bu tür homojen hidrojeller çeşitli uygulamalarda kullanılmakla birlikte, özellikle kısıtlı difüzyon özelliklerinin gerektiği ilaç salımı alanında kullanılmaktadır (Chen et al.,1999). Yapılan çalışmalarda hidrojellerden hızlı bir taşınımın sağlanması amacıyla çeşitle tekniklerle (dondurarak-kurutma ve porojen) gözenekliliğin artırılması sağlanmıştır (Serizawa et al., 2002). Mikro (10-100 nm) ve makro (0.1-10 µm) gözenekli hidrojellerin

geliştirilmesiyle, çözücü boyutlarına yakın (mikro) veya daha büyük (makro) boyuttaki bu gözeneklerin varlığı, kütle aktarımının, difüzyon mekanizmasına ek olarak, çözücünün aktarım yoluyla gözeneklerin içlerine kadar girmesi ile gerçekleşmesini sağlamaktadır (Ganji et al., 2010). Ancak mikro ve makrogözenekli malzemeler, eşdeğer bileşime sahip gözeneksiz malzemelere göre çok daha hızlı şişmelerine rağmen, gözeneklerin birbirine bağlı olmadığı ve bu nedenle difüzyon yolunun uzun olduğu pek çok kullanım için yeterince hızlı bir şişme sağlayamazlar. Bu olumsuz durumu ortadan kaldırmak amacıyla yakın zamanda geliştirilen süpergözenekli hidrojel (SPH) 100 µm ve yukarısında gözenek boyut aralığına sahip olup, küresel yapıdaki gözeneklerin çoğu kapiler bir kanal sistem oluşturacak şekilde birbirine bağlantılıdır. Süpergözenekli hidrojel (SPH) boyutlarından bağımsız olarak sn.'ler mertebesinde çok miktarda suyu absorplayarak şişebilmeleri, birbirine bağlı açık gözenek yapısına bağlı olarak, çözücünün basit absorpsiyon yerine kapiler kuvvet ile absorplanması sonucudur (Gemeinhart et al., 2000).

Yöntem Seçimi

SPH'lerin üretimi için en uygun yöntem Chen ve grubu (1999) tarafından geliştirilen, polimerizasyon ve köpüklenme olmak üzere iki süreçten oluşan "gaz köpüklenme tekniği"dir. Bu nedenle sunulan çalışmada da aynı tekniğin kullanılmasına karar verilmiştir.

Homojen bir SPH'in hazırlanmasındaki temel şart, polimerizasyon ve köpüklenme prosesinin eş zamanlı oluşumunun sağlanmasıdır. Bu nedenle, zamanlama kritik bir önem taşır. Proses sırasında oluşan gaz baloncuklarını polimer ağ içerisine kalıcı şekilde hapsedmek için jelleşme, köpük stabilize olduğunda başlamalıdır. Köpüklenme prosesi çok kısa olduğundan ve oluşan köpük birkaç dk.'dan fazla stabilize edilemediğinden jelleşme, köpüklenme süreci başladıktan sonraki birkaç dk. içerisinde başlamalıdır. Homojen bir SPH'in hazırlanması için köpük kararlılığı gerekli olduğundan, sentez sırasında ortama çeşitli yüzey aktif ajanlar eklenmektedir. Albümin, jelatin, Pluronic® (polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit (PEO-PPO-PEO) triblok kopolimerleri), sodyum dodesil sülfat, Span® ve Tween® en çok kullanılan yüzey aktif ajanlar olup, bunlar arasında Pluronic F127'nin (PF127) uzun süre köpük kararlılığını koruduğu ve birçok

hidrofilik monomer için en uygun köpük stabilizatörü olduğu belirtildiğinden (Chen et al.,1999) tez çalışmasında da PF127 tercih edilmiştir.

Gaz köpükleştirme tekniğinde, köpükleştirme ajanları olarak genellikle sodyum karbonat (Na_2CO_3) veya sodyum bikarbonat (NaHCO_3) gibi iyonik karbonatlar kullanılmaktadır. Köpükleştirici ajanların asit ile tepkimesi sonucu ya da yüksek sıcaklıkta bozunması sonucu karbondioksit baloncukları meydana gelmekte ve polimerizasyon sırasında yapıya hapsedilerek gözeneklerin oluşumu sağlanmaktadır. Ayrıca köpükleştirici ajanın eklenmesi, monomer çözeltisinin pH'sını arttırarak başlatıcı çiftini aktifleştirmekte ve polimerizasyonun başlamasını sağlamaktadır. Bu çalışmada da NaHCO_3 köpükleştirici ajan olarak seçilmiştir.

Daha önce grubumuz tarafından kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere, köpükleştirici ajan varlığında radikalik polimerizasyon ile p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'ler (Çetin et al., 2010) sentezlenmiştir. Bu çalışmanın ışığında yürütülen tez kapsamında, protein ilaçların oral kullanımına yönelik kontrollü salım sistemi geliştirmek amacıyla, aynı yöntem kullanılarak önceki çalışmadan farklı bileşimlerde p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'ler hazırlanmıştır.

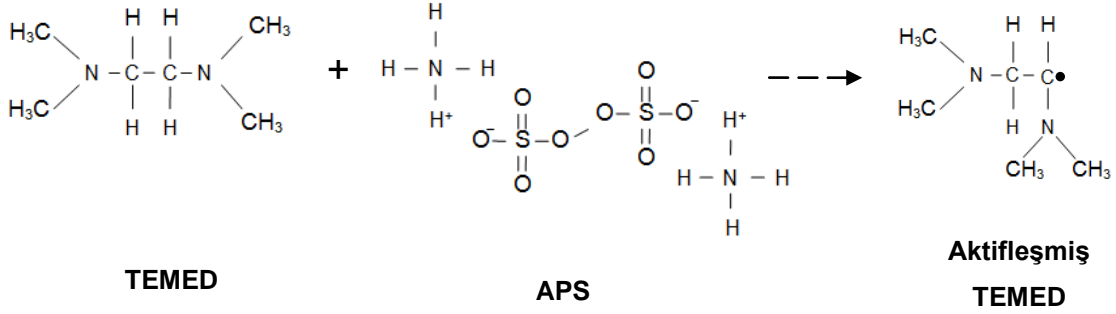
Yumuşak yapısı, yüksek su içeriği ve şişmiş halde sahip olduğu yüksek geçirgenlik gibi özellikleri nedeniyle doğal dokulara büyük benzerlik gösteren p(HEMA) tıbbi uygulamalarda en çok kullanılan hidrojellerden biridir (Eschbach and Huang, 1994). İlk olarak Wichterle ve Lim tarafından üretilen (Wichterle and Lim, 1960) p(HEMA)'nın ilk biyolojik uygulaması kontakt lenstir (Gupta et al., 2002). p(HEMA) hidrojeller biyolojik proseslerde inerttir, vücut tarafından absorplanmaz, ısıyla steril edilebilir ve değişik şekil ve formlarda hazırlanabilir (Çetin et al., 2010). Belirtilen avantajları ışığında kontrollü ilaç salım formülasyonlarının hazırlanmasında sıkça tercih edilen p(HEMA) (Peppas et al., 2000), yapılan çalışma kapsamında da temel monomer olarak seçilmiştir.

Sentez mekanizması

Şekil 4.1'de, p(HEMA)'ya ait serbest radikalik polimerizasyon mekanizması şematize edilmiştir. Sentezin ilk basamağında APS tarafından katalizlenen TEMED (a), ikinci basamakta polimerizasyonu tetikleyerek (initiation), HEMA monomerinin ve düşük miktarda Bis çapraz bağlayıcısının yapısındaki çift bağlara

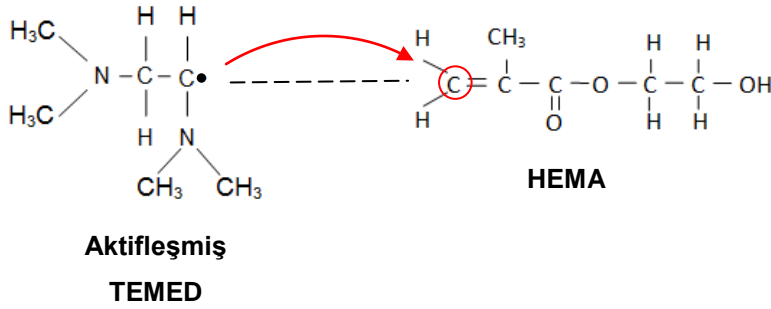
etki eder. Ardından çift bağlar açılır (b), monomerler kovalent olarak birbirine bağlanır (propagation) ve uzun bir alifatik zincir oluşur (c) ve son olarak oluşan bu alifatik zincirler çapraz bağlayıcı ile bağlanır (d).

a) *Basamak I*



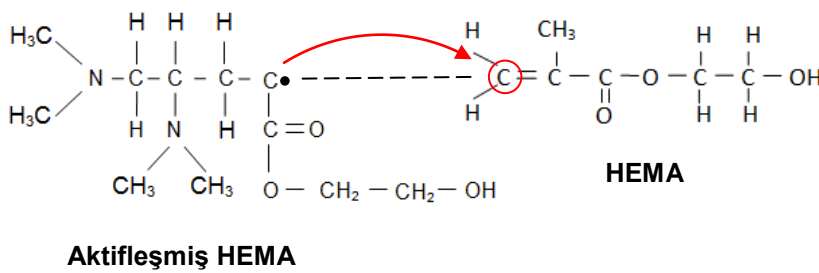
Başlatıcı **TEMED**, **APS** tarafından katalizlenerek aktif hale getirilir.

b) *Basamak II (initiation)*



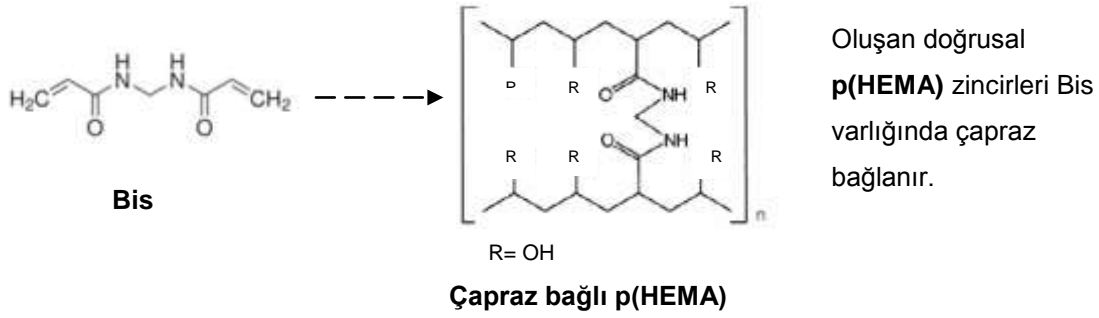
Aktifleşmiş TEMED bir serbest HEMA monomeri ile reaksiyona girer ve **aktifleşmiş HEMA** oluşumu sağlar.

c) *Basamak III (propagation)*



Monomerlerin, **aktifleşmiş HEMA** üzerinden eklenmesiyle doğrusal polimer zinciri

d) Basamak IV



Şekil 4.1. p(HEMA) polimerine ait serbest radikal polimerizasyon mekanizması (a,b,c,d).

Çalışma kapsamında gaz köpükleştirme tekniği ile öncelikle p(HEMA) SPH'ler hazırlanmıştır. Ardından, p(HEMA) SPH'lerin biyoyumluluğunu ve mekanik dayanımını arttırmak amacıyla, doğal bir polimer olan jelatinin yapıya katılması ile iç içe geçmiş ağ yapılı (IPN) hidrojeller sentezlenmiştir. Jelatinin düz zincirli polimer olarak eklenmesiyle yarı-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH'leri, gliserol fosfat disodyum tuzu ile iyonik olarak çapraz bağlanmasıyla ise tam-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'leri elde edilmiştir. Anyonik bir monomer olan akrilik asitin (AA) yapıya katılması ile sentezlenen kopolimer p(HEMA-ko-AA) SPH'inin, pH-duyarlı ve biyoadeziv özellik kazanması amaçlanmıştır. Son olarak p(HEMA) ve p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin biyoyumlulukları, gözeneklilik oranı ve gözenek boyut aralıklarının artırılması amacıyla gözenek oluşturu polimer, polietilen glikol (PEG 600, MA:600 Da) varlığında; p(HEMA)-PEG ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'ler sentezlenmiştir.

Üretim parametrelerinin hidrojellerin özellikleri üzerindeki etkisinin incelenmesi ve uygun olan sentez reçetesinin belirlenebilmesi amacıyla polimerizasyon bileşenlerinin miktarları değiştirilmiştir. Köpükleştirici ajan NaHCO_3 'ün polimerizasyon ortamına eklenme zamanı da, homojen gözenek yapısına sahip süpergözenekli bir hidrojelin sentezlenmesi için kontrol edilmesi gereken bir diğer üretim parametresidir. Gözeneklilik oranı, gözenek boyutu ve oluşan gözeneklerin birbirine içsel bağlı olup olmamaları ilaç salımının difüzyon mekanizması ile kontrol edildiği sistemler için önemlidir. Bu nedenle, örneklerin morfolojik (SEM) incelemeleri yapılmış ve sentez için en uygun bileşen miktarları belirlenmiştir.

Reçetelerde yer alan miktarlar (hacim veya ağırlık bazında belirtilen) 750 µL HEMA monomeri temel alınarak verilmiştir.

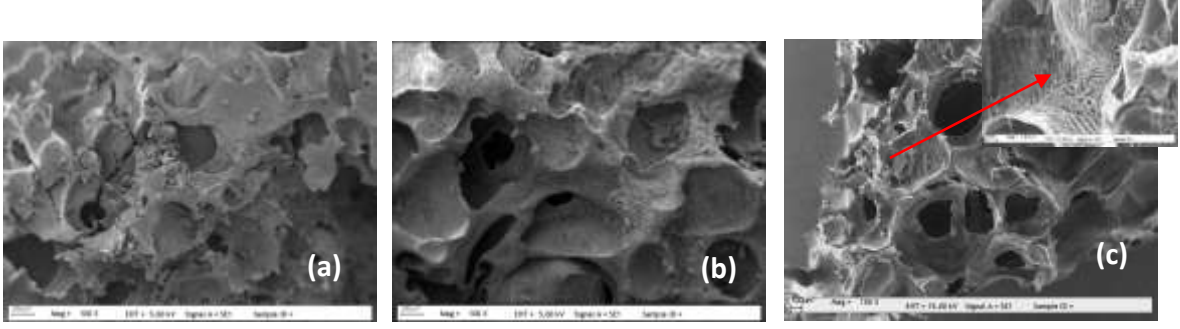
4.1.1. p(HEMA) SPH'lerin üretimi

p(HEMA) SPH'lerin üretimi aşamasında, Şekil 4.1'de öngörülen serbest radikalik polimerizasyonu ile eş zamanlı yürütülen köpükleşme prosesi gerçekleştirilmiş ve gözenekli yapıdaki hidrojellerin üretimi sağlanmıştır.

4.1.1.1. Çapraz bağlayıcı (Bis) miktarının ve NaHCO₃ eklenme zamanının etkisi

p(HEMA) SPH'lerin sentezinde öncelikle çapraz bağlayıcı (Bis) miktarının hidrojel yapıya olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla üç farklı Bis miktarı (50, 100 ve 200 µL) kullanılarak hidrojeller sentezlenmiştir. İki yüz µL Bis kullanıldığında, homojen yapıda bir hidrojel oluşumu gözlenmemiştir. Bu nedenle SEM görüntüsü alınmamıştır. Şekil 4.2.a ve b'de verilen SEM görüntüleri, sırasıyla, 50 µL ve 100 µL Bis içeren ve NaHCO₃'ün polimerizasyonun ilk 20 sn.'si içerisinde eklenerek hazırlandığı p(HEMA) SPH'lerine ait SEM görüntüleridir. Elli µL Bis kullanılarak hazırlanan yapının içsel bağlı gözeneklere sahip olmadığı, 100 µL Bis kullanılarak hazırlanan yapının ise daha düzgün gözeneklere sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, bu yapı da tam anlamıyla istenilen özelliklere sahip değildir.

Köpükleştirici ajanın polimerizasyon ortamına eklenme zamanını incelemek amacıyla; Bis miktarının 100 µL olduğu ve sodyum bikarbonatın monomer çözeltisine polimerizasyonun 80.sn.'sinde eklendiği yapı sentezlenmiştir. Şekil 4.2.c'deki SEM görüntüsü incelendiğinde hazırlanan bu yapının çok daha fazla sayıda ve birbiri ile içsel bağlantılı gözeneklere sahip olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak p(HEMA) SPH'lerin sentezi için kullanılması gereken çapraz bağlayıcı miktarı 100 µL, NaHCO₃'ün eklenme zamanı ise polimerizasyonun 80. sn.'si olarak belirlenmiştir.



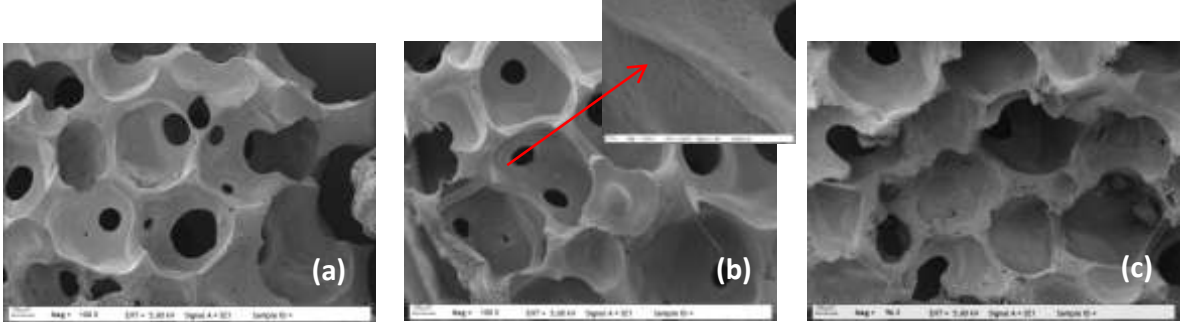
Şekil 4.2. p(HEMA) SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 50 µL Bis içeren (b) 100 µL Bis içeren (NaHCO₃ 20 sn. içerisinde eklendi), (c) 100 µL Bis içeren örnekler (NaHCO₃ 80.s'de eklendi, detay görüntü büyütme oranı ×1000).

4.1.2. p(HEMA)-jelatin yarı-IPN SPH'lerin üretimi

p(HEMA)-jelatin SPH'ler, Şekil 4.1'de öngörülen sentez mekanizması ile eş zamanlı yürütülen köpüklenme prosesi ile çapraz bağlanan p(HEMA) zincirlerinin arasında düz zincir halinde yapıya katılan jelatinin varlığında gerçekleştirilmiştir. Böylelikle yarı-IPN bir yapının elde edilmesi sağlanmıştır.

4.1.2.1. Jelatin miktarının etkisi

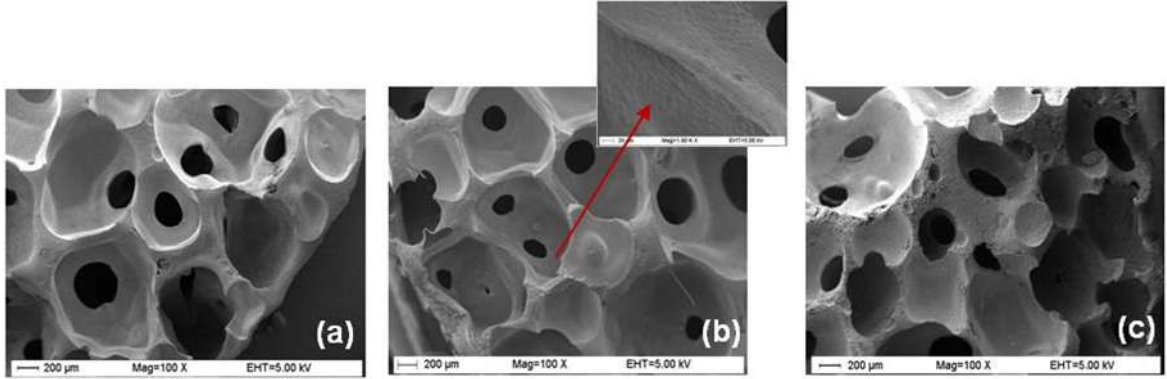
Yarı IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH, öncelikle jelatin miktarının yapıya olan etkisini incelemek için 100 µL Bis varlığında, üç farklı jelatin miktarı (250, 450 ve 750 µL) kullanılarak ve köpükleştirici ajan polimerizasyon ortamına 20 sn. içerisinde eklenerek sentezlenmiştir. NaHCO₃'ün polimerizasyon ortamına eklenme zamanı, jelatin varlığında ortam viskozitesinin hızlı artışına bağlı olarak ortaya çıkan homojen olmayan gözenek oluşumunu engellemek amacıyla kısa tutulmuştur. Hidrojellere ait SEM görüntüleri incelenmiş; monomer karışımına 250 µL jelatin eklenerek hazırlanan yapının SEM fotoğrafı hidrojelin içsel olarak bağlantılı gözeneklere sahip olduğunu (Şekil 4.3.a), 450 µL jelatinin kullanıldığı durumda oluşan yapının çok daha düzgün gözeneklere sahip olduğunu (Şekil 4.3.b), ancak jelatin miktarı 750 µL'ye yükseltildiğinde ise yapının belirgin şekilde değiştiğini ve birbiri ile bağlantılı gözeneklerin sayısının azaldığını göstermiştir (Şekil 4.3.c). Bu nedenle, p(HEMA)-jelatin SPH'lerinin sentezi için gerekli olan optimum jelatin miktarı 450 µL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.3. p(HEMA)-jelatin SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 250 μ L, (b) 450 μ L (detay görüntü büyütme oranı \times 1000), (c) 750 μ L jelatin içeren örnekler.

4.1.2.1. Çapraz bağlayıcı (Bis) miktarının etkisi

Çapraz bağlayıcı (Bis) miktarının yarı-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH'leri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 450 μ L jelatin varlığında, üç farklı Bis miktarı (50, 100 ve 200 μ L) kullanılarak hidrojeller sentezlenmiştir. Örneklerin morfolojik yapıları dikkate alınarak, uygun Bis miktarı p(HEMA) SPH'lerinin sentezinde olduğu gibi 100 μ L (Şekil 4.4.b) olarak belirlenmiştir.

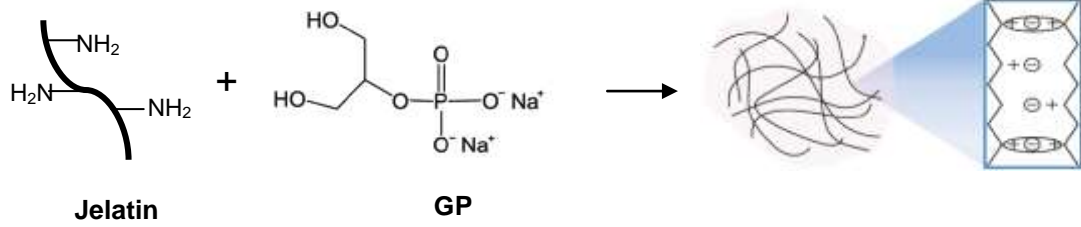


Şekil 4.4. p(HEMA)-jelatin SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 50 μ L, (b) 100 μ L, (c) 200 μ L Bis içeren örnekler.

4.1.3. p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin üretimi

Doğal, biyouyumlu ve immünojenik etki (bağışıklık sistemi tarafından verilen cevap) yaratmayan bir polimer olan jelatin (Kuijpers et al., 2000), GP varlığında iyonik olarak çapraz bağlanarak tam-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH'leri hazırlanmıştır. İyonik çapraz bağlanma, kitosana benzer şekilde, amin grupları içeren katyonik bir polimer olan jelatin ile anyonik bir molekül olan gliserol fosfat tuzunun etkileşimi sonucunda gerçekleşmektedir (Chenite et al., 2000). p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin hazırlanması aşamasında, Şekil 4.1'de öngörülen sentez mekanizması ile eş zamanlı gerçekleşen köpükleşme prosesi ile çapraz

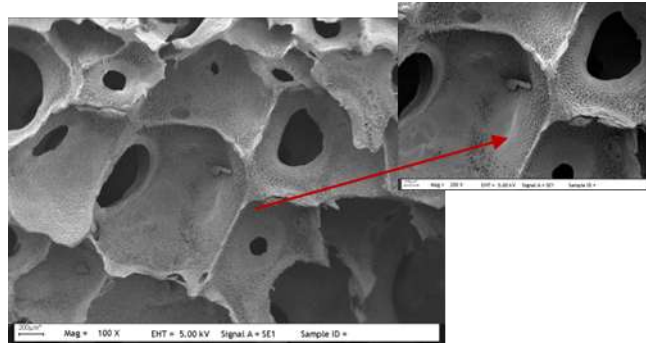
bağlı p(HEMA) zincirleri elde edilirken, diğer yandan GP ile çapraz bağlanan jelatin ağ yapının bu zincirlerin arasına girmesiyle içe içe geçmiş ağ yapının oluşumu sağlanmıştır. Şekil 4.5’de, jelatinin gliserol fosfat disodyum tuzu varlığında çapraz bağlanma mekanizması şematize edilmiştir.



Şekil 4.5. Jelatinin GP varlığında çapraz bağlanma mekanizması (Moura et al., 2011).

4.1.3.1. Jelatin miktarının etkisi

Jelatin miktarının p(HEMA)-jelatin SPH-IPN’in yapısı üzerindeki etkisini görmek amacıyla 450 µL ve 750 µL olmak üzere iki farklı miktarda jelatin içeren hidrojel sentezlenmiştir. p(HEMA)-jelatin SPH’lerin sentezinde ifade edildiği gibi köpükleştirici ajan 20 sn. içerisinde polimerizasyon ortamına eklenmiştir. Her iki yapının morfolojik incelemesi doğrultusunda, 750 µL jelatin içeren hidrojin büyük gözeneklerin yanı sıra, küçük gözenekleri de içeren süngerimsi yapısı (Şekil 4.6) dikkate alınarak, tam-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH’leri için optimum jelatin miktarı 750 µL olarak belirlenmiştir.



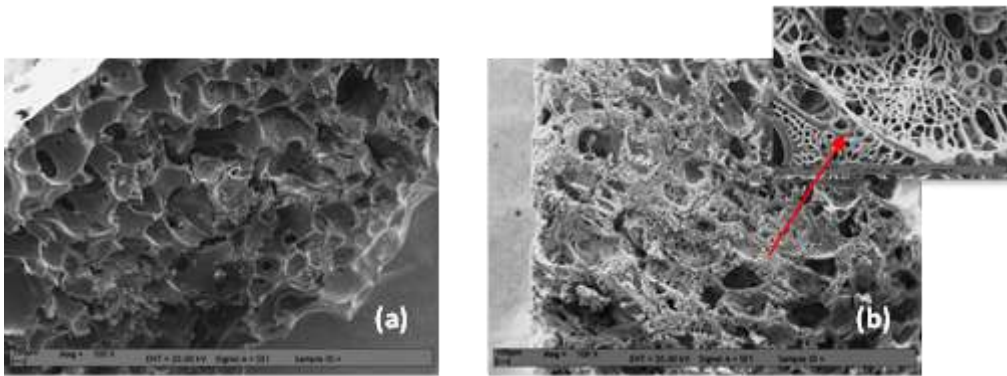
Şekil 4.6. Tam-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH-IPN’e ait SEM görüntüsü (x100) (750 µL jelatin, detaya ait büyütme ×1000).

4.1.4. p(HEMA)-PEG SPH'lerin üretimi

p(HEMA) SPH'lerin biyoyumlulukları, gözeneklilik oranı ve gözenek boyut çeşitliliğinin artırılması amacıyla gözenek oluşturuçu polimer, polietilen glikol eklenerek; p(HEMA)-PEG SPH'ler sentezlenmiştir. Polietilen glikol (PEG 600), suda çözünebilir, biyoyumlu, toksik olmayan ve immünojenik etki yaratmayan bir polimerdir. Bu nedenle farmasötik ve biyomedikal alanında sıklıkla tercih edilen bir malzemedir (Bajpai, 2007). PEG, özellikle gözenekli hidrojellerin hazırlama yöntemlerinden olan porojen tekniğinde suda çözünebilir özelliği nedeniyle kullanılmaktadır (Gürdağ and Öz, 2009). p(HEMA)-PEG SPH'lerin sentezi, Şekil 4.1'de öngörülen serbest radikalik polimerizasyon ile eş zamanlı köpükleşme prosesi ile gözenek oluşturuçu polimer PEG varlığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.4.1. PEG miktarının etkisi

Gözenek oluşturuçu PEG miktarının, p(HEMA)-PEG SPH'leri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 500 μ L ve 750 μ L olmak üzere iki farklı PEG miktarı kullanılarak hidrojeller sentezlenmiştir. Monomer karışımına 500 μ L PEG eklenerek hazırlanan yapının SEM görüntüsü incelendiğinde hidrojelin içsel bağlı gözenek yapısına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.7.a). Yediyüz elli μ L PEG kullanıldığı durumda oluşan yapı içsel bağlantılı gözeneklerin yanısıra yüksek gözeneklilik oranı ve artan gözenek boyut çeşitliliği göstermiştir (Şekil 4.7.b). Bu nedenle, p(HEMA)-PEG SPH'lerin sentezi için gerekli olan optimum PEG miktarı 750 μ L olarak belirlenmiştir.



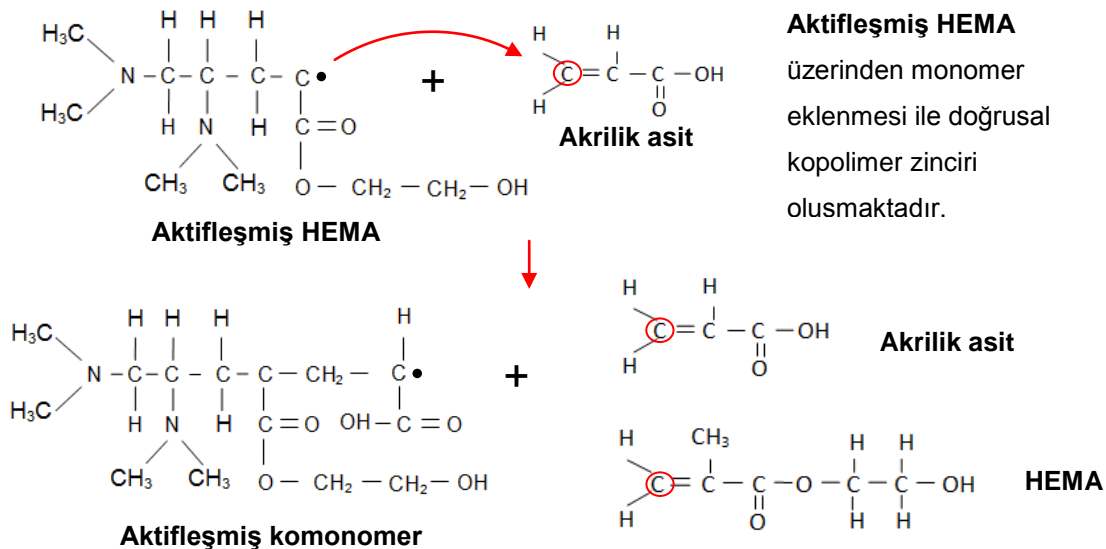
Şekil 4.7. p(HEMA)-PEG SPH'lerine ait SEM görüntüleri (x100): (a) 500 μ L, (b) 750 μ L (detaya ait büyütme \times 1000), PEG varlığında sentezlenen örnekler.

4.1.5. p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin üretimi

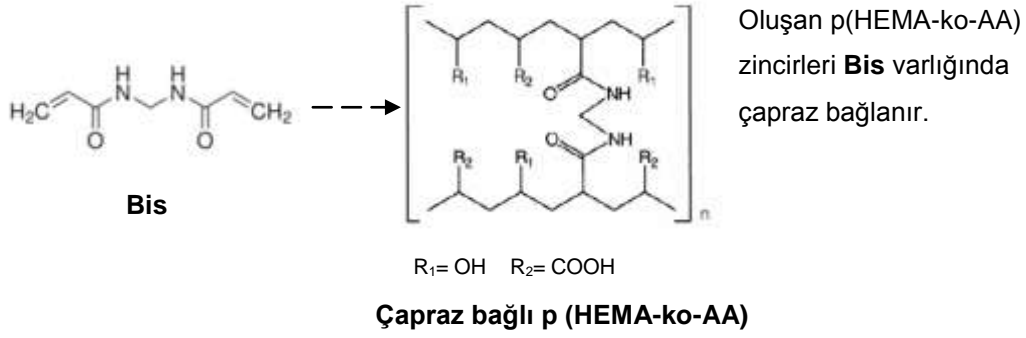
p(HEMA) SPH'lerine pH duyarlılık ve biyoadeziv özellik kazandırmak amacıyla, yapıya anyonik monomer akrilik asit (AA) eklenmesi sonucu p(HEMA-ko-AA) SPH'ler hazırlanmıştır. Proteinlerin oral yolla kontrollü salımı amacıyla geliştirilmiş sistemler arasında bölgeye özgü ilaç salımına imkan veren biyoadeziv polimerler, bağırsak duvarı ile yakın temas sağlamakta ve mide-bağırsak sisteminde alıkonma süresini arttırmaktadır (Junginger, 1990; Lehr, 1994). Peptid ve protein yapıdaki ilaçların kontrollü salımına yönelik yapılan çalışmalarda, akrilik asit pH-duyarlı yapısı ve biyoadeziv özelliği nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Gümüşderelioğlu and Kesgin, 2005; Gümüşderelioğlu et al., 2011).

Şekil 4.8'de, p(HEMA-ko-AA) SPH'e ait serbest radikalik polimerizasyon mekanizması şematize edilmiştir. Sentezin ilk basamakları Şekil 4.1.a ve b'de ifade edildiği şekilde gerçekleşmektedir. Kısaca APS tarafından katalizlenen TEMED (Şekil 4.1.a), ikinci basamakta polimerizasyonu tetikleyerek (initiation), HEMA monomerindeki ve düşük miktarda Bis çapraz bağlayıcısının yapısındaki çift bağlara etki eder, ardından çift bağlar açılır (Şekil 4.1.b). Şekil 4.8.c'de incelendiğinde ortamdaki monomerler (HEMA ya da AA) kovalent olarak birbirine bağlanır (propagation) ve uzun bir alifatik zincir oluşur. Son olarak oluşan bu alifatik zincirler çapraz bağlayıcı ile bağlanır ve kopolimer yapıdaki hidrojel elde edilir (d).

c) Basamak III (Propagation)



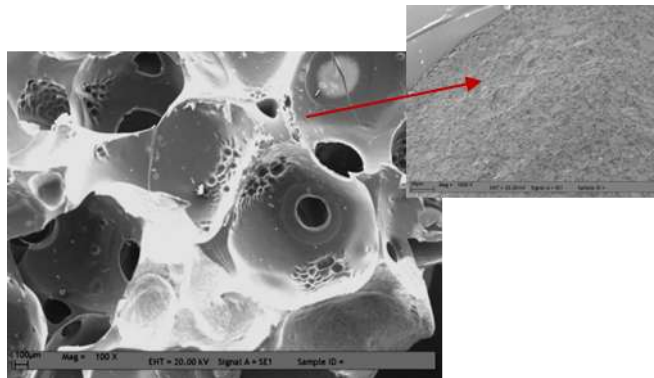
d) Basamak IV



Şekil 4.8. p(HEMA-ko-AA) kopolimerine ait serbest radikal polimerizasyon mekanizması (Şekil 4.1'in a ve b basamaklarının devamı niteliğinde, yukarıdaki c ve d basamakları ifade edilmiştir).

4.1.5.1. Köpükleştirici ajan sodyum bikarbonat (NaHCO₃) miktarının etkisi

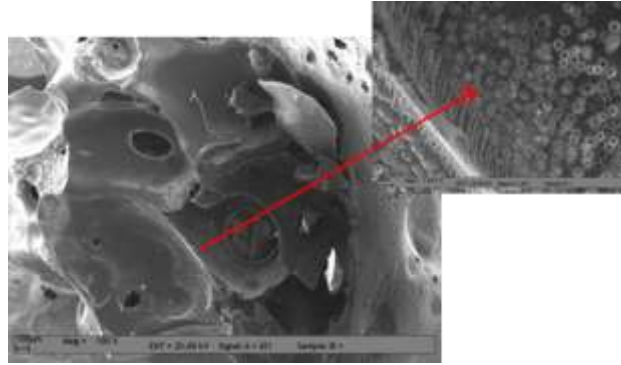
Köpükleştirici ajan sodyum bikarbonat (NaHCO₃) miktarının, p(HEMA-ko-AA) SPH'leri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 100 mg, 120 mg ve 160 mg olmak üzere üç farklı sodyum bikarbonat miktarı kullanılarak hidrojeller sentezlenmiştir. Akrilik asitin varlığı nedeniyle düşen çözelti pH'sının yükselmesinde etkili olan sodyum bikarbonat değeri değiştirilerek, jelleşme ve köpükleşme prosesinin eş zamanlı gerçekleştiği optimum miktar belirlenmiştir. Yüz mg ve 160 mg sodyum bikarbonat ile hazırlanan örneklerde polimerleşme ve köpükleşme eş zamanlı olmamış, bu nedenle homojen örnekler elde edilememiştir. 120 mg sodyum bikarbonat kullanılması ile homojen bir SPH elde edilmiştir. Bu nedenle p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin sentezi için gerekli köpükleştirici ajan miktarı 120 mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. p(HEMA-ko-AA) SPH'ine ait SEM görüntüsü (x100), (120 mg sodyum bikarbonat, detaya ait büyütme ×1000).

4.1.6. p(HEMA-ko-AA)-PEG600 SPH'lerin üretimi

Akrilik asit ve PEG'ün özelliklerini aynı yapıda toplamak amacıyla, p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'ler hazırlanmıştır. Hazırlanan SPH'ler, AA'in varlığı ile pH duyarlılık ve biyoadeziv özellik kazanırken, PEG'ün yapıya katılması ile biyouyumlulukları, gözeneklilik oranı ve gözenek boyut çeşitliliğinin artırılması sağlanmıştır. p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerin sentezi, Şekil 4.8'de öngörülen serbest radikalik polimerizasyon ile eş zamanlı köpüklenme prosesi ile gözenek oluşturuçu polimer PEG varlığında gerçekleştirilmiştir. Köpükleştirici ajan sodyum bikarbonat (NaHCO_3) miktarının, p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla 120 mg ve 160 mg olmak üzere iki farklı sodyum bikarbonat miktarı kullanılarak hidrojel sentezlenmiştir. 160 mg sodyum bikarbonat eklendiğinde istenilen özelliklere sahip homojen bir yapı elde edildiğinden optimum köpükleştirici ajan miktarı 160 mg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'ine ait SEM görüntüsü (x100), (160 mg sodyum bikarbonat) (detaya ait büyütme x1000).

Sonuç olarak, istenen yapıda hidrojel sentezinin gerçekleştirildiği uygun bileşen miktarları belirlenerek, p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, p(HEMA)-PEG, p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH olmak üzere 6 adet hidrojel sentezlenmiştir. Homojen bir süpergözenekli hidrojin hazırlanabilmesi için köpükleştirici ajan sodyum bikarbonatın polimerizasyon ortamına eklenme zamanı incelenmiş; p(HEMA) SPH, p(HEMA)-PEG SPH, p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri için 80. sn. olarak belirlenmiş, p(HEMA)-jelatin SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'leri için ise 20 sn. içerisinde eklenmesi uygun görülmüştür. Hidrojellere ait sentez reçeteleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Süpergözenekli hidrojellerin sentez reçeteleri.

	p(HEMA) SPH	p(HEMA)-jelatin SPH	p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	p(HEMA)-PEG SPH	p(HEMA-ko-AA) SPH	p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH
Monomer (HEMA)	750µL	750µL	750 µL	750 µL	750µL	750µL
Monomer (AA)	-	-	-	-	500 µL	250 µL
Çapraz Bağlayıcı (Bis, %2.5)	50 µL, 100 µL, 200 µL	50 µL, 100 µL, 200 µL	100 µL	100 µL	250 µL	250 µL
Köpük Stabilizatörü (PF 127, %10)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	75 µL	75 µL
Jelatin (%10)	-	450 µL, 750 µL	450 µL, 750 µL	-	-	-
PEG 600	-	-	-	500 µL, 750 µL	-	750 µL
Gliserol Fosfat (%50)	-	-	78,8 µL	-	-	-
Başlatıcı (APS, %20)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Başlatıcı Katalizleyici (TEMED, %20)	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Köpükleştirici Ajan (NaHCO₃)	80 mg	80 mg	80 mg	80 mg	100mg, 120mg, 160 mg	120 mg, 160 mg

*Koyu renkle belirtilen değerler, sentez için belirlenen optimum bileşen miktarlarını ifade etmektedir.

SPH ve SPH-IPN örneklerin ortalama gözenek boyutları ve gözenek boyut aralığı değerleri SEM fotoğraflarından yararlanılarak, "ImageJ" (NIH, USA) programı ile hesaplanmış ve Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin gözenek boyutları ve gözenek boyut aralıkları.

Süpergözenekli Hidrojel	Ortalama Gözenek Boyutu (μm)	Gözenek Boyut Aralığı (μm)
p(HEMA) SPH	302.80 \pm 63.95	213.90-381.89
p(HEMA)-jelatin SPH	321.25 \pm 81.41	224.87-434.73
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	338.28 \pm 114.48	125.29-650.00
p(HEMA)-PEG SPH	219.38 \pm 55.96	10.03-322.50
p(HEMA-ko-AA) SPH	270.85 \pm 151.41	126.24-470.42
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	256.01 \pm 78.63	10.21-559.10

Hidrojellerin gözenek boyut aralıklarının, yaklaşık 10 ile 600 μm arasında değiştiği görülmektedir. Gözenek oluşturuca ajan PEG'ün yapıya katıldığı p(HEMA)-PEG ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin gözenek boyut çeşitliğinin arttığı gözlenmiştir.

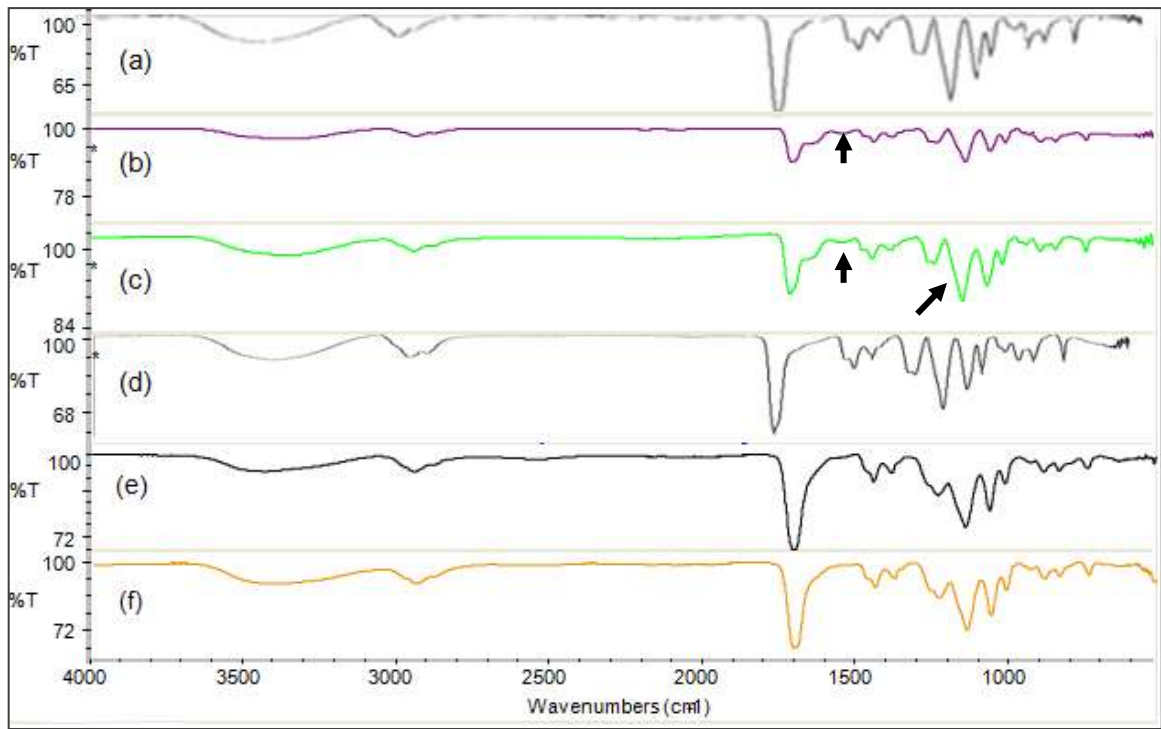
4.2. Yapısal Karakterizasyon Çalışmaları

4.2.1. FTIR-ATR analizi

Çalışma kapsamında hazırlanan p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lere ait FTIR spektrumları Şekil 4.11'de verilmiştir.

Şekil 4.11.a'da verilen spektrum p(HEMA) SPH'lerine aittir ve p(HEMA)'ın karakteristik pikleri olan, 3400 cm^{-1} civarındaki geniş pik O-H grubuna ait gerilme titreşimi ve 1710 cm^{-1} 'deki C=O grubuna ait gerilme titreşimlerine ek olarak, 1150 cm^{-1} 'deki C-O grubuna ait gerilme titreşimi ve 1075 cm^{-1} 'deki C=O grubuna ait gerilme titreşimi gözlenmiştir (Bodas et al., 2005; Gonçaves et al., 2009). p(HEMA)-jelatin SPH'lerinin Şekil 4.11.b'deki spektrumunda, N-H bükülmesine ait olan 1550 cm^{-1} ve 1500 cm^{-1} arasındaki pikler, jelatinin yapıya başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir (Pal et al., 2007). p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerinin spektrumunda (Şekil 4.11.c) N-H bükülmesine ait olan 1550 cm^{-1} ve 1500 cm^{-1} 'deki piklerin yanı sıra, C-O bağının titreşimine ait olan 1150 cm^{-1} 'deki pikin şiddetinin arttığı gözlemlenmektedir. Pikin şiddetindeki bu artış, çapraz bağlanmanın gerçekleştiğini kanıtlamaktadır (Talebian et al., 2007). p(HEMA)-PEG SPH'lere ait spektrumda (Şekil 4.11.d), suda çözünen hidrofilik bir polimer

olan PEG'ün yapıdan uzaklaşması ile p(HEMA) SPH'lerine ait pikler gözlenmiştir. p(HEMA-ko-AA) SPH'lerinin spektrumunda (Şekil 4.11.e), 3400 cm^{-1} civarındaki geniş pik kopolimerin yapısındaki p(HEMA)'ya ait alkol gruplarından ve pAA'e ait karboksilik asit gruplarından kaynaklanan O-H gerilme titreşimine aittir (Bodas et al., 2005; Ray et al., 2009). 1710 cm^{-1} 'deki pik ise p(HEMA)'ın ester gruplarından ve pAA'in karboksilik asit gruplarından kaynaklanan C=O gerilme titreşimine işaret etmektedir (Gonçalves et al., 2009; Ray et al., 2009). p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin spektrumu (Şekil 4.11.f) incelendiğinde ise PEG'ün yapıdan uzaklaşması ile p(HEMA-ko-AA) SPH'lerine ait pikler gözlenmiştir.



Şekil 4.11. Süpergözenekli hidrojellere ait FTIR spektrumları: (a) p(HEMA) SPH, (b) p(HEMA)-jelatin SPH, (c) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (d) p(HEMA)-PEG SPH, (e) p(HEMA-ko-AA) SPH, (f) p(HEMA-ko-AA) SPH.

Hidrojellere ait spektrum verileri, Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

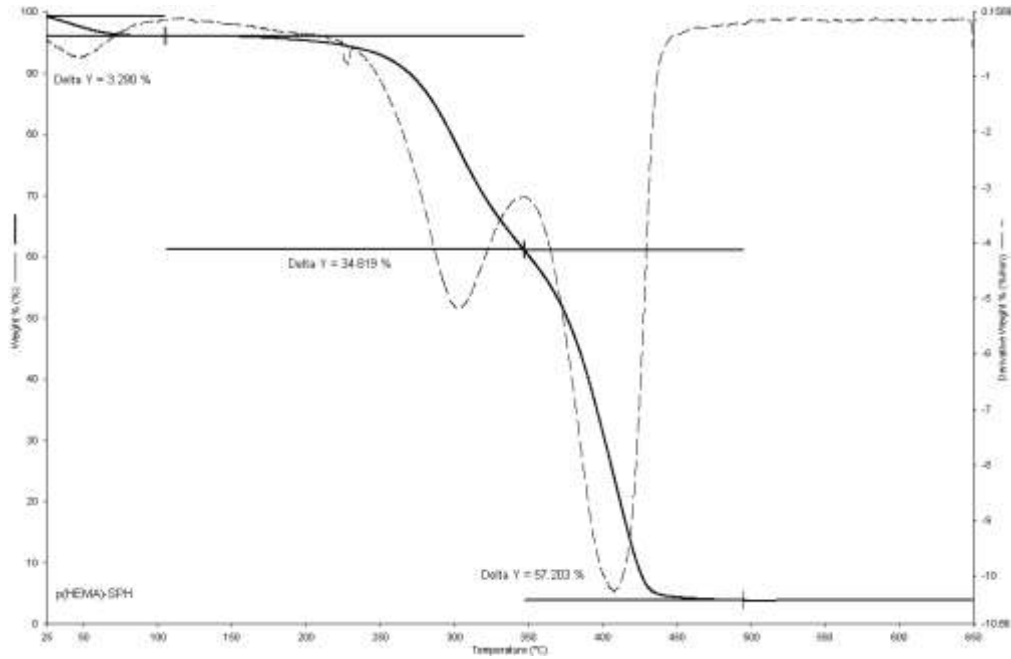
Çizelge 4.3. Hidrojellere ait IR spektrum verileri ve değerlendirilmesi.

Dalga Boyu (cm ⁻¹)						Açıklama
(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	
3400 b	3400 b	3400 b	3400 b	3400 b	3400 b	O-H gerilmesi
1710	1710	1710	1710	1710	1710	C=O gerilmesi
	1550- 1500	1550- 1500				N-H bükülmesi
1150	1150	ii	1150	1150	1150	C-O gerilmesi (ester grubu)
1075	1075	1075	1075	1075	1075	C=O gerilmesi (alkol grubu)

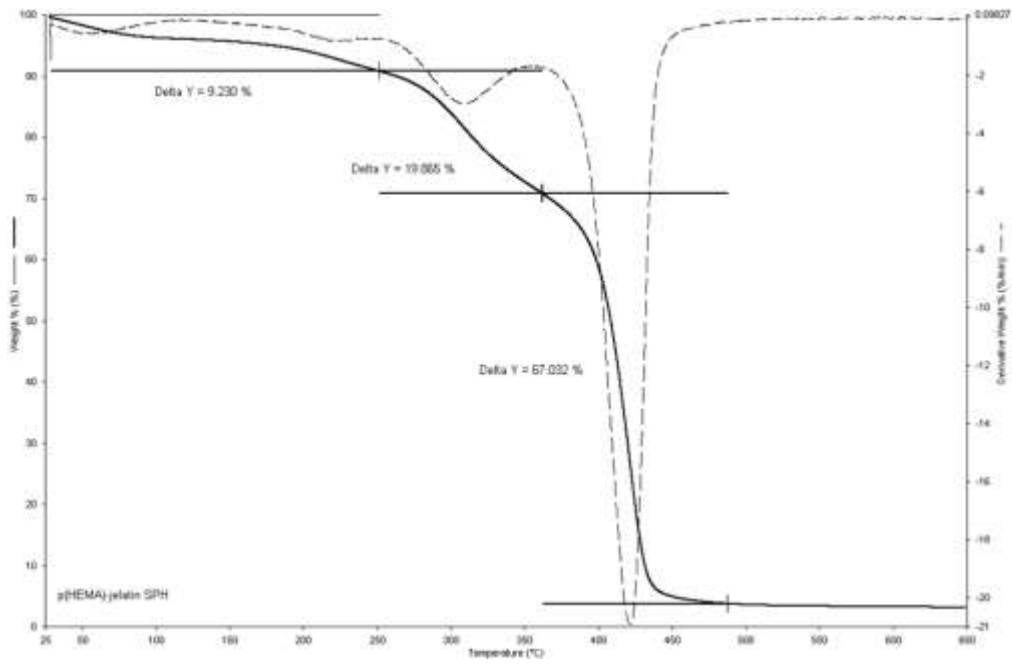
Kısaltmalar: b: Geniş (broad), ii: Şiddet artması (increased intensity). (a) p(HEMA) SPH, (b) p(HEMA)-jelatin SPH, (c) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (d) p(HEMA)-PEG SPH, (e) p(HEMA-ko-AA) SPH, (f) p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH.

4.2.2. Termal analiz

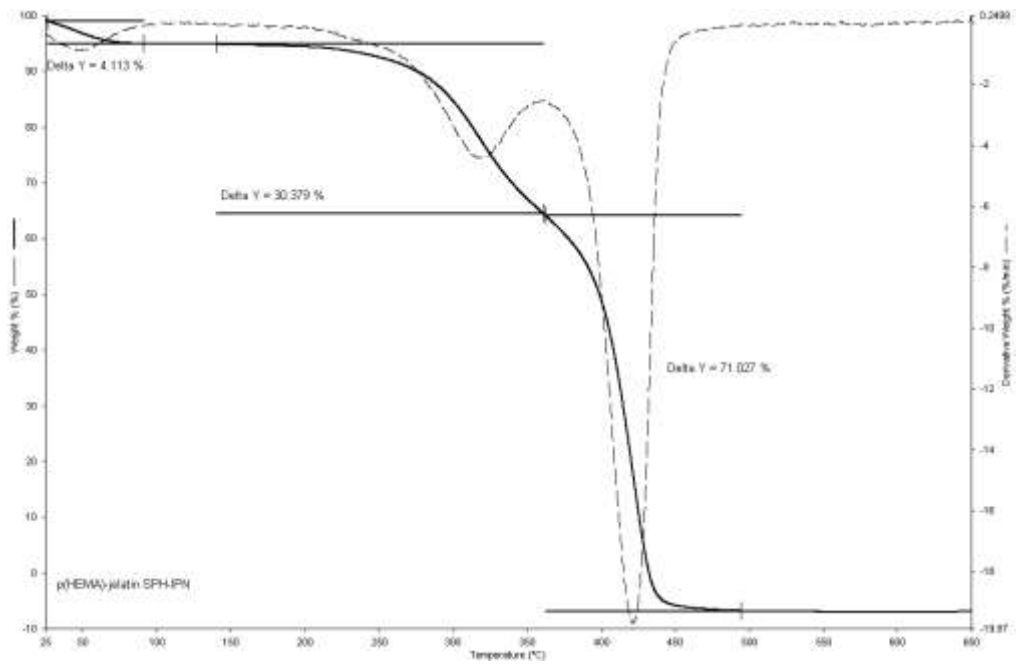
Jellerin artan sıcaklığa bağlı kütle kaybını incelemek amacıyla termal analiz çalışmaları, 25-600°C aralığında ve 10°C/dk. ısıtma hızı ile azot ortamında yürütülmüştür. Elde edilen termogramlar Şekil 4.12'da gösterilmiştir.



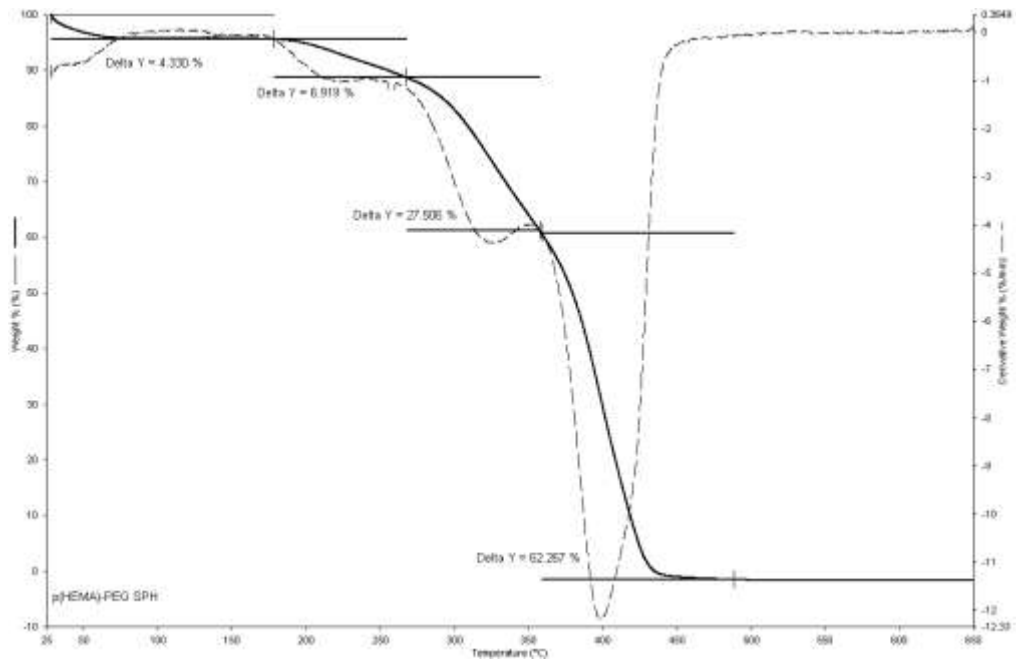
(a)



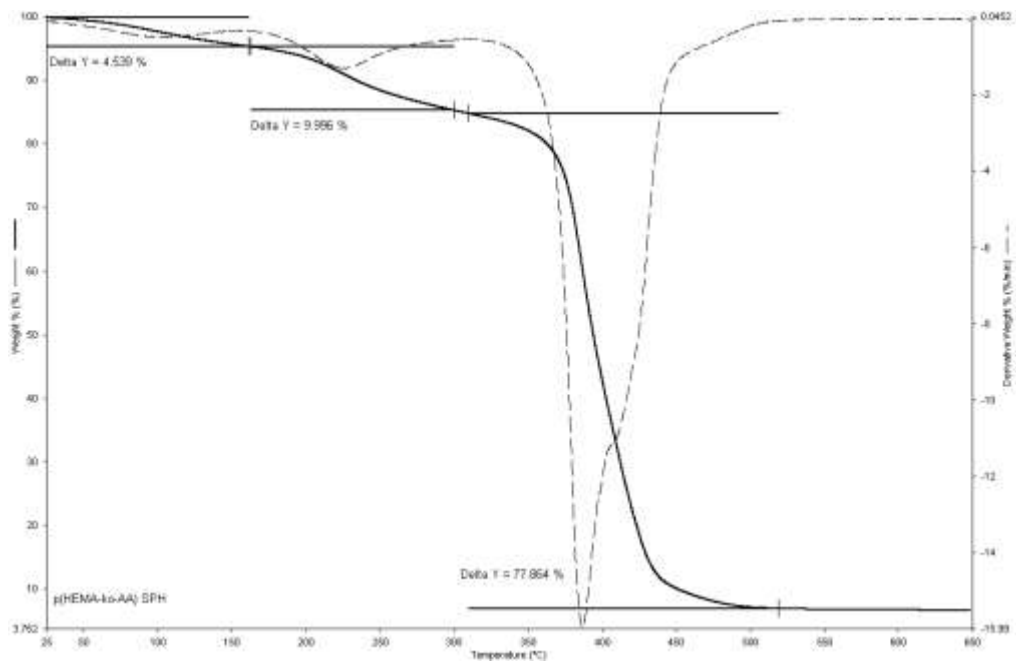
(b)



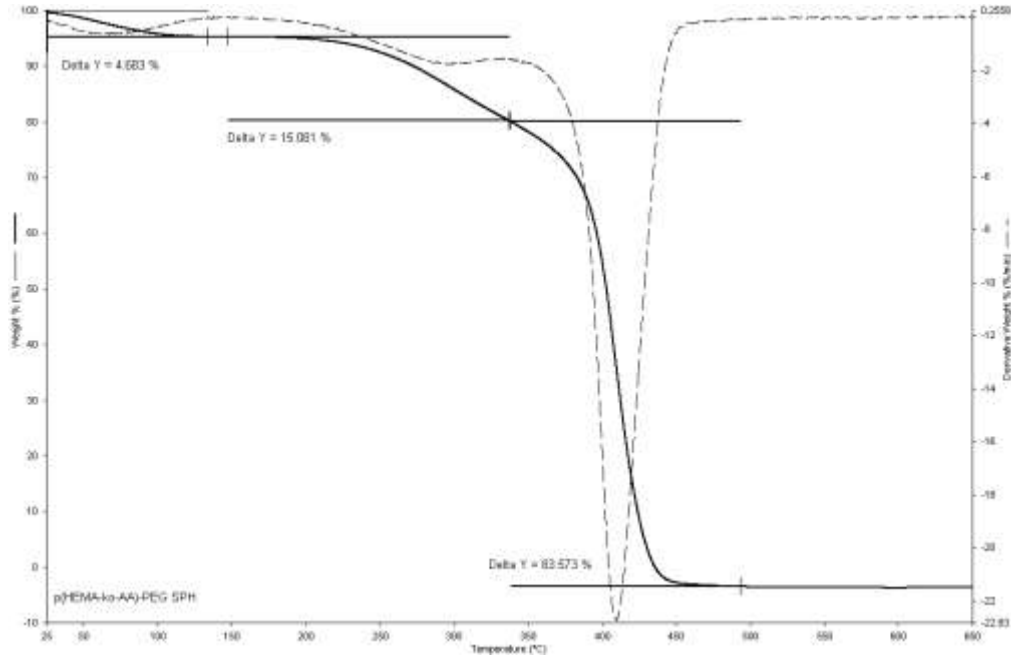
(c)



(d)



(e)



(f)

Şekil 4.12. p(HEMA)-bazlı süpergözenekli hidrojellere ait termogramlar; (a) p(HEMA) SPH, (b) p(HEMA)-jelatin SPH, (c) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (d) p(HEMA)-PEG SPH, (e) p(HEMA-ko-AA) SPH, (f) p(HEMA-ko-AA) SPH.

Termogramlar üzerinde öncelikle malzemelerin içerdikleri nem miktarları 25°C ile 100°C sıcaklık aralığındaki ağırlık kaybına bağlı olarak saptanmıştır. Ardından termogramların zamana göre birinci türevi alınarak ağırlıkça kaybın başladığı sıcaklık değeri, termal bozunmanın başlangıcı olarak belirlenmiştir. Hidrojellerin yüzde ağırlıkça nem içerikleri ve ağırlıkça kaybın başladığı sıcaklık değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Termal analiz sonuçları.

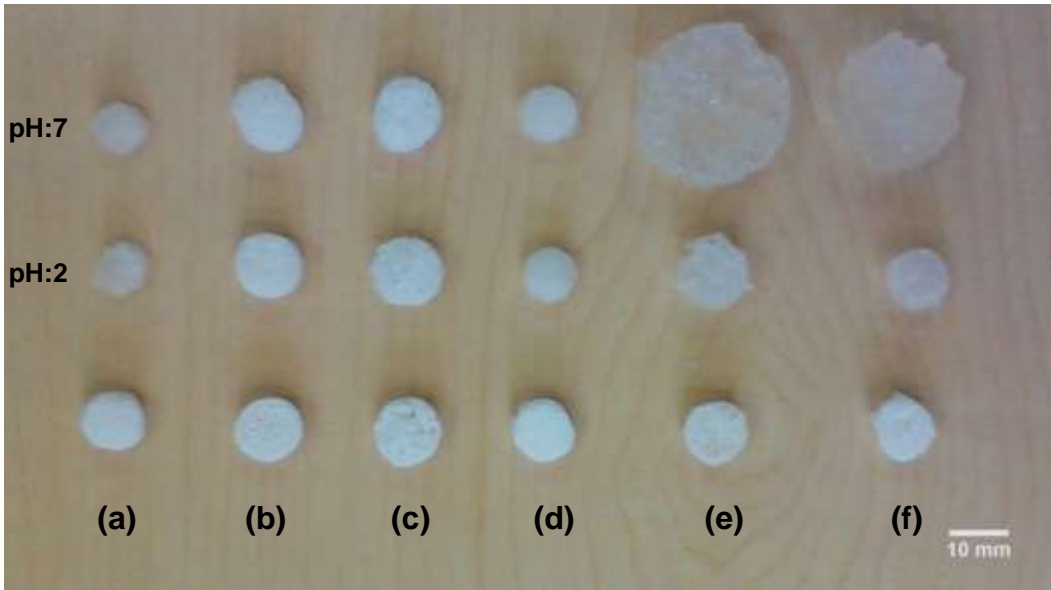
Süpergözenekli Hidrojel	Nem İçeriği (% Ağırlık)	Termal Bozunmanın Başlangıcı (°C)
p(HEMA) SPH	4.97	257.5
p(HEMA)-jelatin SPH	4.02	232.5
P(HEMA)-jelatin SPH-IPN	3.93	238.5
p(HEMA)-PEG SPH	5.12	258.0
p(HEMA-ko-AA) SPH	2.06	280.0
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	3.20	282.5

Çizelge 4.4'teki değerler incelendiğinde, p(HEMA) SPH, ve p(HEMA)-PEG SPH'lerinin termal bozunmasının birbirine yakın sıcaklıklarda başladığı görülmektedir. Jelatinin yapıya katılması ile hazırlanan p(HEMA)-jelatin SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH-IPN yapılarının bozulması daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşmiştir. Akrilik asitin yapıya katılması ile sentezlenen p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin termal bozunması ise daha yüksek sıcaklık değerlerinde başlamaktadır. Elde edilen sonuçlar kopolimerizasyon ile termal stabilitenin arttığını göstermiştir. Yapılan bir çalışmada akrilik-bazlı ağ yapı içeren p(HEMA-ko-AA) süpergözenekli hidrojeller Bis varlığında çapraz bağlanarak sentezlenmiş ve yapılan termal analiz sonucunda, p(HEMA-ko-AA) SPH'inin termal özelliklerinin iyileştiği ve sırasıyla 215°C ve 170°C 'de bozunmaya başlayan p(HEMA) ve pAA'dan farklı olarak hidrojelin 245°C'de bozunmaya başladığı belirtilmiştir (Ray et al., 2008). Sonuç olarak p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN örneklerin tamamının yaklaşık 425°C'de toplam kütlelerinin %90'ından fazlasını kayb ettikleri, 500°C civarında ise kütle kayıplarının (> %95) tamamlandığı görülmektedir. Çalışma kapsamında hazırlanan tüm hidrojellerin bozunma sıcaklıkları, 121°C'den yüksektir. Bu durum, hazırlanan hidrojellerin sterilizasyonu için otoklavın kullanılabilmesi nedeniyle avantajlıdır.

4.2.3. Şişme çalışmaları

4.2.3.1. Şişme kinetiğinin incelenmesi

Çalışma kapsamında hazırlanan süpergözenekli hidrojellere ait şişme deneyleri kuru halde 12 mm çap ve 4 mm kalınlığa sahip disk formundaki hidrojellerle yürütülmüştür. 37°C'de yapay mide (SGF, pH:2) ve bağırsak (SIF, pH:7) ortamlarından belirli zaman aralıklarında uzaklaştırılan örneklerin şişme oranları (Q), Eşitlik 3.1 kullanılarak kuru temelde hesaplanmıştır. Şişme kinetiğine ait veriler Ek-1'de sunulmuştur.

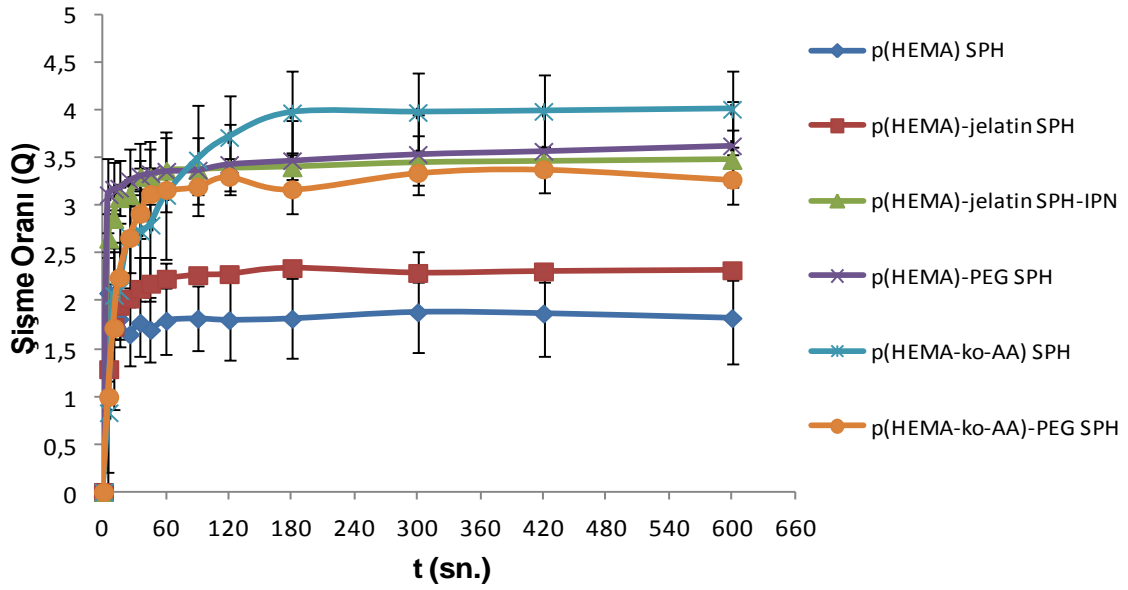


Şekil 4.13. p(HEMA)-bazlı doku iskelelerinin genel görüntüsü: (a) p(HEMA) SPH, (b) p(HEMA)-jelatin SPH, (c) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (d) p(HEMA)-PEG SPH, (e) p(HEMA-ko-AA) SPH, (f) p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH; kuru halde (en altta), SGF içerisinde şişme sonrası (ortada), SIF içerisinde şişme sonrası (en üstte).

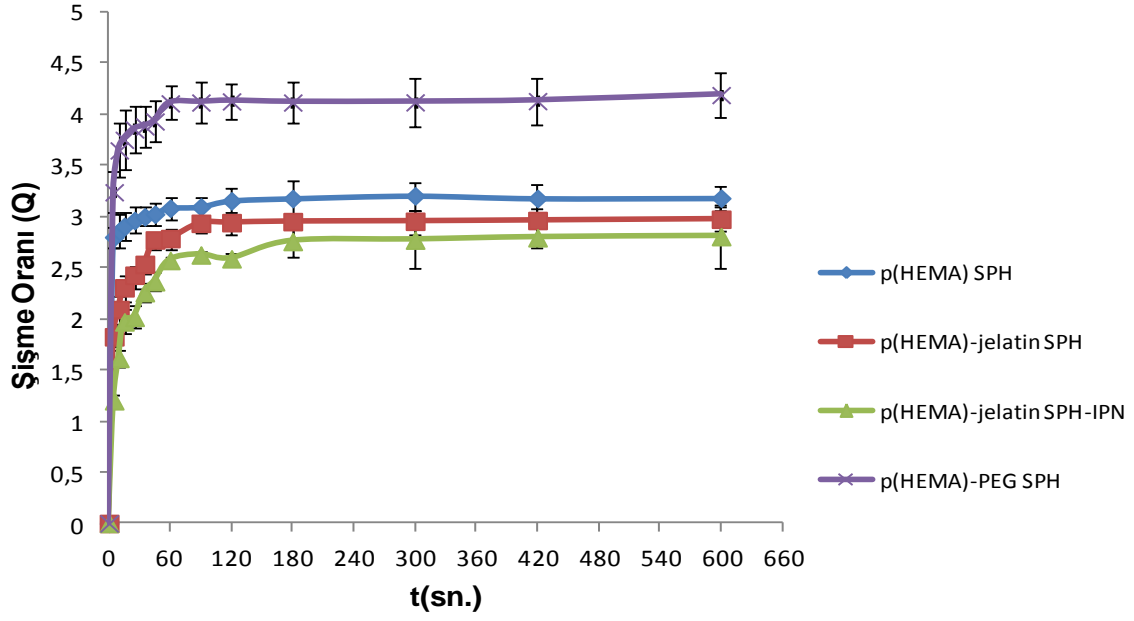
Şekil 4.13'de süpergözenekli hidrojellerin şişme öncesi, ve yapay mide (pH:2) ve bağırsak (pH:7) ortamındaki şişme sonrası fotoğrafları verilmiştir. p(HEMA) ve p(HEMA)-PEG SPH'lerinin yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki şişme sonrası büzüştükleri görülmektedir. p(HEMA)-jelatin SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerinin yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki şişme sonrası hacimlerinde bir değişim gözlenmemiştir. p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri yapay mide ortamındaki şişme sonrası belirgin bir hacim değişimi göstermemiştir. Yapay bağırsak ortamındaki şişme sonrası, kuru p(HEMA-ko-AA) SPH örneğinin hacmi yaklaşık 18 kat artarken, kuru p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH örneğinin hacmi yaklaşık 12 kat artmıştır. Bu durum, akrilik asitten gelen karboksil gruplarının suyla

etkileşiminin fazla olmasına bağlı olarak yapı içerisinde giren su miktarının artması ile açıklanabilir. Tüm hidrojel, her iki pH ortamında şişme sonrası, orijinal şekillerini korumuştur.

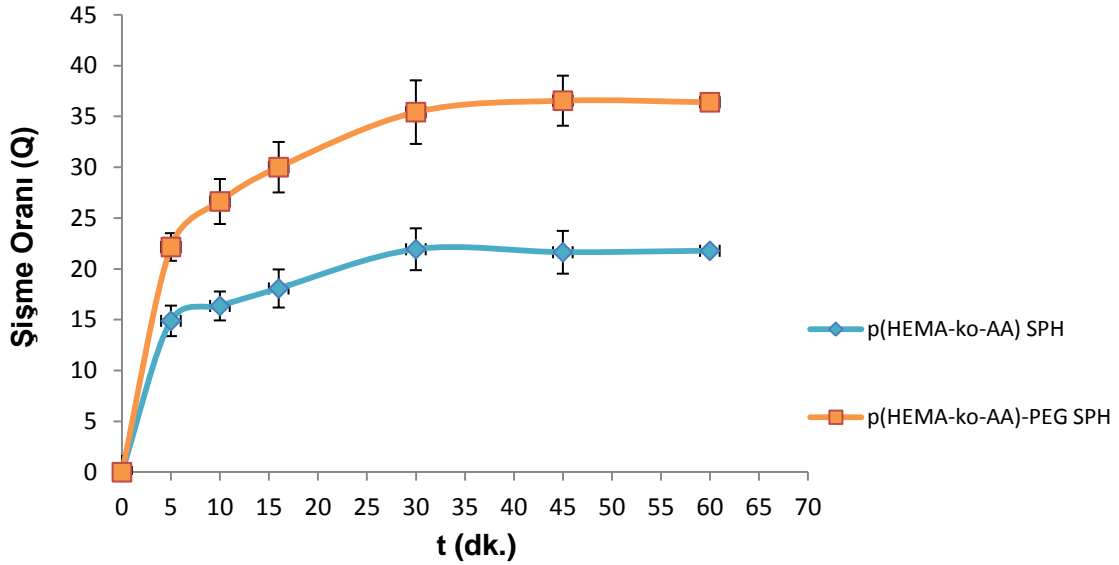
Hidrojellerin şişme oranlarının (Q) zamana karşı çizilmesiyle elde edilen grafikler Şekil 4.14, ve Şekil 4.15. a ve b'de verilmiştir. Herbir hidrojel için 3 paralel örnek çalışılmış ve standart sapma değerleri de bu grafikler üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Hidrojellerin yapay mide ortamı (pH:2) içerisinde şişme kinetiği grafiği.



(a)



(b)

Şekil 4.15. Hidrojellerin yapay bağırsak ortamı (pH:7) içerisinde şişme kinetiği grafikleri; (a) p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH, (b) p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH.

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15.a ve b incelendiğinde p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH'lerin her iki pH değerinde yaklaşık 1 dk.'da dengeye ulaştıkları görülmektedir. p(HEMA-ko-AA) SPH ve

p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri ise pH:2 değerinde yaklaşık 1 dk.'da dengeye gelirken, pH:7 değerinde yaklaşık 30 dk.'da denge şişme değerine ulaşmaktadır. Çizelge 4.5'te hidrojellerin pH:2 ve 7'deki ortamlara ait denge şişme oranları (Q) verilmiştir.

Çizelge 4.5. Hidrojellerin farklı pH değerlerindeki denge şişme oranları (Q).

Süpergözenekli Hidrojel	Şişme Oranı (Q) (pH:2, 37°C)	Şişme Oranı (Q) (pH:7, 37°C)
p(HEMA) SPH	1.77 ± 0.054	3.11 ± 0.055
p(HEMA)-jelatin SPH	2.35 ± 0.001	2.94 ± 0.058
P(HEMA)-jelatin SPH-IPN	3.49 ± 0.033	2.63 ± 0.084
p(HEMA)-PEG SPH	3.66 ± 0.067	4.12 ± 0.032
p(HEMA-ko-AA) SPH	3.99 ± 0.048	21.79 ± 0.046
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	3.29 ± 0.051	36.13 ± 0.063

Çizelge 4.5'te verilen şişme oranları incelendiğinde, nötral bir polimer olan p(HEMA) SPH'lerinin her iki pH değerinde benzer şişme oranlarına sahip olması beklenmektedir. Ancak, monomer içerisindeki metakrilik asitten (<=%1.5) kaynaklanan az miktarda karboksil gruplarının varlığı, yüksek pH değerlerinde iyonlaşp yapıya su girişini arttırmakta, düşük pH değerlerinde ise hidrojelin büzüşmesine neden olmaktadır. Bu durum sentezlenen hidrojelin asidik pH'da büzüşmesine neden olmuştur.

p(HEMA)-jelatin SPH'nin, pH:2 ve pH:7 ortamları içerisindeki şişme davranışları incelendiğinde; p(HEMA)-jelatin SPH'lerin her iki pH değerinde birbirine yakın şişme değerlerine sahip oldukları gözlenmiştir. HEMA'dan kaynaklanan az miktardaki karboksil gruplarının hidrojelin büzüşmesi üzerindeki etkisi, katyonik bir polimer olan jelatinin düşük pH değerlerinde iyonlaşarak yapı içerisine olan su girişini arttırması sonucu gözlenmemiştir. p(HEMA)-jelatin SPH'lerin yapay bağırsak ortamı içerisindeki şişme değeri ise p(HEMA) SPH'ine göre daha düşüktür. Jelatin molekülünün yapıya katılıp mevcut ağ yapı içerisinde dallanması, polimer zincirlerini daha sıkı bir hale getirmiş ve su moleküllerinin hidrojel yapıya difüzyonu kısıtlanmıştır. p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin, katyonik yapıdaki jelatinin çapraz bağlanması sonucu düşük pH değerinde (pH:2), pH:7'ye oranla daha fazla

şıştığı gözlenmiştir. p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerin SIF ortamı içerisinde p(HEMA) SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH'lere oranla daha düşük bir şişme oranına sahip olması ise, jelatinin çapraz bağlanması sonucu oluşan IPN yapı sonucu polimer zincir esnekliğinin azalmasına bağlanabilir. p(HEMA)-PEG SPH örnekler, gözenek oluşturucu (porojen) PEG'ün suda çözünen bir polimer olması ve sentez sonrası yıkama basamağında yapıdan uzaklaşması sonucu gözenek boy çeşitliliği ve gözeneklilik oranında artış göstermişlerdir. Literatürde yer alan bir çalışmada gözeneksiz yapıdaki N,N-dimetilaminoetil metakrilat sülfat (DMAEMASA) ve kopolimeri N,N-dimetilakrilamid (DMAm) [P(DMAEMASA-co-DMAm)] jeller, gözenek oluşturucu ajan PEG varlığında hazırlanmış ve şişme davranışları üzerindeki farklılıklar incelenmiştir (Gürdağ and Gökalp, 2011). PEG varlığında hazırlanan gözenekli hidrojelatinin şişme oranlarının arttığı belirtilmiştir. Çalışma kapsamında hazırlanan p(HEMA)-PEG SPH'inin pH:2 ve pH:7 ortamları içerisindeki şişme davranışları incelendiğinde; her iki pH değerinde p(HEMA) SPH'ine göre daha yüksek şişme oranlarına sahip olduğu görülmektedir. HEMA'dan kaynaklanan az miktarda karboksil gruplarının asidik ortamda hidrojelatin büzülmesi üzerindeki etkisi, gözenek oluşturucu ajan PEG'ün yapıya katılması sonucu oluşan nano boyuttaki gözeneklerin yapıya giren su miktarını artırması nedeniyle gözlenmemiştir. p(HEMA)-PEG SPH'lerinin yapısındaki nano boyuttaki gözeneklerin varlığı, pH:7 ortamında da hidrojelatin içerisine su girişini arttırmış, sonuç olarak bu pH değerinde p(HEMA)-PEG SPH'lerinin, p(HEMA) SPH'lerinden daha yüksek şişme oranına sahip olduğu gözlenmiştir.

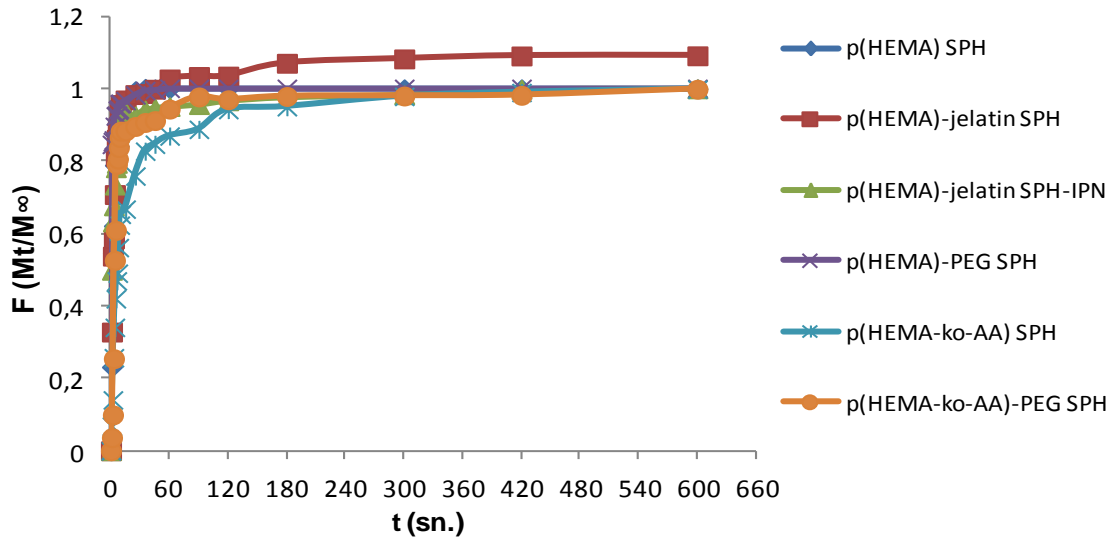
p(HEMA-ko-AA) SPH'ler, nötral p(HEMA) SPH'lerinden farklı olarak anyonik yapıdadır ve polimer zincirine bağlı olan iyonlaşabilir asit gruplarının (karboksilik asit) varlığına bağlı olarak pH'ya duyarlıdır. Akrilik asitin (AA) pKa değeri yaklaşık 4.2 olduğundan, bir akrilik asit polimeri ya da kopolimeri 3'ün altındaki pH'larda büzülürken, 5'in üstündeki pH'larda tamamen şişmektedir (Gemeinhart, 1999). Bu nedenle p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerin şişme oranlarının artan pH değerine bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu SPH'ler akrilik asitten gelen karboksil gruplarının suyla etkileşiminin fazla olması nedeniyle, yapı içlerine daha fazla miktarda su almış ve p(HEMA-ko-AA) SPH 'lerin ağırlığı yaklaşık 20 kat, p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerin ağırlıkları ise yaklaşık 36 kat artmıştır. p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerin, p(HEMA-ko-AA) SPH'lere oranla daha yüksek şişme

oranına sahip olması, suyun yapı içerisinde difüzyonunun ilk olarak yaklaşık 250 μm boyutundaki içsel bağlı gözeneklerden başlaması ve sonrasında hidrojel duvarındaki küçük boyutlu (5-10 μm) gözeneklerden yapıya alınmasından kaynaklanmaktadır. Akrilik asit içeren SPH'lerin, nötral ortamda sahip oldukları denge şişme oranlarının, geleneksel hidrojellere (Özdemir, 2006) göre 15-20 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

4.2.3.2. Şişme kinetiğinin matematiksel analizi

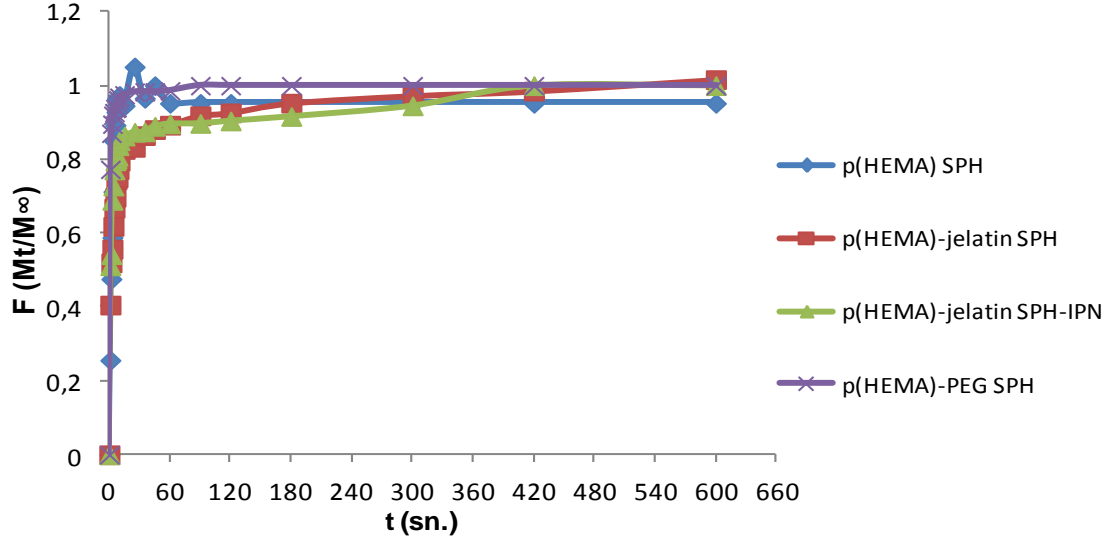
Hidrojellerin şişme kinetiğinin analizi için en yaygın kullanılan yöntem Peppas tarafından tanımlanan "güç yasası"dır (Eş.2.1). Bu eşitlik, çözücünün polimerdeki genel taşınım davranışını tanımlamak ve n değerine bağlı olarak difüzyon mekanizmasının türünü belirlemek için kullanılmaktadır. "Eş. 2.1" kullanılarak ($M_t/M_\infty \leq 0.6$ olduğu durumda) n ve k değerlerinin bulunması, böylece çözücünün polimerdeki genel (Fick yasasına uyan ya da uymayan) transport davranışının tanımlanması mümkündür.

SPH ve SPH-IPN örnekler için her iki pH'da (pH:2 ve pH:7) F (M_t/M_∞) değerleri hesaplanmış ve zamana karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.16 ve 4.17.a ve b'de yer alan grafiklerdeki eğriler elde edilmiştir. Bu eğriler örneklerin denge şişme değerine ulaşma çabukluğunu göstermektedir.

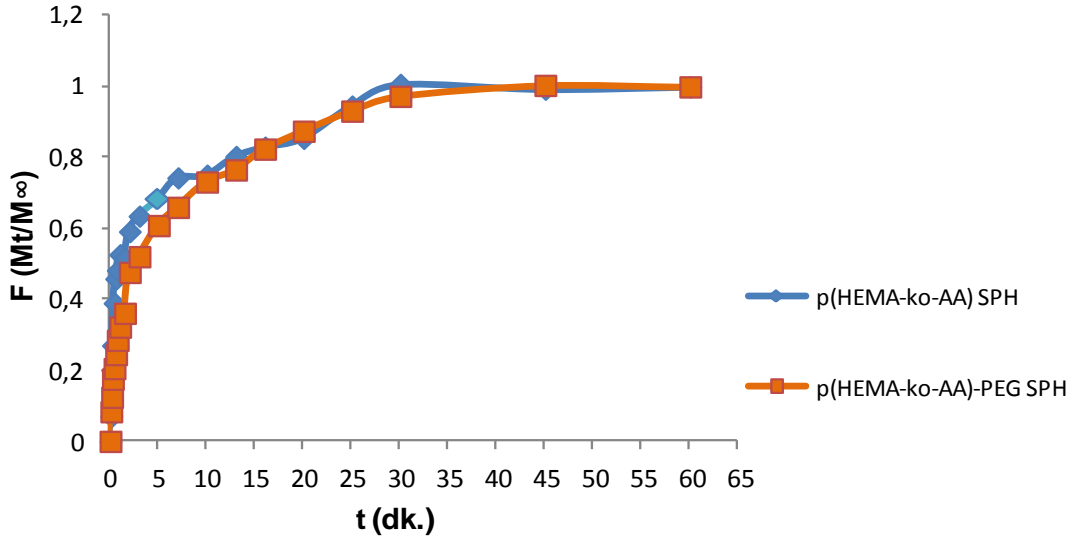


Şekil 4.16. SPH ve SPH-IPN'lerin yapay mide ortamı (pH:2) içerisinde kesirsel şişme (F)-zaman eğrileri.

Şekil 4.16'da p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin yapay mide ortamı (pH:2) içerisindeki F-zaman grafikleri görülmektedir. Hidrojellerin bu ortamdaki denge şişmesine ulaşma zamanları, başlangıçta gerçekleşen hızlı şişme ile karakterize edilmiş ve birbirine çok benzer çıkmıştır.



(a)



(b)

Şekil 4.17. SPH ve SPH-IPN'lerin yapay bağırsak ortamı (pH:7) içerisinde kesirsel şişme (F)-zaman eğrileri; (a) p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH, (b) p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH.

Şekil 4.17.a'da p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH'lerinin yapay bağırsak ortamındaki (pH:7) F-zaman eğrileri

verilmiştir. Bu dört hidrojel için bu ortam içerisindeki dengeye ulaşma süreleri birbirine oldukça yakındır. Akrilik asidin yapıya dahil edilmesi ile edilen p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin F-zaman eğrileri şekil 4.17.b'de verilmiştir. Bu iki hidrojel için denge şişmesine ulaşma zamanlarının birbirine çok benzer olduğu ancak başlangıçtaki şişme hızlarının diğer hidrojellere göre yavaş olduğu gözlemlenmiştir.

“Fickian” ya da “Case I” difüzyon mekanizmasında, polimer zincirleri yüksek hareketliliğe sahiptir ve su kolayca kauçuğumsu ağ yapısına girebilir. Bu durumda, çözücünün difüzyon hızı, R_{dif} , polimer zincirlerinin gevşeme hızından, R_{gev} , daha yavaştır ($R_{dif} \ll R_{gev}$). Tipik olarak bir polimer düzlem (burada silindir) için “Case I” difüzyon, polimerin ağırlığındaki artış ile absorpsiyon süresinin karekökü arasındaki doğrusal ilişki ile karakterize edilir. “Non-fickian” difüzyon mekanizmasında, polimer zincirleri suyun hızlı bir şekilde ağ yapısına girmesine izin verecek kadar hareketli değildir. Birçok grup tarafından çalışılan “Non-fickian” difüzyon mekanizması, polimer zincirlerinin gevşeme hızı ile difüzyon hızı arasındaki bağıl orana bağlı olarak “Case II transport” ve “Anomalous transport” şeklinde ikiye ayrılmıştır. “Case II transport”, difüzyon mekanizması polimer zincirlerinin gevşeme hızına göre çok hızlı gerçekleştiğinde ($R_{dif} \gg R_{gev}$) baskın olan durumdur. Bu durumda çözücü absorplama hızı ile zaman arasında doğrusal bir ilişki mevcuttur. “Anomalous transport” ise difüzyon ve zincir gevşeme hızları birbirine yakın olduğunda, yani her ikisinin de etkin olduğu durumdur ($R_{dif} \cong R_{gev}$). Silindir şeklindeki sistemler için; $n=0.45$ değeri Fickian difüzyonu, $0.45 < n < 0.89$ değeri Anomalous transportu ve $n=0.89$ değeri Case-II transportu ifade etmektedir. n ve k değerleri, $\log F$ değerlerinin $\log t$ değerlerine karşı grafiğe geçirilerek lineer regresyon ile doğru eğimlerinin hesaplanması sonucu bulunmaktadır (Eş. 4.1).

$$\log(F) = n \log t + \log k \quad (4.1)$$

n ve k değerleri, $M_t/M_\infty \leq 0.6$ olduğu durumda “Eş. 4.1”i kullanarak bulunabilir. p(HEMA)-PEG SPH'leri dışında diğer p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'ler $M_t/M_\infty \leq 0.6$ koşulunu sağlamıştır. Hidrojellere ait n ve k değerleri regresyon katsayıları (R^2) ile birlikte Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'ler için n, k ve R² değerleri.

Süpergözenekli Hidrojel	pH:2			pH:7		
	n	k	R ²	n	k	R ²
p(HEMA) SPH	0.936	0.559	0.984	0.773	0.543	0.937
p(HEMA)-jelatin SPH	0.545	0.339	0.945	0.297	0.410	0.985
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	0.285	0.504	0.975	0.270	0.493	0.873
p(HEMA-ko-AA) SPH	0.768	0.115	0.964	0.546	0.297	0.979
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	1.855	0.228	0.985	0.440	0.278	0.986

Çizelge 4.6 incelendiğinde hidrojellerin yapay mide ortamı (pH:2) ve yapay bağırsak ortamı içerisindeki n ve k değerleri görülmektedir. p(HEMA) SPH için yapay mide sıvısı içerisindeki n değeri Case II transportu ifade ederken, yapay bağırsak sıvısı içerisindeki n değeri ise anomalous transportu ifade etmektedir. Yani ortamın pH'ı asidik olduğunda polimer zincirlerinin hareketliliği azalmaktadır. Yapıya doğrusal yapıda jelatinin katılması ile elde edilen p(HEMA)-jelatin SPH'in yapay mide sıvısı ve yapay bağırsak ortamı içerisindeki n değerleri Fickian difüzyon mekanizmasını ifade etmektedir. Jelatinin yapıya katılması ile gevşeme kontrollü transport mekanizmasının etkin olduğu gözlenmektedir. pH'ın yükselmesi ile n değerinin düştüğü yani difüzyon hızının azaldığı gözlenmiştir. p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerde yapıdaki jelatinin çapraz bağlanması ile daha sıkı hale gelen polimer zincirleri ile her iki pH değerinde çözücü difüzyon hızı p(HEMA)-jelatin SPH'ye göre azalmıştır. p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin yapay mide ortamı içerisindeki n değeri anomalous difüzyon mekanizmasını ifade ederken, pH'ın daha yüksek olduğu yapay bağırsak ortamı içerisinde Fickian difüzyon mekanizması gözlenmektedir. pH değişiminin hidrojelin zincir gevşeme mekanizması üzerinde etkin olduğu söylenebilir. p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerin yapay mide ortamı içerisindeki transport mekanizması Case II ile karakterize edilirken, yapay bağırsak ortamında ise Fickian transport ile karakterize edilebilir. İki pH ortamındaki n değerleri arasındaki yüksek fark, pH değişiminin polimer zincirinin gevşeme mekanizması üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermektedir.

SPH ve SPH-IPN'lerin Fick yasasına uygun difüzyon davranışı sergilediklerini kabul ederek, Bölüm 2.6.1'de ayrıntılı olarak yer verilen, kesirsel şişme (F)

değerini difüzyon katsayısına bağlayan Eş. 2.3 yardımıyla kinetik veriler değerlendirilmiştir.

Eş. 2.3, II. Fick kanununun basit sınır koşulları içinde çözümü sonucunda elde edilmiştir ve disk formundaki geometriler için geçerlidir. Bu eşitliğin kullanımında, diskin kenarları boyunca olan difüzyon ihmal edilmekte ve difüzyonun tek boyutlu olduğu kabul edilmektedir.

SPH ve SPH-IPN'lerin her iki pH'da (pH:2 ve pH:7) F değerleri zamanın kareköküne karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen $F-t^{1/2}$ eğrilerinde $F \leq 0.6$ olduğu bölgede F ile $t^{1/2}$ arasındaki ilişkinin doğrusal çıktığı görülmüştür. Eğrilerin doğrusal bölgesindeki eğim değerlerinden hidrojenlerin difüzyon katsayıları hesaplanmış ve regresyon katsayıları (R^2) ile birlikte topluca Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. SPH ve SPH-IPN örneklerinde suyun farklı pH'lardaki difüzyon katsayıları (Disk yarıçapı= 6mm).

Süpergözenekli Hidrojel	pH:2		pH:7	
	D(m ² /s)	R ²	D(m ² /s)	R ²
p(HEMA) SPH	2.10×10 ⁻⁶	0.931	1.48×10 ⁻⁶	0.988
p(HEMA)-jelatin SPH	8.77×10 ⁻⁷	0.987	7.91×10 ⁻⁷	0.972
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	1.17×10 ⁻⁶	0.969	1.08×10 ⁻⁶	0.959
p(HEMA-ko-AA) SPH	5.47×10 ⁻⁷	0.989	1.69×10 ⁻⁸	0.965
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	5.98×10 ⁻⁷	0.970	1.31×10 ⁻⁸	0.995

Geleneksel (gözeneksiz) hidrojenlerin şişme süreçlerindeki karakteristik şişme süresi (t) değerleri, takip eden eşitlikle hesaplanmaktadır:

$$\tau = L^2 / D \quad (4.2)$$

Bu eşitlikte; L, jelin karakteristik uzunluğu; D ise, çözücü içinde jelin difüzyon katsayısıdır. Küresel ya da silindirik bir hidrojen için karakteristik uzunluk, yarıçap; tabaka şeklindeki bir hidrojen için, kalınlığın yarısıdır. Hidrojen ağ yapılarının difüzyon katsayısı 10⁻¹¹ m²/s mertebelerindedir (Tanaka ve Fillmore, 1979). Buna göre, 2 mm kalınlığındaki geleneksel p(AAm-ko-AA) hidrojeninin şişmesi, yaklaşık 12 saat

sürmektedir (Chen et al., 1999). Sunulan çalışmada hazırlanan SPH ve SPH-IPN'lerin farklı pH'lardaki şişme süreleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Hidrojel disklerin denge şişmesine ulaşma süreleri.

Süpergözenekli Hidrojel	τ (s)	τ (s)
	pH:2	pH:7
p(HEMA) SPH	17.16	24.32
p(HEMA)-jelatin SPH	41.06	45.51
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	30.77	30.33
p(HEMA-ko-AA) SPH	65.81	2195.12
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	60.12	2727.27

Çalışma kapsamında incelenen hidrojel örneklerin difüzyon katsayıları, literatürdeki benzer jellere ait sonuçlarla karşılaştırılmış ve uygun sınırlar içerisinde oldukları bulunmuştur. Örneğin; denge şişme süresi 4.1 dk. ve yarıçapı 5.5 mm olan p(AAm-ko-AA) süpergözenekli hidrojel diski (Chen et al., 1999) için Eş. 4.4'ten yararlanılarak hesaplanan difüzyon katsayısının, yaklaşık $1.23 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$ olduğu saptanmıştır.

4.2.4. Mekanik dayanım analiz sonuçları

Çalışmada hazırlanan SPH ve SPH-IPN'lerin mekanik dayanımlarının belirlenmesi amacıyla yürütülen sıkıştırma testleri sonucunda elde edilen mekanik dayanım testi gerilim-gerinim eğrileri Ek-2'de, bu eğriler üzerinden hesaplanmış elastik modül değerleri (E) ise, standart sapma değerleri ile birlikte Çizelge 4.9'da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin elastik modül değerleri.

Süpergözenekli Hidrojel	Elastik Modül (N/mm²)
p(HEMA) SPH	0.004 ± 0.001
p(HEMA)-jelatin SPH	0.010 ± 0.001
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	0.022 ± 0.010
p(HEMA)-PEG SPH	0.030 ± 0.009
p(HEMA-ko-AA) SPH	0.012 ± 0.004
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	0.035 ± 0.001

Süpergözenekli hidrojellerin kullanımı sırasında karşılaşılan en büyük sorun, şişme sonrasında yapının mekanik dayanımını büyük ölçüde kaybetmesidir. İkinci bir polimerin ağ yapıya katılması ile elde edilen iç içe geçmiş ağ yapıların sentezlenmesi SPH'lerin mekanik dayanımını önemli ölçüde arttırmaktadır (Qui and Park, 2003).

Sunulan çalışmada, SPH'lerin çapraz bağlayıcı varlığında ve yokluğunda modifiye edilmesiyle elde edilen yarı-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH'lerin elastik modül değerinin p(HEMA) SPH'lere göre 2.5 kat arttığı, tam-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerinin elastik modül değerlerinin ise 5.5 kat arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla jelatinin GP ile çapraz bağlanması sonucu hidrojellerin mekanik dayanımını önemli ölçüde arttığı söylenebilir.

Gözenek oluşturucu polimer PEG varlığında hazırlanan p(HEMA)-PEG SPH'lerin elastik modül değeri, p(HEMA) SPH'lere göre 10 kat artmıştır. p(HEMA)-PEG SPH'lerinin, az miktarda suda iyonlaşabilir grup içermesi sonucu, düşük şişme oranına sahip olması ve artan gözeneklilik oranı, hidrojellerin mekanik açıdan iyileşmesini sağlamıştır. Akriolik asitin yapıya katıldığı kopolimer p(HEMA-ko-AA) SPH'lerin elastik modül değeri, p(HEMA) SPH'lere göre 3 kat artmıştır. Yapılan bir çalışmada kopolimer yapı oluşumunun hidrojellerin mekanik dayanımında bir artış sağladığı ancak bunun önemli ölçüde olmadığı belirtilmiştir (Gürdağ and Öz, 2009). p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin elastik modül değerinin ise p(HEMA-ko-AA) SPH'lerine göre 3 kat artması, yüksek şişme oranına bağlı olarak oluşabilecek

kırılğanlığın, arttırılmış gözeneklilik oranı ile aşılabilmiş olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, PEG'ün gözenek oluşturucu ajan olarak kullanımının, SPH'lerin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesinde etkili olduğu gözlenmiştir.

4.2.5. Yoğunluk analizi

Çalışma kapsamında hazırlanan süpergözenekli hidrojellerin yoğunluk tayini, her bir hidrojel için 3 paralel örnek ile yürütülmüş ve sonuçlar standart sapma değerleri ile birlikte Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerin yoğunluk değerleri.

Süpergözenekli Hidrojel	Yoğunluk (g/mL)
p(HEMA) SPH	0.475 ± 0.009
p(HEMA)-jelatin SPH	0.559 ± 0.044
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	0.368 ± 0.013
p(HEMA)-PEG SPH	0.335 ± 0.024
p(HEMA-ko-AA) SPH	0.887 ± 0.170
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	0.735 ± 0,062

Yoğunluk tayininde elde edilen sonuçlar, gözenekliliğe bağlı olarak hidrojellerin yapısında yüksek oranda bulunan hava nedeniyle düşük yoğunluğa sahip olduklarını göstermiştir. p(HEMA)-jelatin SHP'lerinin yoğunluğu jelatinin yapıya katılması nedeniyle p(HEMA) SHP'lerinininkine göre daha yüksektir. Yapıdaki jelatinin çapraz bağlandığı p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerinin yoğunluğu p(HEMA) SHP'lerinininkine kıyasla biraz azalmıştır. p(HEMA)-PEG SPH'lerinin yoğunluğu, artan gözeneklilik oranı nedeniyle p(HEMA) SPH'lerinin yoğunluğundan daha düşüktür. Akriolik asitin yapıya katıldığı kopolimer p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin yoğunluğu diğer hidrojellere göre oldukça yüksektir.

4.2. Hidrojellerden Protein Salımı ile İlgili Sonuçlar ve Tartışılması

Önemli bir tedavi ajanı olan protein yapıdaki ilaçların, yüksek molekül ağırlıklarına ve sınırlı kararlılığa sahip olmaları vücuda etkin olarak verilmelerinde sorun yaratmaktadır. Klasik tedavilerde, protein yapıdaki ilaçların salımı sık aralıklarla tekrarlanan enjeksiyon yöntemi ile yapılmaktadır. Kan plazmasında tedavi edici bir profil oluşturabilmek ancak ilaçların tekrarlanan enjeksiyonu ile sağlanabilmektedir. Bu durum harcanan etken madde ve hasta uyumu açısından dezavantaj oluşturmaktadır. Bu nedenle, proteinlerin salımında klinik açıdan da en uygun yöntem olan oral uygulamalar tercih edilmektedir. Ancak bu tip ilaçların oral yollu alımında, ilaçların mide-bağırsak ortamının asidik özelliği ve içerdiği enzimler sonucu kolayca bozunması ve bağırsak duvarının düşük geçirgenliğine bağlı olarak düşük biyoyararlanım elde edilmektedir. Zayıf biyoyararlanımı arttırmak ve fizyolojik engelleri ortadan kaldırmak için yeni polimerik-taşıyıcı sistem tasarımları gerekmektedir.

Biyoadeziv ilaç salım sistemleri, bölgeye özgü salım sağlayarak protein ilaçların biyoyararlanımı arttırması açısından büyük kabul görmektedir ve özellikle akrilik asit pH duyarlılığı ve biyoadeziv özelliği ile bu formülasyonlarda yer almaktadır.

Sunulan çalışmada 6 farklı p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN yapı hazırlanmış ve bu yapıların protein yapıdaki ilaçların oral kullanımına yönelik kontrollü salımında model protein taşıyıcı sistem olarak in vitro protein salım karakteristikleri BSA ve fibrinojen varlığında incelenmiştir. Hazırlanan hidrojeller arasında p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri içerdikleri iyonlaşabilir akrilik asit nedeniyle pH-duyarlı özellik kazanmıştır. Mide-bağırsak kanalı boyunca karşılaşılabilecek pH değerleri dikkate alınarak yapay mide (pH:2) ve yapay bağırsak (pH:7) ortamları içerisinde şişme çalışmaları yürütülmüştür. 6 hidrojel içerisinde, yapısında akrilik asit bulunan bu iki SPH'in pH artışı ile şişme oranlarında artış gözlenmiştir. Ayrıca, yapıya katılan akrilik asitin hidrojellere kazandıracığı biyoadeziv özellik sayesinde hidrojeller bölgesel lokalizasyon sağlayıp, bölgede kalış süreleri uzatılabilecektir. Hidrojellerin yüksek şişme oranlarına bağlı olarak, vücut sıvılarını emip hızla şişerek bağırsak duvarında mekanik basınç oluşturacak ve böylelikle etken maddenin biyoyararlanımının arttırılmasını sağlayacaktır.

4.3.1. Hidrojellere protein yüklenmesi

Çalışma kapsamında incelenen hidrojellere BSA ve FG yüklemesi, jellerin sahip oldukları yüksek şişme hızları nedeniyle çözelti emdirme yöntemiyle bir mikropipet yardımıyla çok kısa sürede ve geleneksel hidrojellere göre oldukça yüksek kapasitelerde (30-370 mg BSA/g kuru jel; 37-340 mg FG/g g kuru jel) yapılabilmektedir. Protein yükleme basamağında, hidrojellerin denge şişme değerleri ve bu değere ulaşma süreleri dikkate alınmış; p(HEMA), p(HEMA)-jelatin, p(HEMA)-jelatin ve p(HEMA)-PEG SPH'lerinin yükleme basamağı dengeye gelme süreleri olan 1 dk. içerisinde tamamlanırken, p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin yükleme basamağı dengeye gelme süreleri olan 30 dk. içerisinde kademeli olarak tamamlanmıştır. Hızlı yükleme basamağı ile, geleneksel hidrojellerde günlerce süren ilaç yükleme prosesine bağlı olarak oluşan protein denatürasyonunun önüne geçilmiştir.

Emdirme yöntemi ile yükleme, BSA ve FG'in fosfat tampon çözeltisi (pH:7.4) ve yapay bağırsak ortamı (pH:7.0) çözeltisi içerisinde tek bir başlangıç konsantrasyonunda (10 mg/mL) ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Yükleme için iki farklı çözelti ortamının kullanımı; akrilik asit içeren örneklerin (p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH) iki çözelti ortamında farklı şişme oranlarına sahip olmalarındandır. Protein yükleme işlemi sırasında, proteinin hidrojele difüzyonu hidrojel şişmeye devam ederken gerçekleşeceğinden, hidrojin şişme oranı arttıkça difüzlendi protein miktarı da artış gösterecektir. Bu nedenle, çalışma kapsamında hazırlanan SPH ve SPH-IPN'lerin şişme davranışları fosfat tampon çözeltisi içerisinde yürütülmüş ve sonuçlar yapay bağırsak ortamı çözeltisinde elde edilen şişme oranları ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Hidrojellerin SIF (pH:7) ve PBS (pH:7.4) içerisinde şişme oranlarının karşılaştırılması.

Süpergözenekli Hidrojel	Şişme Oranı (Q) (pH:7.0, SIF, 37°C)	Şişme Oranı (Q) (pH:7.4, PBS, 37°C)
p(HEMA) SPH	3.11 ± 0.055	3.63 ± 0.024
p(HEMA)-jelatin SPH	2.94 ± 0.058	2.81 ± 0.010
P(HEMA)-jelatin SPH-IPN	2.63 ± 0.084	2.60 ± 0.023
p(HEMA)-PEG SPH	4.12 ± 0.032	4.18 ± 0.067
p(HEMA-ko-AA) SPH	21.79 ± 0.046	14.26 ± 0.013
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	36.13 ± 0.063	26.70 ± 0.028

Çizelge 4.11'deki şişme oranları incelendiğinde; p(HEMA), p(HEMA)-jelatin, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH'leri her iki çözelti ortamında benzer şişme oranlarına sahipken, p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri yapay bağırsak ortamı (pH:7) çözeltisi içerisindeki şişme oranları fosfat tampon çözeltisi içerisindeki şişme oranlarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle p(HEMA), p(HEMA)-jelatin, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH'leri için stok BSA ve FG çözeltileri fosfat tampon çözeltisi içerisinde hazırlanırken, p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri için stok protein çözeltileri yapay bağırsak ortamı çözeltisinde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.12. Hidrojellerin kuru kütleleri başına yüklenen BSA miktarları.

Süpergözenekli Hidrojel	Yüklenen Protein Miktarı (mg BSA/g kuru jel)
p(HEMA) SPH	53.82 ± 4.70
p(HEMA)-jelatin SPH	28.55 ± 8.42
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	26.59 ± 4.17
p(HEMA)-PEG SPH	46.25 ± 8.43
p(HEMA-ko-AA) SPH*	217.87 ± 0.35
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH*	365.29 ± 1.26

*Yükleme pH:7.0, SIF.

Çizelge 4.12’de verilen BSA yüklü örneklerin salım çalışmaları yürütüldükten sonra FG yüklemesi yapılacak hidrojel sistemler seçilmiş ve Çizelge 4.13’te yükleme miktarları hakkında bilgi verilmiştir. FG yüklenecek model hidrojel seçimine ait ayrıntılar, Bölüm 4.3.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Hidrojellerin kuru kütleleri başına yüklenen FG miktarları.

Süpergözenekli Hidrojel	Yüklenen Protein Miktarı (mg FG/g kuru jel)
p(HEMA) SPH	69.08±0.16
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	36.48±0.14
p(HEMA-ko-AA) SPH*	217.67± 3.50
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH*	340.52± 13.39

*Yükleme pH:7.0, SIF.

Literatürdeki diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda poli(vinil eter)-bazlı amfifilik hidrojellere aynı yöntemle 1 gram kuru jel başına yüklenen BSA miktarı 3 ile 5 mg olarak belirtilmiştir (Gümüşderelioğlu and Kesgin, 2005). Yapılan başka bir çalışmada akrilamid-bazlı süpergözenekli hidrojellere çözelti emdirme metodu ile yüklenen protein miktarı 40-300 mg BSA/g polimer olarak belirtilmiştir. Yüklenen protein miktarının, süpergözenekli hidrojellerin yüksek şişme kapasitelerine bağlı olarak arttığı ifade edilmiştir (Gümüşderelioğlu et al., 2011). Sunulan çalışma kapsamında hazırlanan süpergözenekli hidrojellere yüklenen protein miktarlarının (Çizelge 3.7) geleneksel hidrojellere göre oldukça yüksek olduğu (10-100 kat), benzer yapıdaki süpergözenekli hidrojellere göre ise benzer olduğu gözlenmiştir. Bu durum incelendiğinde, süpergözenekli hidrojellere yüklenen protein miktarının, hidrojelin şişme oranına bağlı olarak değiştiği ifade edilebilir.

4.3.1.1. Protein ilaçların karakterizasyonu

Sığır Serum Albumin’in (BSA) genel özellikleri

Serum albumin, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında en yaygın bulunan proteindir (Ansell, 1839). Kanda bulunan proteinlerin %60’ını oluşturmaktadır. Dolaşım sistemindeki en yüksek konsantrasyona sahip olan

serum albümin, ozmotik kan basıncının %80'ini oluşturarak kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlamaktadır. Kan pH'ının dengelenmesinde başlıca sorumludur (Figge et al., 1991).

Hayvansal bir protein olan Sığır Serum Albumin (BSA), 583 amino asit içeren, 17 disülfid bağı ile çapraz bağlanmış tek zincirli bir proteindir ve serum albüminler sınıfına girer (Brown, 1977; He and Carter, 1992). BSA, yüksek molekül ağırlığına sahip (66 kDa) globüler yapıda bir proteindir. Globüler yapıda olan proteinler, fibröz proteinlerden farklı olarak suda çözünebilirler. Globüler bir protein, yapısındaki amino asit zincirlerinin, polar atomlar molekülün dış yüzeyinde kalacak şekilde dönmesi ve katlanması sonucu suda çözünebilir. Bu dönme ve katlanma, protein moleküllerinin nasıl bir yapıya sahip olacağını belirlemektedir. Globüler proteinlerin çoğu üçüncül ve dördüncül yapıya sahip olmalarıyla karakterize edilir. BSA, üçüncül yapıya sahip bir proteindir.

Fibrinojen'in (FG) genel özellikleri

Fibrinojen koagülasyon mekanizması ve trombozda önemli bir role sahip olan pıhtılaşma proteindir. Plazma proteinlerinin %4'ünü oluşturur. Başlıca fonksiyonunu, kanın pıhtılaşmasına neden olan fibrini oluşturarak gerçekleştirir. Bunun yanı sıra trombosit agregasyonunda görev almaktadır (Lin et al., 2005).

Tüm omurgalıların kan plazmasında mevcut olan fibrinojen, 340 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikoproteindir. Fibrinojen her biri 3 polipeptid zincirinden ($\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ ve γ zincirleri) oluşan, iki benzer molekülün birleşmesiyle meydana gelmiştir ve bu altı zinciri bir arada tutan 29 disülfid bağı bulunmaktadır. Bu peptidlerin en uzununu $\text{A}\alpha$ zinciri 70 kDa molekül ağırlığında ve 610 amino aside sahiptir. $\text{B}\beta$ zinciri 56 kDa ağırlığında ve 461 amino asit, γ ise 48 kDa ağırlığında ve 411 amino asit monomerinden oluşmaktadır. Fibrinojen molekülünün merkezindeki dimerik alan (iki benzer molekülün birleşim alanı) disülfid bağları ile bir arada tutulur (Herrick et al., 1999). Fibrinojen de, BSA'ya benzer şekilde globüler bir proteindir. Üçüncül yapıya sahip olan fibrinojen suda çözünebilir.

Hidrodinamik çap

Proteinlerin hidrodinamik boyutlarının, transport özellikleri üzerindeki rolü “hidrodinamik çap” değerleri kullanılarak tanımlanabilmektedir (Sharma and Carbeck, 2005). “Stokes çapı” olarak da bilinen hidrodinamik yarıçap, çözelti içerisinde protein molekülü ile aynı hızda difüzlendi küresel bir partikülün çapı olarak ifade edilmektedir.

Tez kapsamında kullanılan model protein ilaçların “hidrodinamik çap” değerleri, Einstein-Stokes eşitliği (Eşitlik 4.3) kullanılarak hesaplanmıştır (İmren, 2003).

$$D_0 = kT/3\pi\eta d \quad (4.3)$$

Burada η , çözücünün viskozitesi; k , Boltzman sabiti; T , mutlak sıcaklık; d , hidrodinamik çap ve D_0 , proteinin su ortamındaki difüzyon katsayısıdır. BSA ve FG'nin sudaki difüzyon katsayıları literatürde mevcuttur (Merril et al., 1993; Marder et al., 1969). $k=1.381 \times 10^{-20}$ J/K, $T=310$ K (37°C), $\eta=1$ kg/m.sn (su için) ve ilgili literatürden alınan D_0 değerleri Eşitlik 4.3'de yerlerine konarak, d değerleri bulunmuştur. Çizelge 4.14'te BSA ve FG için D_0 , d ve izoelektrik nokta (pI) (Ge et al., 1998; Tsapikouni et al., 2008) değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.14. Çalışmada kullanılan model proteinlerin özellikleri.

Model Protein	D_0 (cm ² /s)	d (nm)	pI
BSA	5.90×10^{-7}	7.7	4.6
FG	2.27×10^{-7}	20.0	5.8

Proteinlerin hidrodinamik çap değerleri ile bir çözelti ortamındaki difüzyon katsayıları ile ilişkisi Eş. 4.3'te ifade edilmiştir. Buna göre bir protein molekülün hidrodinamik boyutları, molekülün çözelti ortamındaki difüzyon katsayısı ile ters orantılıdır. Buna bağlı olarak proteinlerin hidrojel yapılardan gerçekleşen salım hızları, hidrodinamik çap değerleri ile yorumlanabilmektedir.

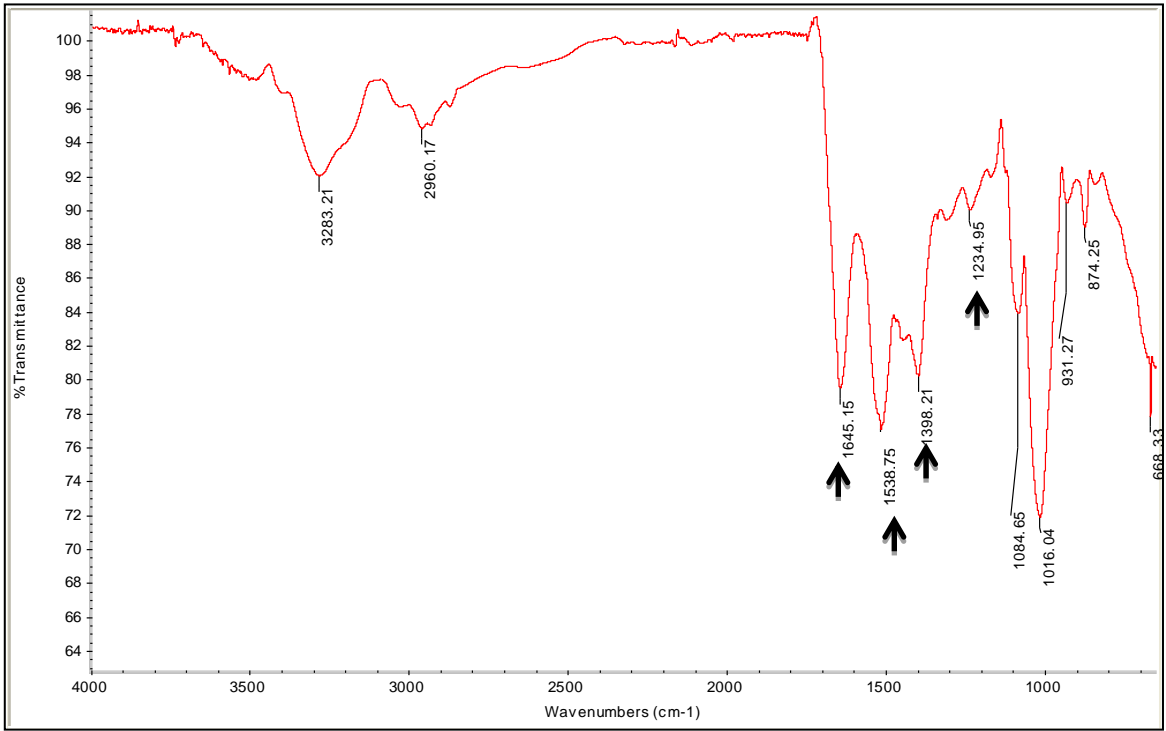
Proteinlerin molekül ağırlıkları, Eş. 4.4 kullanılarak hidrodinamik yarıçap değerleri ile ilişkilendirilebilmektedir (Armstrong et al., 2004).

$$R_h = \left(\frac{3[\eta]M}{10\pi N} \right)^{1/3} \quad (4.4)$$

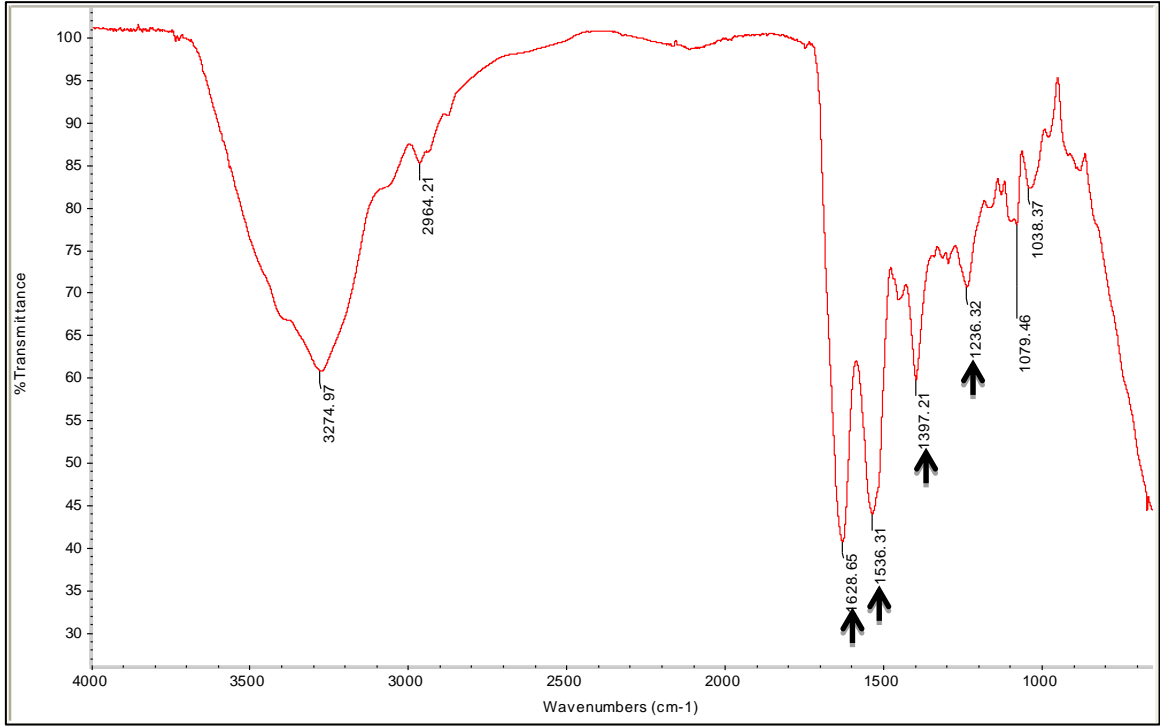
Burada η , çözücünün viskozitesi; M, proteinin molekül ağırlığı; N, Avagadro sayısı; R_h ise hidrodinamik yarıçaptır. Buna bağlı olarak; FG'in hidrodinamik çapının ($d = 2R_h$) BSA'den büyük olması (Çizelge 4.4), FG'in daha yüksek bir molekül ağırlığına sahip olduğunu göstermektedir.

BSA ve FG'e ait FTIR-ATR spektrumlar

Çalışma kapsamında kuru halde BSA ve FG yapılarına ait FTIR-ATR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.18 a ve b).



(a)



(b)

Şekil 4.18. Proteinlere ait FTIR-ATR spektrumu; (a) BSA, (b) FG.

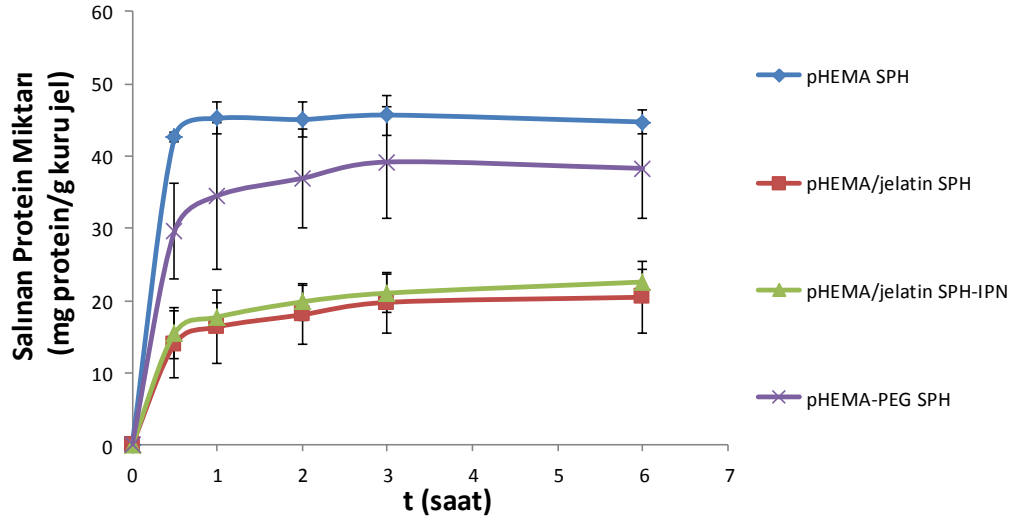
BSA ve FG'in FTIR-ATR spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.18.a ve b), Amid I (1645 cm^{-1}), Amid II (1538 cm^{-1}), Amid III (1234 cm^{-1}) ve karboksil (1396 cm^{-1}) gibi protein yapılar için karakteristik bandlar açıkça görülmektedir (İmren, 2003).

4.3.2. Protein salım kinetiği ile ilgili sonuçlar

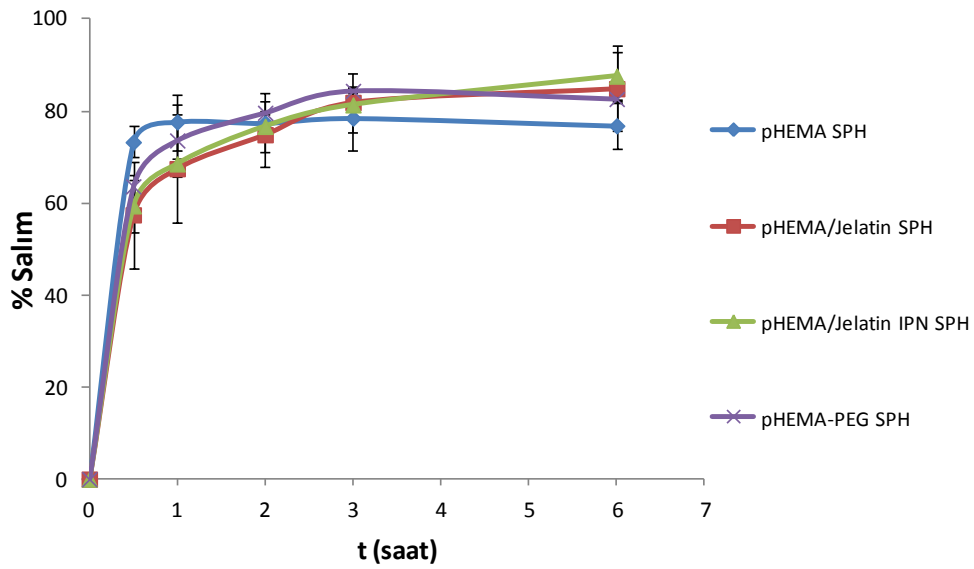
Bölüm 3.3.7'de sunulduğu şekilde gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda, HPLC ile tayin edilen salım miktarlarından yararlanılarak kümülatif salım değerleri hesaplanmış ve hidrojellerden salınan BSA ve FG değerleri, mg protein/g kuru jel ve % salım olarak zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Kümülatif salım değerlerinin belirlenmesi ile ilgili örnek hesaplama, Ek-3'te sunulmuştur.

4.3.2.1. BSA salım kinetiği ile ilgili sonuçlar

BSA yüklenen 6 hidrojinin yapay bağırsak ortamı (pH:7) içerisinde yürütülen in vitro salım çalışmaları sonucu elde edilen veriler Şekil 4.19 ve 4.20’de “salım kinetiği” olarak ifade edilmiştir.

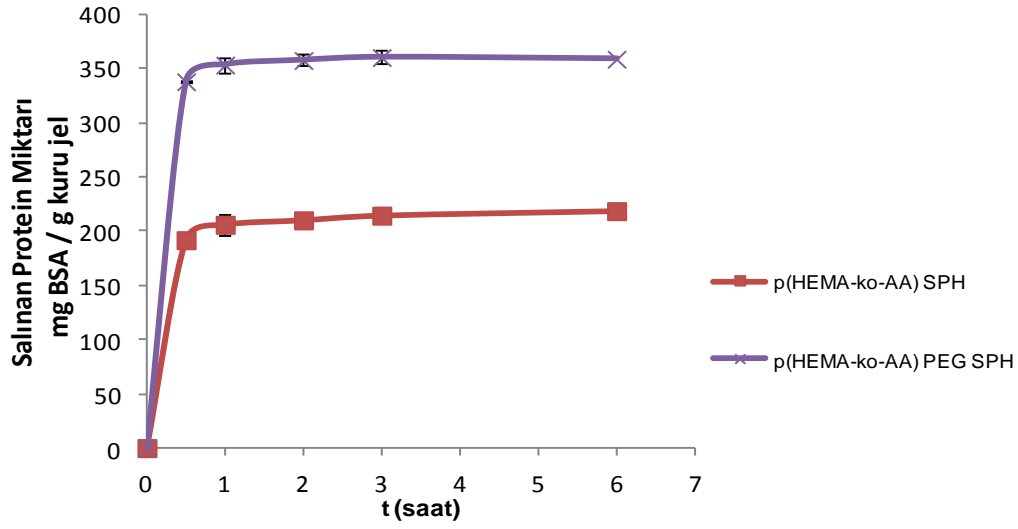


(a)

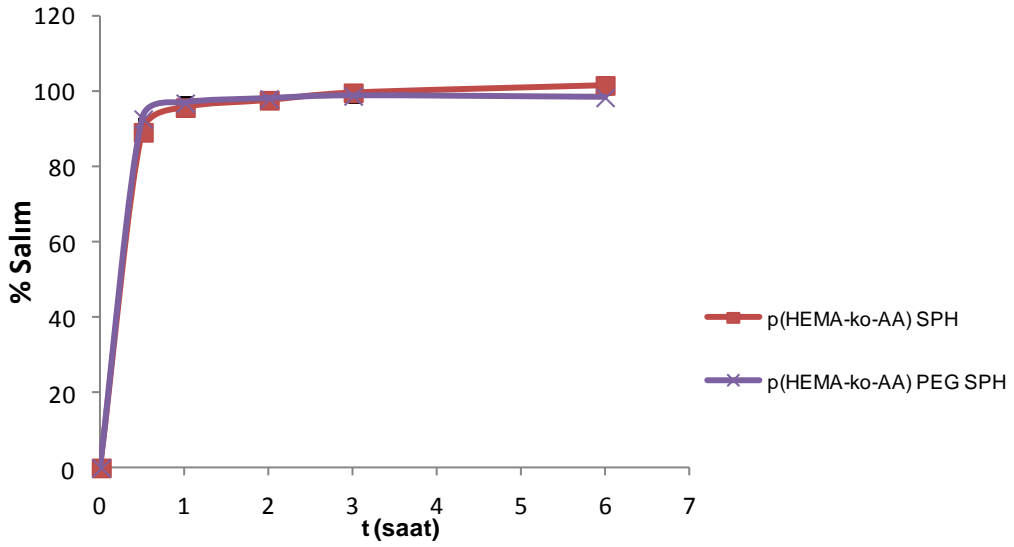


(b)

Şekil 4.19. Hidrojellerden BSA salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg BSA salımı (b) % BSA salımı.



(a)



(b)

Şekil 4.20. p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin BSA salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg BSA salımı, (b) % BSA salımı.

Şekil 4.19'da BSA ile yüklenmiş p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH'lerden salımı gösteren eğriler, ilk 30 dk.'lık ani salım (initial burst effect) sonrası, 3 saat boyunca devam ederek (sustained release) tamamlanan bir salım profili ile karakterize edilebilmektedir. Salım periyodu boyunca SPH'lerden BSA salımı, yarı-IPN SPH ve SPH-IPN'lere göre

daha yüksek hızlarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, SPH'in yapısında doğrusal veya çapraz bağlanarak oluşturulan jelatin ağ yapının varlığı ile açıklanabilir.

Şekil 4.20'de BSA ile yüklenmiş p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerden protein salımını gösteren eğriler ise, ilk 30 dk.lık ani salım ile yüksek miktarlarda salım sonrası, yaklaşık 2 saat boyunca salımın düşük hızlarla devam ettiğini ve neredeyse proteinin tamamının salınarak salımın tamamlandığını göstermiştir.

Tüm SPH ve SPH-IPN yapılardan salınabilir toplam BSA miktarının p(HEMA) SPH için % 80, p(HEMA)-jelatin SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH-IPN için % 90, p(HEMA)-PEG SPH için % 85, p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri için yaklaşık % 100 olduğu gözlenmiştir. Salım periyodunun ilerleyen saatlerinde ise salınan protein miktarlarında bir artış gözlenmemiş ve salım 24 saat sonunda tamamlanmıştır. Salım davranışlarının daha net gözlenebilmesi açısından salım çalışmalarının ilk 6 saatlik periyotları grafiksel olarak sunulmuştur.

Başlangıçtaki hızlı salımı karakterize eden "burst" etkisi, yüklü jeldeki BSA moleküllerinin yüzeye yakın lokalize olduğunu ve salım başlangıcında hidrojelden kolayca difüze olduklarını ifade etmektedir. Yüzeye yakın lokalizasyon; protein yükleme yöntemine (bu çalışmada emdirme yöntemi), protein yüklü hidrojellerin kurutulması sırasındaki işlem seçimine ve koşullarına (bu çalışmada -85°C'de liyofilizasyon) ve protein yüklü hidrojellerin salım öncesindeki bekleme periyoduna bağlı olarak karşılaşılan bir durumdur. Disklerin kuruması yüzeyden başlar ve diskin iç kısımlarındaki su kapiler kuvvetler tarafından yüzeye taşınırken beraberinde protein moleküllerini de sürükler. Böylece, herhangi bir polimer-protein etkileşimi olmadığı durumda protein molekülleri disk yüzeyine yakın bölgelere yerleşerek "burst" etkiye, yani başlangıçta bağlı olarak çok hızlı salıma neden olurlar (İmren, 2003). Burst etki, özellikle yüksek şişme oranlarına bağlı olarak yüksek hacimlerde BSA çözeltilerini absorplayabilen p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerde yüksek miktardadır.

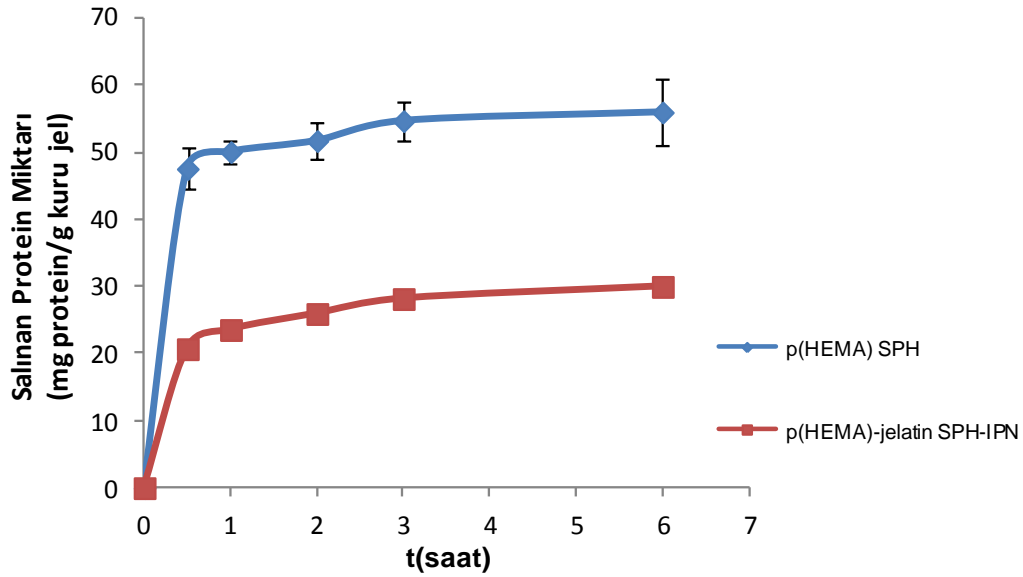
Literatür çalışmalarında, mide-bağırsak (GI) bölgesinde çok kısa yarı ömre sahip olan peptid ve protein ilaçların bağırsak epitelden hızlı ve etkili emiliminin ve etkin plazma değerine ulaşılmasının ancak ani salım profili ile sağlanabileceği

belirtilmiştir (Dorkoosh et al., 2001). Sunulan çalışma kapsamında hazırlanan ve in vitro salım karakteristikleri incelenen hidrojellerin, istenilen ani salım profiline sahip oldukları gözlenmiştir.

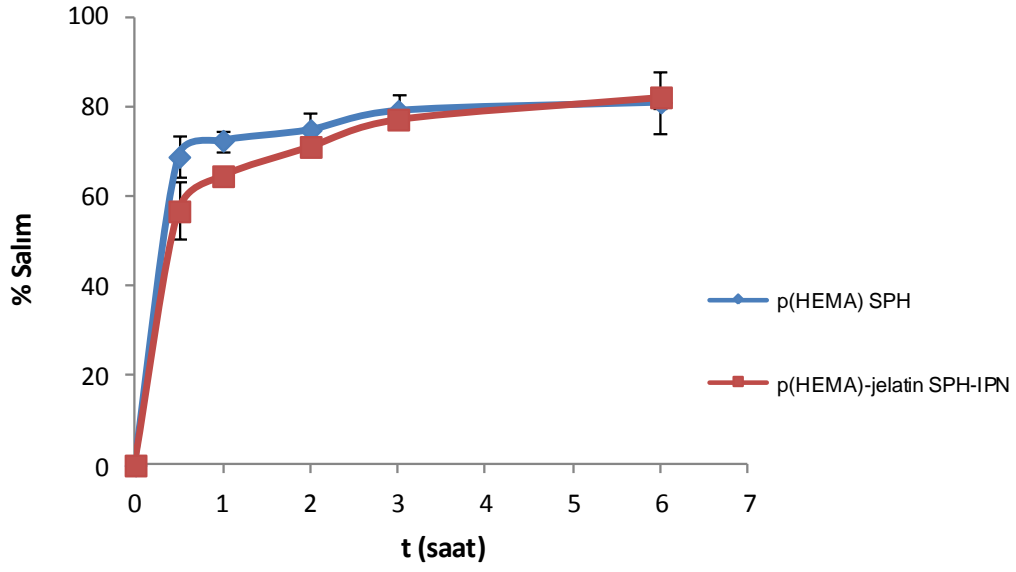
BSA yüklü hidrojelere ait salım profilleri incelendikten sonra, FG yüklenecek örneklerin seçimi yapılmıştır. Fibrinojen ile yüklenip, salım profili incelenecek örnekler; düzgün salım profili ile p(HEMA) SPH, BSA'ye göre daha büyük molekül ağırlığına sahip bir protein olan FG'in salımında iç içe geçmiş ağ yapının etkisini görmek amacı ile p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve oldukça yüksek protein yükleme kapasitesine sahip p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'ler olarak belirlenmiştir.

4.3.2.2. Fibrinojen salım kinetiği ile ilgili sonuçlar

FG yüklenen 4 hidrojelin yapay bağırsak ortamı (pH:7) içerisinde yürütülen in vitro salım çalışmaları sonucu elde edilen veriler Şekil 4.21 ve 4.22'de "salım kinetiği" olarak ifade edilmiştir.

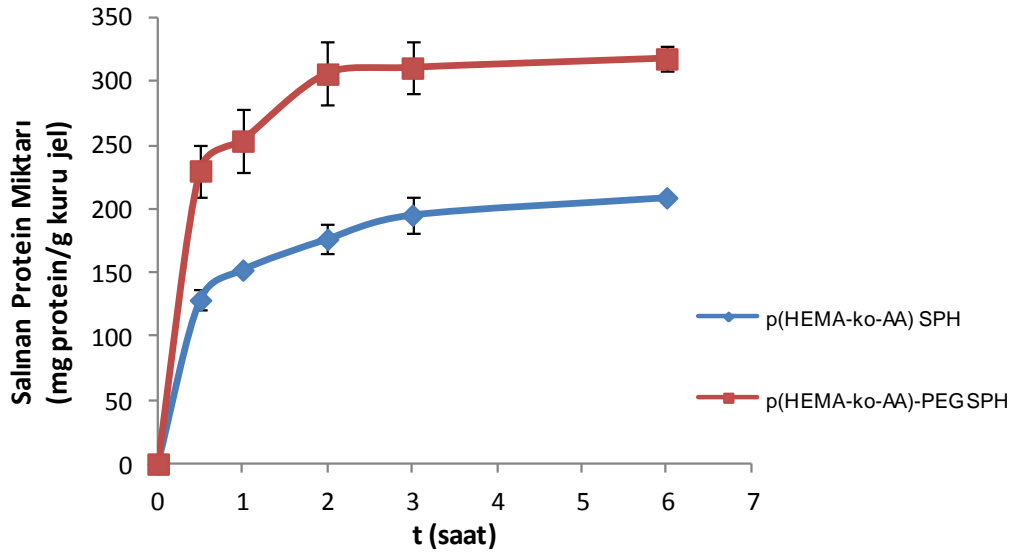


(a)

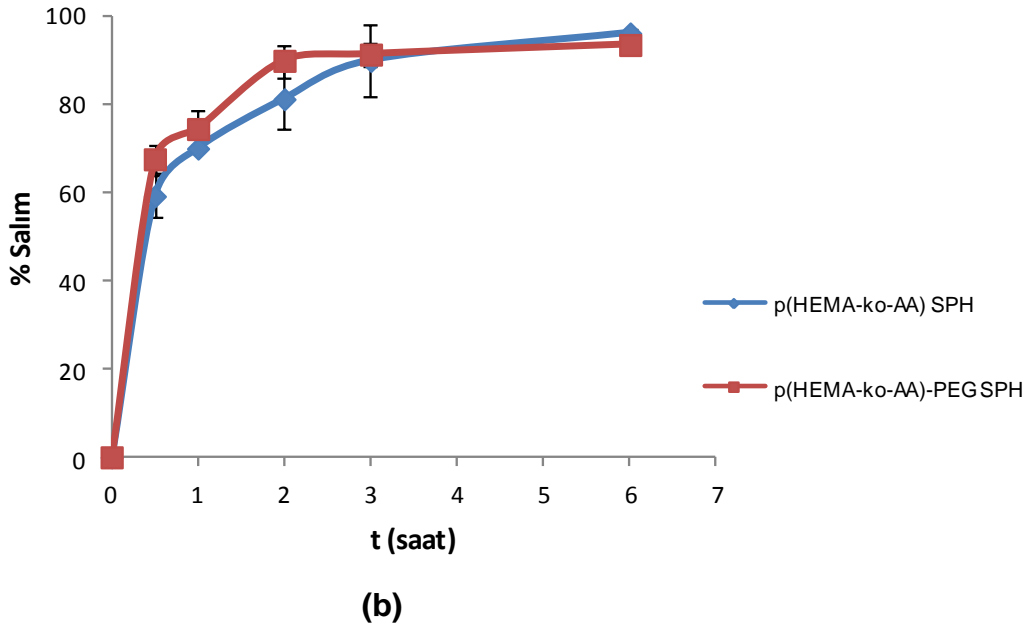


(b)

Şekil 4.21. p(HEMA) SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerinin FG salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg BSA salımı, (b) % BSA salımı.



(a)



Şekil 4.22. p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin FG salım kinetiği; (a) kuru hidrojel başına gerçekleşen mg FG salımı, (b) % FG salımı.

Şekil 4.21'de FG ile yüklenmiş p(HEMA) SPH ve p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerden salımı gösteren eğriler, ilk 30 dk.'lık ani salım sonrası, 6 saat boyunca devam ederek tamamlanan bir salım profili ile karakterize edilmiştir. Salım periyodu boyunca p(HEMA) SPH'lerden FG salımı, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lere göre daha yüksek hızlarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, SPH'in yapısında çapraz bağlanarak oluşturulan jelatin ağ yapının polimer zincir esnekliğini azaltması ile açıklanabilir.

Şekil 4.22'de FG ile yüklenmiş p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerden protein salımını gösteren eğrilerden ise, ilk 30 dk.'lık ani salım sonrası, yaklaşık 6 saat boyunca düşük hızlarla devam ederek tamamlanan bir salım profili gözlenmiştir.

FG yüklü tüm örneklerden protein salımının, aynı örneklerin BSA salım profillerinden farklı olarak, 6 saat boyunca devam ederek tamamlandığı Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de görülebilmektedir. Şişen hidrojel sistemlerden salım mekanizması; difüzyon kontrollü, şişme kontrollü veya bozunma kontrollü gerçekleşmektedir. Difüzyon kontrollü bir sistemden salım, ilacın matris içerisindeki içi su dolu

gözenek ve kanallardan taşınımıyla gerçekleşir (İmren, 2003). Bu nedenle proteinlerin “hidrodinamik çap” değerleri salımın hızı hakkında fikir verebilir. Çalışma kapsamında hazırlanan SPH ve SPH-IPN’lerin 200-300 µm aralığındaki gözenek boyutları, BSA (7.7 nm) ve FG’in (20 nm) hidrodinamik yarıçaplarına oranla oldukça büyüktür. Bu durumda, her iki protein için de difüzyon kontrollü olarak gerçekleşen salım hızları arasındaki farklılık, hidrodinamik çap ve difüzyon katsayısı arasındaki ilişki ile açıklanabilir (Eş. 4.3). BSA’in FG’den daha yüksek bir difüzyon katsayısına sahip olması (Çizelge 4.14), hidrojellerden gerçekleşen BSA salımının daha hızlı tamamlanmasını sağlamıştır.

İlk yarım saat içerisindeki ani salım tüm örneklerde gözlenmiş, ancak yapısında akrilik asit bulunan p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH’lerindeki ani salım miktarlarının %90 civarında olduğu gözlenmiştir. Tüm hidrojellerden salım 24 saat içerisinde tamamlanmış ve proteinin %80-%100’ü salınmıştır.

Sonuç olarak; in vitro salım çalışmaları sentezlenen hidrojellerin, yüksek yükleme kapasitesine sahip, yükleme basamağında aktivite kaybı yaratmayan ve protein ilaçların oral yollu alımında ilacın etkin emilimi için gerekli olan patlayan salım profilini sağlayan aday salım sistemi olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Her 2 protein için de salım %’lerinin 80-100 aralığında değişmesi, proteinlerin polimerik matris ile tersinmez etkileşime girmediklerini göstermektedir. Bu konuya ilişkin tartışma Bölüm 4.3.4’te, FTIR sonuçları ışığında tartışılacaktır.

SPH ve SPH-IPN’lerin BSA ve FG’e ait salım profilleri incelendiğinde az miktarda da olsa tamamlanamayan bir salım söz konusudur. İlaç yüklü polimerik yapıların dondurulması ve ardından gerçekleştirilen dehidrasyon işlemi boyunca protein denatürasyonu ve agregasyonunun (topaklanma) oluşabileceği yaygın bir fenomendir. Bu durumda oluşabilecek agregat formundaki ilaç molekülleri, salınmadan yapıda olduğu gibi kalabilirler. Bu açıklamaların ışığında; tamamlanamayan salım, yukarıda özetlenen bir ya da birden fazla nedene bağlı olarak ortaya çıkmış olabilir (Erce, 2006).

Bu SPH ve SPH’ler arasından, her iki salım profilinde de toplam salınabilir protein miktarı % 100’e ulaşan p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH, biyoadeziv özelliği ve yüksek şişme oranı nedeniyle mekanik yapışmayı destekleyecek en uygun aday salım

sistemi olarak gösterilebilir. Hidrojel yapısında akrilik asit nedeniyle pH-duyarlı özellik taşıdığından, mide-bağırsak yolunda karşılaşılabilecek pH değişimleri karşısında ilacın denatürasyonunu önlemesi beklenmektedir. Ayrıca sahip olduğu yüksek mekanik dayanım ile bağırsağın peristaltik hareketlerinden kaynaklanan mekanik strese karşı koyabilecektir.

4.3.3. Protein salım kinetiğinin matematiksel analizi

İlaç salımının hidrojel matrise çözücü moleküllerinin girişi ve ardından matrisin şişmesiyle kontrol edildiği sistemlere “şişme kontrollü sistemler” olarak adlandırılır. Genellikle ağızdan alınan şişme kontrollü sistemlerde, ilaç başlangıçta camsı polimerde çözünür veya dağıtılır. Biyolojik akışkanla temas haline gelindiğinde, suyun absorpsiyonu ile polimer şişmeye başlar. Su molekülleri çözünmüş/dağılmış ilacı içeren hidrojel matrise penatre olurken iki ayrı faz gözlenir. Bu fazlar, içteki cam faz ve dıştaki kağıuçugumsu fazdır. İlaç molekülleri polimerin kağıuçugumsu fazından dışarı difüzlenebilir. Bu durumda, camsı kısımdan dışarı ilaç difüzlenebileceğinden ilaç salımı, camsı-kağıuçugumsu ara yüzeyin hızı ve pozisyonuyla kontrol edilmektedir. Camsı-kağıuçugumsu ara yüzeyde meydana gelen makromoleküler gevşemenin ilaç salım mekanizması üzerine etkisi, elde edilen verilerin Eş. 2.1’e uyarlanmasıyla tayin edilebilir (İmren, 2003).

Sunulan çalışmada polimerik sistemlerden BSA ve FG salımında difüzyon mekanizmasının türünü belirlemek üzere Eş. 2.1 kullanılmıştır. BSA ve FG salımlarına ait n , k ve R^2 değerleri Çizelge 4.15’te tüm hidrojeller için topluca sunulmuştur.

Çizelge 4.15. Salım kinetiğinin matematiksel analizine yönelik toplu sonuçları.

Süpergözenekli Hidrojel	BSA			FG		
	n	k	R^2	n	k	R^2
p(HEMA) SPH	0.036	0.917	0.890	0.060	0.847	0.9828
p(HEMA)-jelatin SPH	0.229	0.571	0.955	-	-	-
p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	0.069	0.921	0.934	0.166	0.624	0.991
p(HEMA)-PEG SPH	0.150	0.707	0.972	-	-	-
p(HEMA-ko-AA) SPH	0.050	0.884	0.922	0.228	0.578	0.998
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH	0.037	0.915	0.988	0.206	0.637	0.968

Çizelge 4.15 incelendiğinde, her iki proteinin salımında hidrojenlerin n değerlerinin 0.45'in altında olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç silindirik geometrideki bu sistemlerde ilaç salım mekanizmasının Fickian transporta göre gerçekleştiğini göstermektedir. Yalnızca, p(HEMA)-jelatin SPH'lerin BSA salımı için ve p(HEMA-ko-AA)-SPH'lerin FG salımı için 0.45'e yakın bir n değeri elde edilmiştir. Bu örnekler için Eş. 2.3'ten faydalanarak hesaplanan protein salımına ait difüzyon katsayılarının sırasıyla 8.27×10^{-8} ve 5.22×10^{-8} cm²/s olduğu saptanmıştır.

4.3.4. Protein yüklü ve salım sonrası hidrojenlerin FTIR-ATR ile analizi

Protein yükleme yöntemi ve protein türünün hidrojel yapıda meydana getirdiği değişikliklerin saptanması, yükleme yöntemi ve koşullarının protein stabilitesi üzerinde bir değişiklik meydana getirip getirmediğinin belirlenmesi, protein yükleme yönteminin ve protein salımının başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi ve ek olarak polimer-protein etkileşiminin belirlenmesi amacıyla örnekler FTIR-ATR analizleriyle incelenmiştir. Aşağıda her iki protein için yüklü ve salım sonrası p(HEMA) SPH'lere ait FTIR spektrumları verilmiştir. Örnek FTIR spektrumları Ek-4'te sunulmuştur.

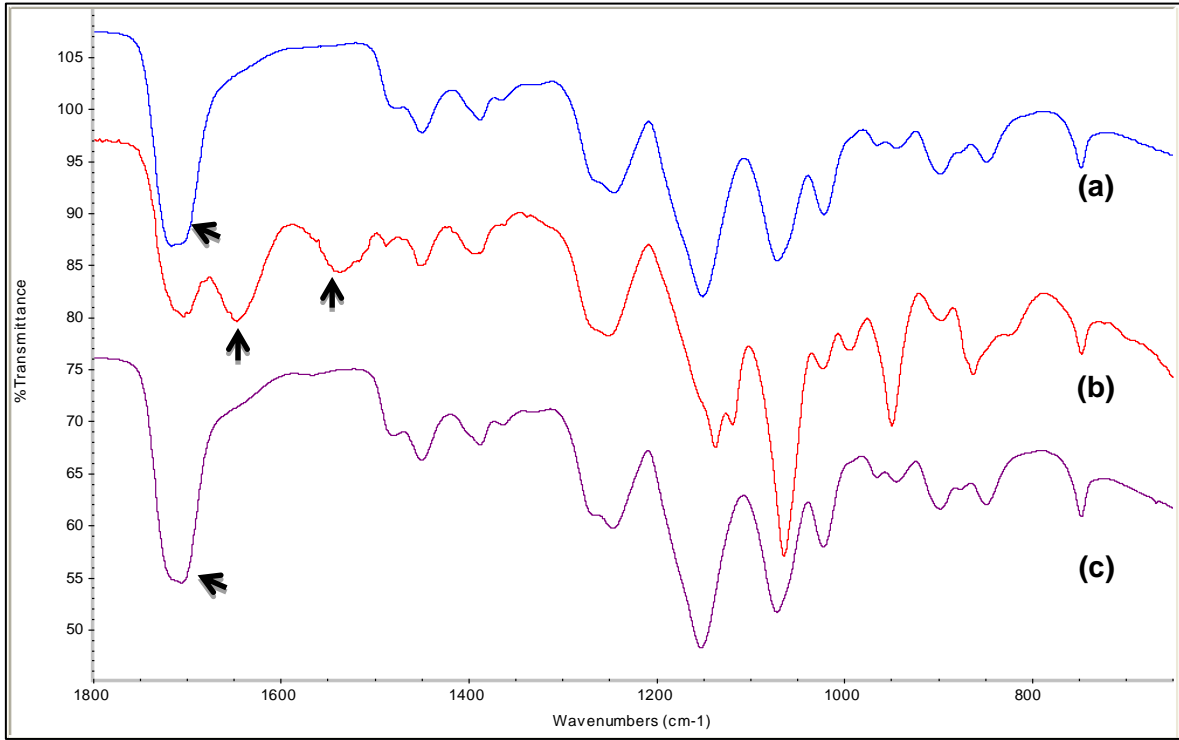
4.3.4.1. BSA yüklü ve salım sonrası hidrojenlere ait FTIR-ATR analizleri

BSA'ye ait FTIR spektrumu Şekil 4.14.a'da verilmiştir. FTIR spektrumunda; Amid I (1645 cm⁻¹), Amid II (1515 cm⁻¹), Amid III (1234 cm⁻¹) ve Karboksil (1396 cm⁻¹) gibi protein yapılar için karakteristik bandlar açıkça görülmektedir.

p(HEMA)-SPH'ye ait FTIR-ATR analizi

Şekil 4.23.a'da verilen p(HEMA) SPH'ye ait FTIR spektrumunda p(HEMA)'ın karakteristik piki olan 1710 cm⁻¹'deki C=O grubuna ait gerilme titreşimleri görülmektedir. BSA yüklü p(HEMA) SPH'ine ait FTIR spektrumunda (Şekil 4.23.b) ise BSA'nin varlığına bağlı olarak, 1647 cm⁻¹'de Amid I (C=O gerilme titreşimi) ve 1537 cm⁻¹'de Amid II (C-N gerilme titreşimi ve N-H deformasyonu) gibi ana protein bantları net olarak gözlenmiştir. Salım sonrası p(HEMA) SPH'ine ait Şekil 4.23.c'deki spektrum incelendiğinde ise, BSA'ye ait Amid I (1647 cm⁻¹) ve Amid II (1537 cm⁻¹) bantlarının önemli ölçüde kaybolduğu görülmektedir. Bu durum, BSA ile polimer arasında yükleme sırasında kimyasal bir etkileşim olmadığının ve hidrojelden BSA salımının büyük ölçüde tamamlandığı konusunda ipucu

vermektedir. Bu spektrumlar; Bölüm 4.3.2'de verilen in vitro salım çalışmalarında %80 olarak belirtilen salınabilir BSA miktarını destekler niteliktedir.



Şekil 4.23. (a) p(HEMA) SPH, (b) BSA yüklü p(HEMA) SPH ve (c) salım sonrası p(HEMA) SPH'e ait FTIR spektrumları.

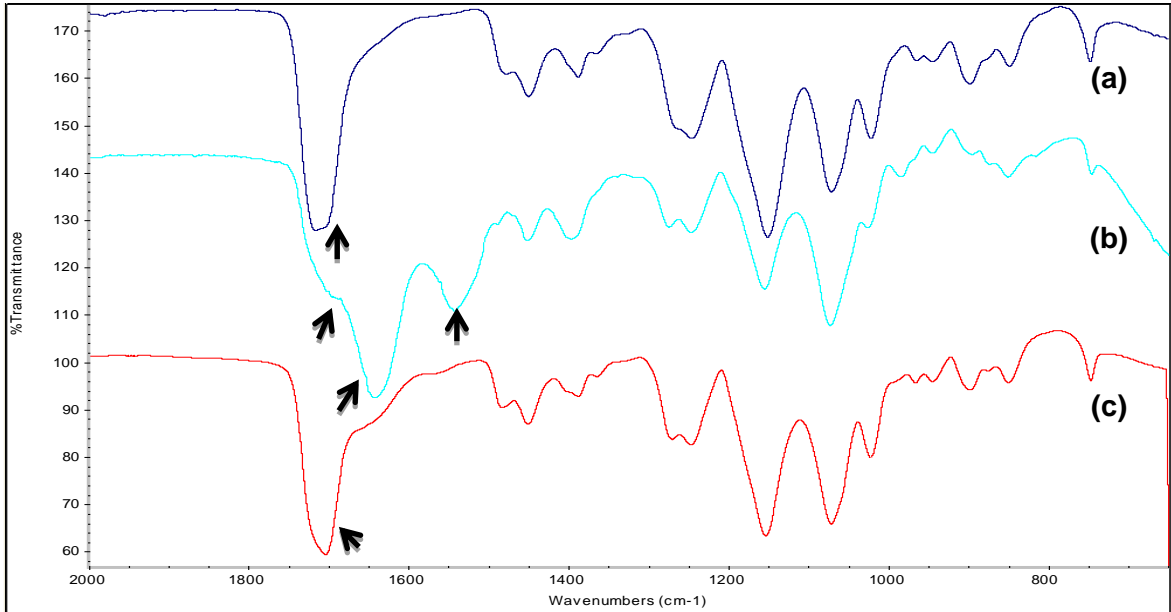
Diğer örnekler için FTIR spektrumları incelenmiş, sonuçların p(HEMA) SPH' e benzer olduğu gözlenmiştir. Hidrojellere ait FTIR spektrumlarında BSA'ye ait spesifik piklerin salım sonrasında kaybolması, BSA ile polimerler arasında kimyasal bir etkileşim olmadığını göstermiştir. Bu spektrumlar; Bölüm 4.3.2'de verilen örnekler için in vitro salım çalışmalarında %80-100 oranında salınan BSA miktarını desteklemektedir.

4.3.4.2. FG yüklü ve salım sonrası hidrojellere ait FTIR-ATR analizleri

FG'nin FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.18. b), Amid I (1628 cm⁻¹), Amid II (1538 cm⁻¹), Amid III (1236 cm⁻¹) ve Karboksil (1397 cm⁻¹) gibi protein yapılar için karakteristik bandlar açıkça görülmektedir.

p(HEMA)-SPH'ye ait FTIR-ATR analizi

Şekil 4.29.a'da verilen p(HEMA) SPH'e ait FTIR spektrumunda p(HEMA)'ın karakteristik piki olan 1710 cm^{-1} 'deki C=O grubuna ait gerilme titreşimleri görülmektedir. BSA yüklü p(HEMA) SPH'ine ait FTIR spektrumunda (Şekil 4.29.b) ise BSA'nin varlığına bağlı olarak, 1647 cm^{-1} 'de Amid I (C=O gerilme titreşimi) ve 1537 cm^{-1} 'de Amid II (C-N gerilme titreşimi ve N-H deformasyonu) gibi ana protein bantları net olarak gözlenmiştir. Protein yükleme sonrası 1710 cm^{-1} 'deki p(HEMA)'ın ester gruplarından kaynaklanan C=O gerilme titreşiminin, BSA'e ait karbonil piki (1647 cm^{-1}) tarafından kapatıldığı gözlenmektedir. Salım sonrası p(HEMA) SPH'ine ait Şekil 4.29.c'deki spektrum incelendiğinde ise, BSA'e ait Amid I (1647 cm^{-1}) ve Amid II (1537 cm^{-1}) bantlarının önemli ölçüde kaybolduğu görülmektedir. Bu durum, BSA ile polimer arasında yükleme sırasında kimyasal bir etkileşim olmadığının ve hidrojelden BSA salımının büyük ölçüde tamamlandığı konusunda ipucu vermektedir.



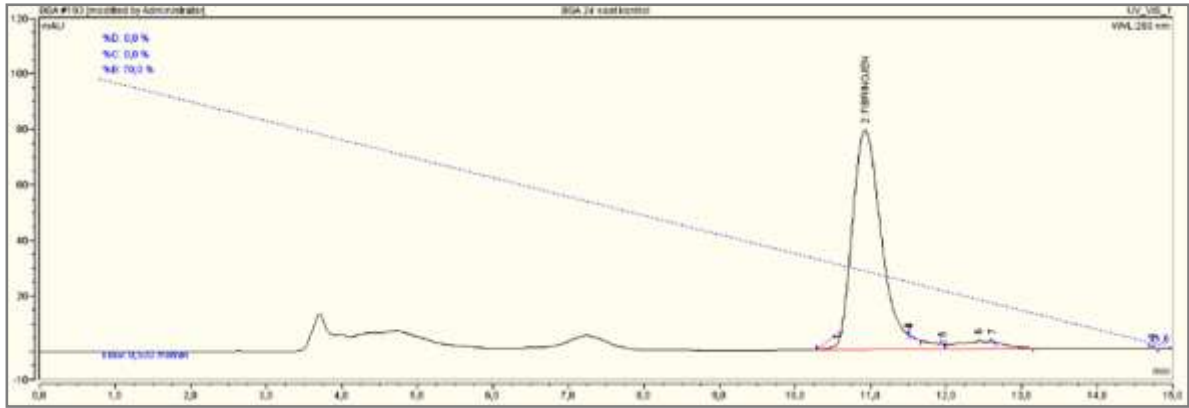
Şekil 4.24. (a) p(HEMA) SPH, (b) FG yüklü p(HEMA) SPH ve (c) salım sonrası p(HEMA) SPH'e ait FTIR spektrumları.

Diğer 3 örneğe ait FTIR spektrumları incelenmiş, sonuçların p(HEMA) SPH' e benzer olduğu gözlenmiştir. Hidrojellere ait FTIR spektrumlarında FG'e ait spesifik piklerin salım sonrasında kaybolması, FG ile polimerler arasında kimyasal bir etkileşim olmadığı savunulabilir. Bu spektrumlar; Bölüm 4.3.2'de verilen örneklere

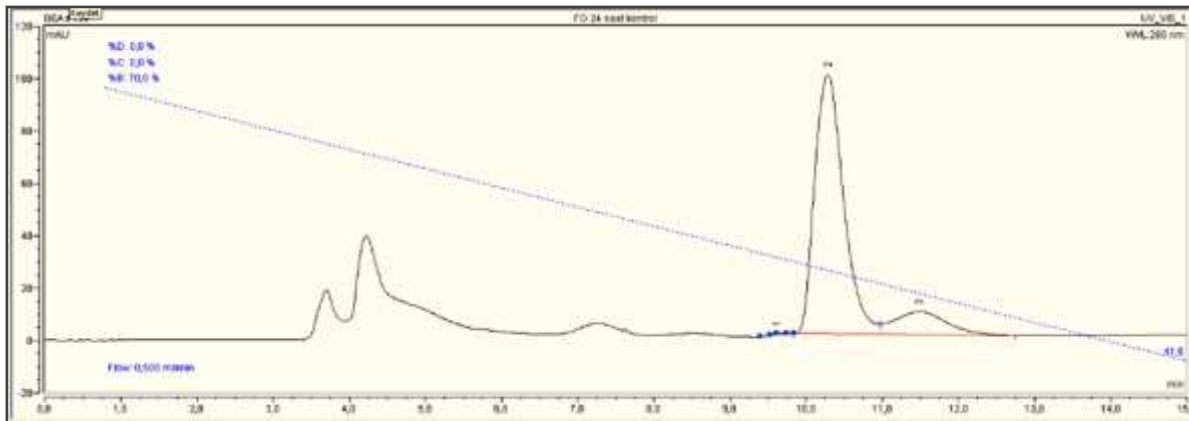
ait in vitro salım çalışmalarında %80-100 oranında salınan BSA miktarını desteklemektedir.

4.3.5. Yikleme ve salım koşullarının proteinlerin stabilitesi üzerindeki etkisi

Protein yikleme koşullarının ve in vitro salım koşullarının, proteinlerde yapısal değişikliğe neden olup/olmadığı HPLC ile kontrol edilmiştir. Yapay bağırsak ortamı içerisinde ozeltileri hazırlanan BSA ve FG in vitro salım deneylerini yürütüldüğü koşullara (50 rpm, 37°C, 24 saat) maruz bırakılan BSA ve FG ozeltileri (10 mg/mL) zerinde HPLC ile 280 nm'de yapılan analizler sonucunda, çalışılan salım koşullarında proteinin yapısında denatürasyon olmadığı, proteinlerin kolonda sabit alıkonna süresini (~10.7dk.) korumasına bağlı olarak saptanmıştır. Şekil 4.33.a ve b'de sırasıyla BSA ve FG'in 24 saat sonunda alınan ölçümlerine ait kromatogramlar verilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.25. BSA (a) ve FG'e (b) ait 24 saatlik HPLC kromatogramları.

5. GENEL SONUÇLAR

Yapılan çalışmada öncelikle 6 farklı bileşimdeki p(HEMA)-bazlı SPH'lerin ve SPH-IPN'lerin üretimi ve yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmiş; ardından bu hidrojellerin model olarak seçilen, sığır serum albümin ve fibrinojen gibi protein ilaçların oral yollu kontrollü salımında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- p(HEMA)-bazlı SHP'lerin üretimi, hidrofilik bir karaktere sahip olan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin, gaz köpükleştirme prosesi ile eş zamanlı yürütülen serbest radikal polimerizasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Eş zamanlı polimerizasyon, 63°C'de su banyosu içerisinde yürütülmüş ve gaz köpükleştirici ajan NaHCO₃'ün termal bozunması ile oluşan CO₂ baloncukları yapı içerisinde hapsedilerek gözenekli hidrojel elde edilmiştir.
- Çalışma kapsamında sentezlenen p(HEMA) SPH'lerinin mekanik dayanımlarının iyileştirilmesi, gözeneklilik oranının artırılması ve biyoadezyon özelliklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır; bu nedenle yapıya jelatin, polietilen glikol (PEG 600) ve akrilik asit eklenerek, 6 farklı SPH sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez için gerekli olan reçetenin belirlenmesi amacıyla bazı bileşenlerin miktarları değiştirilerek, optimum sentez koşulları belirlenmiştir. Çapraz-bağlayıcı ajan N,N'-metilenbisakrilamid (Bis), jelatin, köpükleştirici ajan sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve PEG miktarı ile köpükleştirici ajanın polimerizasyon ortamına eklenme zamanının sentez üzerindeki etkileri incelenmiştir; sentez aşamasında eş zamanlı jelleşme/köpükleşme prosesinin gerçekleşmesi ve hazırlanan hidrojellerin SEM görüntüleri dikkate alınarak sentez için optimum bileşim değerleri belirlenmiştir.
- SPH ve SPH-IPN'lere ait FTIR-ATR spektrumları, jelatinin ve akrilik asitin yapıya başarıyla katıldığını ve tam-IPN yapılarda jelatinin çapraz bağlandığını göstermiştir.
- Hidrojellerin termal davranışları 25-600°C aralığında yürütülen TGA analizleri ile belirlenmiş ve tüm hidrojellerin bozunma sıcaklıkları, 121°C'den yüksek olduğu

görülmüştür. Bu durum, hazırlanan hidrojellerin sterilizasyonu için otoklavın kullanılabilmesini göstermiştir.

- Şişme çalışmaları yapay mide ortamı (pH:2) ve yapay bağırsak ortamı (pH:7) içerisinde, 37°C'de yürütülmüştür. p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH'lerin iki farklı pH'daki denge şişme değerleri ve hacimsel değişimleri arasında çok fark gözlenmezken, akrilik asit içeren p(HEMA-ko-AA) ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin şişme oranları, ortam pH'ındaki artış ile birlikte önemli ölçüde artmıştır. Yapay bağırsak ortamındaki şişme sonrası, kuru p(HEMA-ko-AA) SPH örneğinin hacminin yaklaşık 18 kat, kuru p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH örneğinin hacminin yaklaşık 12 kat arttığı gözlenmiştir.
- Şişme kinetiği ile ilgili çalışmalarda; p(HEMA) SPH, p(HEMA)-jelatin SPH, p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve p(HEMA)-PEG SPH'lerin her iki pH değerinde ~1 dk.'da dengeye ulaştıkları, p(HEMA-ko-AA) SPH ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerinin ise pH:2 değerinde yaklaşık 1 dk.'da dengeye gelirken, pH:7 değerinde yaklaşık 30 dk.'da denge şişme değerine ulaştıkları belirlenmiştir. SPH ve SPH-IPN'ler için suyun difüzyon katsayısının 10^{-6} ile 10^{-8} m²/s aralığında değiştiği saptanmıştır.
- Hidrojellerin mekanik dayanımlarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen sıkıştırma testi sonucunda; p(HEMA)-jelatin SPH'lerin elastik modül değerinin p(HEMA) SPH'lere göre 2.5 kat arttığı, tam-IPN yapıdaki p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerinin elastik modül değerlerinin ise 5.5 kat arttığı gözlenmiştir. Kopolimerizasyon ile hazırlanan p(HEMA-ko-AA) SPH'lerinin elastik modülü p(HEMA) SPH'lere göre 3 kat artmış, dolayısıyla akrilik asit mekanik dayanımı arttırmak açısından çok etkin olmamıştır. Gözenek oluşturucu polimer PEG varlığında hazırlanan p(HEMA)-PEG ve p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerin elastik modül değeri, p(HEMA) SPH'lere göre 10 kat artmıştır. Sonuç olarak, PEG'ün gözenek oluşturucu ajan olarak kullanımının, SPH'lerin mekanik özelliklerinin iyileştirilmesinde önemli ölçüde etkili olduğu gözlenmiştir.

- Protein yükleme işlemi, hidrojellerin hızlı şişme özelliğinden faydalanarak emdirme (embedding) yöntemi ile model protein olarak seçilen Sığır Serum Albümin (BSA) ve Fibrinojen (FG) varlığında gerçekleştirilmiştir. 10 mg/mL başlangıç konsantrasyonuna sahip BSA ve FG çözeltileri oda sıcaklığında, disk formundaki SPH ve SPH-IPN örnekler (12 mm çap, 4 mm kalınlık) geleneksel hidrojellere göre çok hızlı (~30 dk.) ve oldukça yüksek (30-370 mg BSA/g kuru jel; 37-340 mg FG/g kuru jel) kapasitelerde yüklenmiştir.
- Hidrojellere ait in vitro salım çalışmaları, 37°C'de yapay bağırsak ortamı içerisinde yürütülerek kümülatif salım değerleri elde edilmiş ve bu değerler zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Salım kinetiğini ifade eden bu grafikler incelendiğinde; BSA için ilk 30 dk.'lık ani salım (initial burst effect) sonrası, 3 saat boyunca devam ederek (sustained release) tamamlanan bir salım profili gözlenmiştir. FG'e ait eğriler incelendiğinde ise; ilk 30 dk.'lık ani salım sonrası, 6 saat boyunca devam ederek tamamlanan bir salım profili görülmektedir. Her iki protein için de difüzyon kontrollü olarak gerçekleşen salım hızları arasındaki farklılık, BSA'in FG'den daha yüksek bir difüzyon katsayısına sahip olmasından kaynaklanmıştır.
- Salım çalışmaları sonucunda, 24 saatlik salım periyodu süresince tüm hidrojellerden gerçekleşen BSA ve FG salım %'lerinin 80-100 aralığında değişmesi, proteinlerin polimerik matris ile tersinmez etkileşime girmediklerini göstermiştir. FTIR analizleri de bu düşünceyi desteklemektedir.

Sunulan tez çalışması kapsamında yukarıda açıklanan tüm bulgular değerlendirildiğinde; pH-duyarlı yapısı, biyoadeziv özelliği ve yüksek şişme oranı nedeniyle mekanik yapışmayı sağlayarak bölgeye özgü salımı destekleyen p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'leri, in vitro ortamda makromoleküler proteinlerin (BSA ve FG) yüksek oranda ve maksimum 6 saatlik periyotta salımını gerçekleştirebilmektedir. Bu nedenle hidrojel, protein ilaçların oral yollu, bölgeye özgü, hızlı ve yüksek miktarda salımı için uygun aday sistem olarak önerilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Musa, S., Abu Fara, D., Badwan, A.A., 1999, Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate, *J. Control. Rel.*, 57: 223-232.
- Annabi, N., Mithieux, S.M., Weiss, A.S., Dehghani, F., 2009, The fabrication of elastin-based hydrogels using high pressure CO₂, *Biomaterials*, 30, 1-7.
- Armstrong, J.K., Wenby, R.B., Meiselman, H.J, Ficher, T.C., 2004, The Hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation, *Biophys J.*, 87(6), 4259–4270.
- Bai, J.P., Chang, L.L., Guo, J.H., 1995, Targeting of peptide and protein drugs to specific sites in the oral route, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 12, 339–371.
- Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., Kankane, S., 2008, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Prog. Poly. Sci.*, 33, 1088–1118.
- Bajpai, A.K., 2007, Blood protein adsorption on to macroporous semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) of poly(ethyleneglycol) (PEG) and poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) and assessment of in vitro blood compatibility, *Polym. Int.*, 56, 231-244.
- Başbağ, B.A., 2010, Siklosporin A salımı için alternatif polimerik taşıyıcıların geliştirilmesi ve in vitro salım kinetiğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 115s.
- Bischoff, R., S.E., Cray, 1999, Polysiloxanes in macromolecular architecture, *Prog. Poly. Sci.*, 24 (2), 185–219.
- Bodas, D.S, Desai, S.M., Gangal, S.A., 2005, Deposition of plasma polymerized hydroxyethyl methacrylate (HEMA) on silicon in presence of argon plasma, *Appl. Surf. Sci.*, 245, 186–190.
- Brazel, C.S., and Peppas, N.A., 2000, Modelling of drug release from swellable polymers, *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 49: 47-58.
- Carelli, V. , Di Colo, G., Nannipieri, E., Serafini, M.F., 1989, Evaluation of the solution impregnation method for loading drugs into suspension-type polymer matrices: a study of factors determining the patterns of solid drug distribution in matrix and drug release from matrix, *Int. J. Pharm.*, 55, 199–207.
- Chavda, H.V., Patel, C.N., 2010, Preparation and characterization of swellable polymer-based superporous hydrogel composite of poly (acrylamide-co-acrylic acid), *Trends Biomater. Artif. Organs*, 24 (2), 83-89.
- Chen, J., Park, K., 2000a, Synthesis of fast-swelling, superporous sucrose hydrogels, *Carbohydr. Polym.*, 41, 259-268.

- Chen, J., Park, K., 2000b, Synthesis and characterization of superporous hydrogel composites, *J. Control. Rel.*, 65, 73-82.
- Chen, J., Park, H., Park, K., 1998, Synthesis of superporous hydrogels: Hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties, *J. Biomed. Mater. Res.*, 44, 53-62.
- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M.D., Hoemann, C.D., Leroux, J.C., Atkinson, B.L., Binette, F., Selmani, A., 2000, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials*, 21, 2155-2161.
- Ciceri, E. F., Dickerson, J., Klueznik, R. P., Moret, J., Mawad, M. E., 2002, Embolization of experimental porcine aneurysms with a combination platinum coils and hydrogel material, Paper 106 presented at 37th Annual Meeting of the American Society of Neuroradiology, April 2-8, Dallas.
- Çetin, D., Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., 2010, Novel scaffolds based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) superporous hydrogels for bone tissue engineering, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 22(9), 1157-1178.
- Das, A., Chitra, R., Choudhury, R.R., Ramanadham, M., 2004, Structural changes during the unfolding of bovine serum albumin in the presence of urea: A small-angle neutron scattering study, *J. Phys.*, 63(2), 363-368.
- Demirtaş, T.T., Karakeçili, A., Gümüşderelioğlu, M., 2008, Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in vitro characterization, *J. Mat. Sci: Mat. Med.*, 19, 729-735.
- Donbrow, M., 1992, *Microparticles and nanoparticles in medicine and pharmacy*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1-14.
- Dorkoosh, F.A., Brussee, J., Verhoef, J.C., Borchard, G., Rafiee-Tehrani, M., Junginger, H.E., 2000, Preparation and NMR characterization of superporous hydrogels (SPH) and SPH composites, *Polymer*, 41, 8213-8220.
- Dorkoosh, F.A., Verhoef, J.C., Borchard, G., Rafiee-Tehrani, M., Junginger, H.E., 2001, Development and characterization of a novel peroral peptide drug delivery system, *J. Control. Rel.*, 71, 307-318.
- Dorkoosh, F.A., Borchard, G., Rafiee-Tehrani, M., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 2002a, Evaluation of superporous hydrogel (SPH) and SPH composite in porcine intestine ex-vivo: assessment of drug transport, morphology effect, and mechanical fixation to intestinal wall, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 53, 161-166.
- Dorkoosh, F.A., Verhoef, J.C., Ambragts, M.H.C., Rafiee-Tehrani, M., Borchard, G., Junginger, H.E., 2002b, Peroral delivery systems based on superporous hydrogel polymers: release characteristics for the peptide drugs buserelin, octreotide, and insulin, *Pharm. Sci.*, 15, 433-439.

- Dorkoosh, F.A., Verhoef, J.C., Verheijden, J.H.M., Rafiee-Tehrani, M., Borchard, G., Junginger, H.E., 2002c, Peroral absorption of octreotide in pigs formulated in delivery systems on the basis of superporous hydrogel polymers, *Pharm. Res.*, 19, 1532-1536.
- Dorkoosh, F.A., Stokkel, M.P., Blok, D., Borchard, G., Rafiee-Tehrani, M., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 2004, Feasibility study on the retention of superporous hydrogel composite polymer in the intestinal tract of man using scintigraphy, *J. Control. Rel.*, 99 (2), 199-206.
- Erce, D., 2006, Protein salımı için süpergözenekli IPN/Yarı-IPN hidrojellerin sentezi ve salım kinetiğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 120 s.
- Ende, am.M.T., 1993, Transport and interaction of ionizable drugs and proteins in hydrophilic polymers, Ph.D. Thesis, Purdue University.
- Ende, am.M.T., Peppas, N.A., 1996, Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. I. Polymer characterization, *J. Appl. Polym. Sci.*, 59, 673-685.
- Eschbach, F.O., Huang, S.J., 1994, Hydrophilic-hydrophobic binary systems of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) and polycaprolactone. Part I: Synthesis and characterization, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 9(1), 29-54.
- Fix, J.A., 1996, Strategies for delivery of peptides utilizing absorption-enhancing agents, *J. Pharm. Sci.*, 85, 1282-1285.
- Franssen, O., Stenekes, R.J.H, Hennink, W.E., 1999, Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres, *J. Control. Rel.*, 59: 219-228.
- Frisch, H.L., Frisch, K.C., Klempner, D., 1981, Advances in interpenetrating polymer networks, *Pure Appl. Chem.*, 53, 1557—1566.
- Fu, Y., W.J., Kao, 2010, Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7(4), 429—444.
- Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., Vasheghani-Farahani, E., 2010, Theoretical description of hydrogel swelling: A review, *Iran. Polym. J.*, 19, 375-398.
- Gemeinhart, R.A., 1999, Properties of superporous hydrogels for drug delivery, Ph.D. Thesis, Purdue University, 209p.
- Gemeinhart RA, Park H, Park K, 2000, Pore structure of superporous hydrogels, *Polym. Adv. Technol.*, 11, 617-625.
- Gemeinhart, R.A., Guo, C., 2004, Fast Swelling Hydrogel Systems, CRC Press, Chapter 13, 245-257.

- Gonçaves, I.C., Martins, M.C.L., Barbosa, M.A., Ratner, B.D., 2009, Protein adsorption and clotting time of p(HEMA) hydrogels modified with C18 ligands to adsorb albumin selectively and reversibly, *Biomaterials*, 30(29), 5541–5551.
- Goto, T., Morishita, M., Kavimandan, N.J., Takayama, K., Peppas, N.A., 2002, Gastrointestinal transit and mucoadhesive characteristics of complexation hydrogels in rats, *J. Pharm. Sci.*, 95 (2), 462-469.
- Gupta, P., Vermani, K., Garg, S., 2002, Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discov. Today*, 7, 569–579.
- Gümüşderelioğlu, M., 2002, Temmuz, *Biyomalzemeler, Bilim ve Teknik Özel Eki, Tübitak Yayınları*.
- Gümüşderelioğlu, M., Kesgin, D., 2005, Release kinetics of bovine serum albumin from pH-sensitive poly(vinylether) based hydrogels, *Int. J. Pharm.*, 288, 273–279.
- Gümüşderelioğlu, M., 2010, Şubat, *Yumuşak ve akıllı polimerler, Bilim ve Teknik, Tübitak Yayınları*.
- Gümüşderelioğlu, M., Erce, D., Demirtaş, T.T., 2011, Superporous polyacrylate/chitosan IPN hydrogels for protein delivery, *J. Mat. Sci: Mat. Med.*, 22(11), 2457-2465.
- Gürdağ, G., Öz, G.M., 2009, A novel poly(N-isopropylacrylamide-co-N-hydroxymethyl acrylamide) gel: preparation in the absence/presence of a pore-forming agent and characterization, *Polym. Adv. Technol.*, 20, 216–224.
- Gürdağ, G., Gökalp, A., 2011, Effects of pore-forming agents and polymer composition on the properties of novel poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate sulfate-co-N,N-dimethylacrylamide) hydrogels, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50, 8295–8303.
- Haraguchi, K., Farnworth, R., Ohbayashi, A., Takehisa, T., 2003, Compositional effects on mechanical properties of nanocomposite hydrogels composed of poly(N,N-dimethylacrylamide) and clay, *Macromolecules*, 36 (15), 5732-5741.
- Hennink, W.E., Franssen, O., Van Dijk-Wolthuis, W.N.E., and Talsma, H., 1997, Dextran hydrogels for controlled release of proteins, *J. Control. Rel.*, 48: 107-114.
- Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A., Laurent, G., 1999, Fibrinogen, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31, 741-746.
- Hou, X., Siow, K.S., 2001, Novel interpenetrating polymer network electrolytes, *Polymer*, 42, 4181-4188.

- İmren, D., 2003, Biyobozunur ve/veya pH-duyarlı dekstran hidrojellerin sentezi, karakterizasyonu ve kolon-spesifik ilaç salımındaki kullanımları, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 188s.
- İmren, D., Gümüşderelioğlu, M., Güner, A., 2010, In vitro release kinetics of bovine serum albumin from highly swellable dextran hydrogels, *J. Appl. Polym. Sci.*, 115, 740-747.
- Jeffery, H., Davis, S.S., and Hagen, O., 1993, The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles, II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique, *Pharm. Res.* 10: 362-368.
- Jeong, B., Choi, Y.H., Zentner, G., Kim, S.W., 1999, New biodegradable polymer for injectable drug delivery systems, *J. Control. Rel.*, 62, 109-114.
- Junginger, H.E., Bioadhesive polymer systems for peptide delivery, 1990, *Acta Pharm. Technol.*, 36, 110–126.
- Kabra, B.G., Gehrke, S.H., Hwang, S.T., 1991, Modification of the dynamic swelling behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) in water, *J. Appl. Polym. Sci.*, 42 (9), 2409-2416.
- Kato, K., Uchida, E., Kang, E. T., Uyama, Y., Ikada, Y., 2003, Polymer surface with graft chains. *Prog. Polym. Sci.* 28, 209–259.
- Kesgin, D., 2002, pH'ya duyarlı poli(vinil eter) bazlı amfilik hidrojellerden protein salım kinetiğinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 98s.
- Kim, D., Park, K., 2004, Swelling and mechanical properties of superporous hydrogels of poly (AAM-co-AAc) polyethyleneimine interpenetrating polymer Networks, *Polymer* 45, 189–196.
- Klempner, D. and Berkowski, L., 1987, "Interpenetrating polymer networks" in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, Vol. 8, Wiley Interscience, New York, pp. 279-341.
- Korsmeyer, R.W., 1991, Diffusion controlled systems: Hydrogels, In: *Polymers for controlled drug delivery*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 15-37.
- Knuth K, Amiji M, Robinson J R. Hydrogel delivery system for vaginal and oral applications, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1993, 11, 137–167.
- Kuijpers, A.J., Van Wachem, P.B., Van Luyn, M.J.A., Engbers, G.H.M., Krijgsveld, J., Zaat, S.A.J., Dankert, J., Feijen, J., 2000, In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves, *J. Control. Rel.*, 67, 323-336.

- Lallemand, F., Felt-Baeyens, F., Besseghir, K., Behar-Cohen, F., Gurny, R., 2003, Cyclosporine a delivery to the eye: A pharmaceutical challenge, *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 56, 307–318.
- Langer, R., 1990, New methods of drug delivery, *Science*, 249, 1527-1533.
- Langer, R., Peppas, N., 1983, Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents, *J. Macrom. Sci., Revs. Macrom. Chem. Phys.*, Ch. 23, 61-126.
- Langer, R., Folkman, J., 1976, Controlled release of bioactive agents, *Trends in Biotech.*, 2, 47-51.
- Lehr, C.M., 1994, Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 11, 119-160.
- Lewis, D.H., 1990, Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers, in: *Drugs and the Pharmaceutical Science* (Chasin, M., and Langer, R., eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York, 1-41.
- Lin, S.Y., Hsieh, T.F., Wei, Y.S., Li, M.J., 2005, Mechanical compression affecting the thermal-induced conformational stability and denaturation temperature of human fibrinogen, *Int. J. Biol. Macromol.*, 37, 27–133.
- Lin, C., Metters, A.T., 2006, Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 58, 1379-1408.
- Lin, W., Biegler, L.T., Jacobson, A.M., 2011, Kinetic modeling of semi-interpenetrating polymer network (SIPN) process - A comprehensive study on the case of polyethylene/polystyrene semi-I IPN, *Macromol. Theor. Simul.*, 20 (2), 146-165.
- Luessen, H.L., de Leeuw, B.J., Langemeijer, M.W., de Boer, A.B., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 1996, Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug buserelin in vivo, *Pharm. Res.*, 13 (11), 1668-72.
- Lustig, S.R., Peppas, N.A., 1988, Solute diffusion in swollen membranes. IX. Scaling laws for solute diffusion in gels, *J. Appl. Polym. Sci.*, 36, 735-747.
- Manning, M.C., Patel, K., Borchardt, R.T., 1989, Stability of protein pharmaceuticals, *Pharm. Res.*, 6 (11), 903-918.
- Marder V. J., Shulman N. R., Carroll W. R., 1969, High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin, *J. Biol. Chem.*, 244 (8), 2111-2119.

- Meyer, J.H., Dressman, J., Fink, A., Amidon, G., 1985, Effect of size and density on canine gastric emptying of non-digestible solids, *Gastro-enterology*, 89, 805-813.
- Merrill, E.W., Dennison, K.A., Sung, C., 1993, Partitioning and diffusion of solutes in hydrogels of poly(ethylene oxide), *Biomaterials*, 14, 1117-1126.
- Michaud, P., and Camberlin, Y., 1988, Interpenetrating polymer network from blocked isocyanates. Structure and properties of poly(urethane)-urea poly(vinyl) simultaneous interpenetrating networks, *Polym. Eng. Sci.*, 28 (12), 775-784.
- Moura, M.J., Faneca, H., Lima, M.P., Gil, M.H., Figueiredo, M.M., 2011, In situ forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking, *Biomacromolecules*, 12, 3275-3284.
- Nagai, T., Machida, Y., 1992, Buccal delivery systems using hydrogels, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 11 (1-2), 179-191.
- Omidian, H., Rocca, J.G., Park, K., 2005, Advances in superporous hydrogels, *J. Control. Rel.*, 102, 3-12.
- Omidian, H., Park, K., Kandalam, U., Rocca, J.G., 2010, Swelling and mechanical properties of modified HEMA-based superporous hydrogels, *J Bioact. Compat. Polym.*, 25, 483-497.
- Özdemir, E., 2006, Biyobozunur ve enjekte edilebilir polimerik ilaç salım sistemlerinin dizaynı ve sol-gel geçiş özelliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Pal, K., Banthia, A.K., Majumdar, D.K., 2007, Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 8, 142-146.
- Park, K., Shalably, S.W.W., Park, H., 1993, *Biodegradable hydrogels for drug delivery*, Technomic Publishing Co. Inc., ISBN: 1-56676-004-6, USA, 241p.
- Park, K., 2004, *Superporous hydrogels for pharmaceutical and other applications*, Akina, Inc., Vol. 2004.
- Peppas, N.A., Franson, N.M., 1983, The swelling interface number as a criterion for prediction of diffusional solute release mechanisms in swellable polymers. *J. Polym. Sci. Phys. Ed.*, 21 (6), 983 - 997.
- Peppas, N.A., Meadows, D.L., 1983, Macromolecular structure and solute diffusion in membranes: An overview of recent theories, *J. Membr. Sci.* 16, 361-377.
- Peppas, N.A., and Langer, R., 1994, New challenges in biomaterials, *Science*, 263, 1715-1720.

- Peppas, N.A., Ende, am.D.J., 1997, Controlled release of perfumes from polymers. II. Incorporation and release of essential oils from glassy polymers, *J. Appl. Polym. Sci.*, 66 (3), 509-513.
- Peppas, N.A., 1997, Hydrogels and drug delivery, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2, 531-537.
- Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., 2000, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Europ. J. Pharm. Biopharm.*, 50, 27-46.
- Polishchuck, A.Y., Zaikov, G.E., Petropoulos, J.H., 1993, The modelling of the simultaneous transport of solvent and low molecular compounds in swelling polymers, *Int. J. Polym. Mater.*, 19, 1-14.
- Polnok, A., Verhoef, J.C., Borchard, G., Sarisuta, N., Junginger, H.E., 2004, In vitro evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels, *Int. J. Pharm.*, 269 (2), 303-310.
- Ray, D., Sahoo, P.K., Mohanta, G.P., 2008, Designing of superporous cross-linked hydrogels containing acrylic-based polymer network, *Asian J. Pharm.*, 2, 123-127.
- Ray, D., Mohanta, G.P., Manavalan, R., Sahoo, P.K., 2009, Synthesis and characterization of acrylic based copolymeric hydrogel nanoparticles: an approach to drugdelivery, *Int. J. ChemTech Res.*, 1(3), 627-633.
- Ritger, P.L., Peppas, N.A., 1987, A simple equation for description of solute release I. Fickian and anomalous release from swellable devices, *J. Control. Rel.*, 5, 37-42.
- Qiu, Y., Park, K., 2001, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 53, 321-339.
- Qui, Y., Park, K., 2003, Superporous IPN hydrogels having enhanced mechanical properties, *AAPS PharmSciTech*, 4(4), 406-412.
- Sarkar, A., Goh, K.K.T., 2010, Singh, H., Properties of oil-in-water emulsions stabilized by b-lactoglobulin in simulated gastric fluid as influenced by ionic strength and presence of mucin, *Food Hydrocoll.*, 24, 534-54.
- Satterfield, C.N., Colton, C.K., and Pitcher, W.H.Jr., 1973, Restricted diffusion of liquids within fine pores, *AIChE J.*, 19, 628-635.
- Serizawa, T., Wakita, K., Kaneko, T., Akashi, M., 2002, Thermoresponsive properties of porous poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels prepared in the presence of nanosized silica particles and subsequent acid treatment, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 40 (23), 4228-4235.
- Shalaby, W.S.W., Abdallah, A.A., Park, H. and Park, K., 1993, Loading of bovine serum albumin into hydrogels by an electrophoretic process and its potential application to protein drugs, *Pharm. Res.*, 10 (3), 457-460.

- Shalaby, W.S.W., Blevins, W.E., Park, K., 1992, In vitro studies of enzyme-digestible hydrogels for oral drug delivery, *J. Control. Rel.*, 19, 131-144.
- Sharma, U., J.D., Carbeck, 2005, Hydrodynamic radius ladders of proteins, *Electrophoresis*, 26, 2086-2091.
- Sperling, L.H., Klemperer, D., Utracki L.A., 1994, Interpenetrating polymer networks: an overview, American Chemical Society, Washington, 3-38.
- Sperling, L.H., 1985, Recent advances in interpenetrating polymer networks, *Polym. Eng. Sci.*, 25 (9), 517-520.
- Sperling, L.H., 1981, *Interpenetrating Polymer Networks and Related Materials*, Plenum Press, New York, pp. 1-10.
- Stippler, E., Kopp, S., Dressman, J.B., 2004, Comparison of US Pharmacopeia simulated gastric fluid TS (without pancreatin) and phosphate standard buffer pH 6.8, ts of the International Pharmacopoeia with respect to their use in in vitro dissolution testing, *Dissolut. Technol.*, May, 6–10.
- Tanaka, T., Fillmore, D.J., 1979, Kinetics of swelling of gels, *J. Chem. Phys.*, 70, 1214-1218.
- Tang, C., Yin, C., Pei, Y., Zhang, M., Wu, L., New superporous hydrogels composites based on aqueous Carbopol® solution (SPHCs): synthesis, characterization and in vitro bioadhesive force studies, *Eur. Polym. J.*, 41 (3), 557-562.
- Talebian, A., Kordestani, S.S., Rashidi, A., Dadashian, F., Montazeri, M., 2007, The effect of glutaraldehyde on the properties of gelatin films, *Chem. Ind.*, 56, 537–541.
- Torres-Lugo, M., Peppas, N.A., 1999, Molecular design and in vitro studies of novel pH-sensitive hydrogels for the oral delivery of calcitonin, *Macromolecules*, 32, 6646-6651.
- Tracy, M.A., 1998, Development and scale-up of a microsphere protein delivery system, *Biotechnol. Prog.*, 14 (1), 108-115.
- Tsapikouni, T.S., Allen, S., Missirilis, Y.S., 2008, High molecular weight derivatives of human fibrinogen produced by plasmin, *Biointerphases*, 3 (1), 1-8.
- Üzüm, Ö.B., 2008, Yeni Akrilamid Esaslı Anyonik IPN'lerin sentezi, karakterizasyonu ve şişme/soğurum/denetimli salının potansiyellerinin araştırılması, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 162s.
- Wichterle, O., Lim, D., 1960, Hydrophilic gels for biological use, *Nature*, 185, 117-118.
- Yang, S., Park, K., 2004, Semi-interpenetrating polymer networks superporous hydrogels based on poly(3-sulfopropylacrylate, potassium salt) and

poly(vinyl alcohol): synthesis and characterization, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 19, 81-100.

Zhang, X., Lewis, P.J., Chu, C., 2005, Fabrication and characterization of a smart drug delivery system: microsphere in hydrogel, *Biomaterials*, 26 (16), 3299–3309.

Zhang, X., Zhou, R., 1999, A novel method to prepare a fast responsive, thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel, *Macromol. Rapid Commun.* 20, 229–23.

EKLER

EK-1

ŞİŞME KİNETİK ÇALIŞMALARINI İLE İLGİLİ VERİLER

Bölüm 3.3.1'de verilen yöntem ile gerçekleştirilmiş olan şişme çalışmalarına ait veriler aşağıdadır:

Yapay mide ortamındaki (pH:2) şişme kinetiğine ait veriler:

Tüm hidrojellerin yapay mide ortamı içerisindeki ortalama şişme oranları, standart sapma değerleri ile birlikte aşağıdaki çizelgede sunulmuştur.

Zaman (sn.)	Şişme oranı _{ort*} (Q _{ort*})					
	p(HEMA) SPH	p(HEMA)-jelatin SPH	p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	p(HEMA)-PEG SPH	p(HEMA-ko-AA) SPH	p(HEMA-ko-AA)- PEG SPH
	W _d =0.0690± 0.0010 g	W _d =0.0886 ± 0.0218 g	W _d =0.1058 ± 0.0285 g	W _d =0.0584 ± 0.0020 g	W _d =0.0757 ± 0.0072 g	W _d =0.0475 ± 0.0010 g
5	2.0839±0.7667	1.2863±0.5009	2.6531±0.6668	3.1834±0.3735	1.4250±0.6253	2.1828±1.0806
10	1.8819±0.5237	1.7295±0.4170	2.8599±0.5594	3.2614±0.2865	2.4627±0.4619	2.6648±0.8489
15	1.8111±0.5988	1.9497±0.2159	3.0791±0.5749	3.3093±0.2901	2.5205±0.5006	2.8437±0.5622
25	1.6502±0.4037	2.0269±0.2050	3.1100±0.6494	3.3333±0.3237	2.9636±0.5916	2.9995±0.3559
35	1.7720±0.4740	2.1277±0.2471	3.3012±0.5062	3.3608±0.3461	3.1726±0.7434	3.1114±0.2678
45	1.6968±0.4212	2.1822±0.1964	3.2982±0.5390	3.3719±0.3417	3.2475±0.7969	3.2232±0.2688
60	1.7940±0.3993	2.2338±0.1575	3.3657±0.5109	3.4319±0.3451	3.4098±0.6716	3.2744±0.2258
90	1.8147±0.4757	2.2714±0.2000	3.3746±0.5035	3.4704±0.3392	3.5813±0.5814	3.3269±0.1910
120	1.8006±0.5241	2.2823±0.1965	3.3881±0.5013	3.5373±0.4129	3.8021±0.4371	3.3652±0.1946
180	1.8148±0.4261	2.3453±0.1776	3.4020±0.5000	3.5698±0.4152	3.9096±0.4440	3.3515±0.2551
300	1.8827±0.5150	2.2945±0.0983	3.4459±0.05394	3.6264±0.4223	3.9866±0.4169	3.4175±0.2207
420	1.8696±0.4985	2.3106±0.0906	3.4597±0.5479	3.6701±0.4417	4.0187±0.3830	3.4475±0.2376
600	1.8213±0.4465	2.3228±0.0989	3.4787±0.5304	3.6855±0.4726	4.0507±0.3936	3.4377±0.2572

*n=3 için Eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanan ortalama şişme değeridir.

W_d= Kuru jel ağırlığı

Yapay bağırsak ortamındaki (pH:7) şişme kinetiğine ait veriler:

p(HEMA)-bazlı SPH ve SPH-IPN'lerinin yapay bağırsak ortamı içerisindeki şişme oranları, standart sapma değerleri ile birlikte aşağıdaki çizelgede sunulmuştur.

Zaman (sn.)	Şişme oranı _{ort} * (Q _{ort} *)			
	p(HEMA) SPH	p(HEMA)-jelatin SPH	p(HEMA)-jelatin SPH-IPN	p(HEMA)-PEG SPH
	W _d =0.0666± 0.0028 g	W _d =0.0934 ± 0.0026 g	W _d =0.0902 ± 0.0078 g	W _d =0.0596 ± 0.0048 g
5	2.7997±0.1019	1.8869±0.0821	1.1994±0.9560	3.2384±0.2003
10	2.8553±0.1659	2.2170±0.1135	1.6138±0.6648	3.6477±0.2651
15	2.9046±0.1356	2.3445±0.0683	1.9708±0.4212	3.7509±0.2839
25	2.9621±0.1255	2.3988±0.0276	2.0157±0.4065	3.8523±0.2329
35	2.9983±0.0909	2.4942±0.0338	2.2568±0.3369	3.8826±0.2047
45	3.0238±0.1044	2.6047±0.1475	2.3633±0.2755	3.9306±0.1995
60	3.0825±0.1079	2.6316±0.1340	2.5710±0.1469	4.1077±0.1630
90	3.1244±0.0989	2.7294±0.1838	2.6253±0.1388	4.1158±0.2036
120	3.1546±0.1140	2.7464±0.1758	2.5877±0.1660	4.1267±0.1801
180	3.1769±0.1668	2.7995±0.1437	2.7568±0.0572	4.1157±0.1949
300	3.2032±0.1380	2.8381±0.1112	2.7704±0.1384	4.1174±0.2297
420	3.1777±0.1357	2.8649±0.1005	2.7933±0.1335	4.1299±0.2309
600	3.1803±0.1158	2.8992±0.0831	2.8048±0.2629	4.1286±0.2254

*n=3 için Eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanan ortalama şişme değeridir.
W_d= Kuru jel ağırlığı

Zaman (dk.)	Şişme oranı _{ort} * (Q _{ort} *)	
	p(HEMA-ko-AA) SPH	p(HEMA-ko-AA)- PEG SPH
	W _d =0.0942 ± 0.0052 g	W _d =0.0532 ± 0.0012 g
5	14.8917±1.0205	22.1616±1.6003
10	16.3609±1.5012	26.6409±1.3612
15	18.0358±1.4250	30.0150±2.2139
20	18.6199±2.0065	31.8496±2.3260
25	20.6061±2.0325	33.9154±1.9145
30	21.9416±1.8755	35.4342±2.4823
45	21.6443±2.0587	36.5582±3.1295
60	21.7855±2.1052	36.4060±2.4630

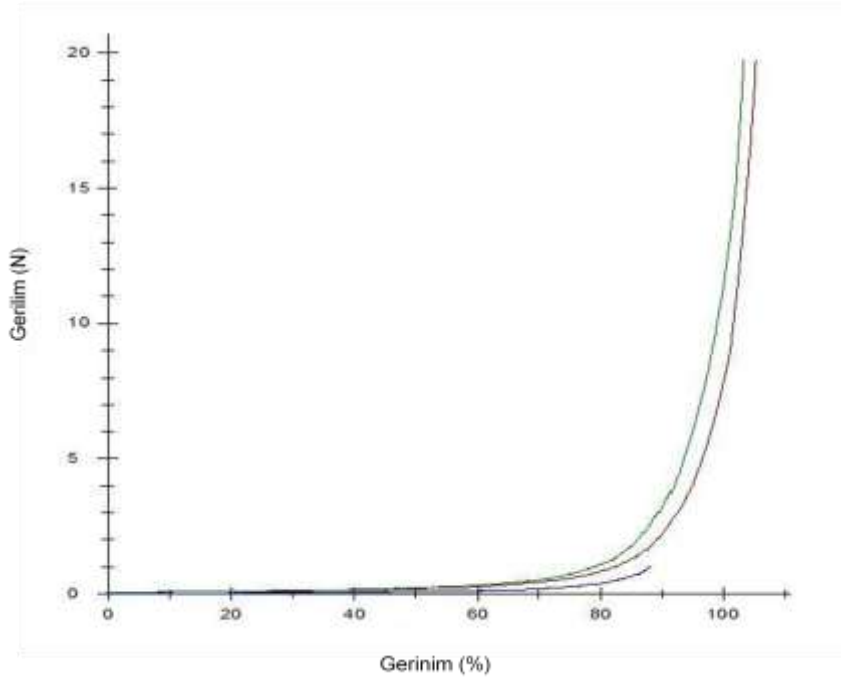
*n=3 için Eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanan ortalama şişme değeridir.
W_d= Kuru jel ağırlığı

EK-2

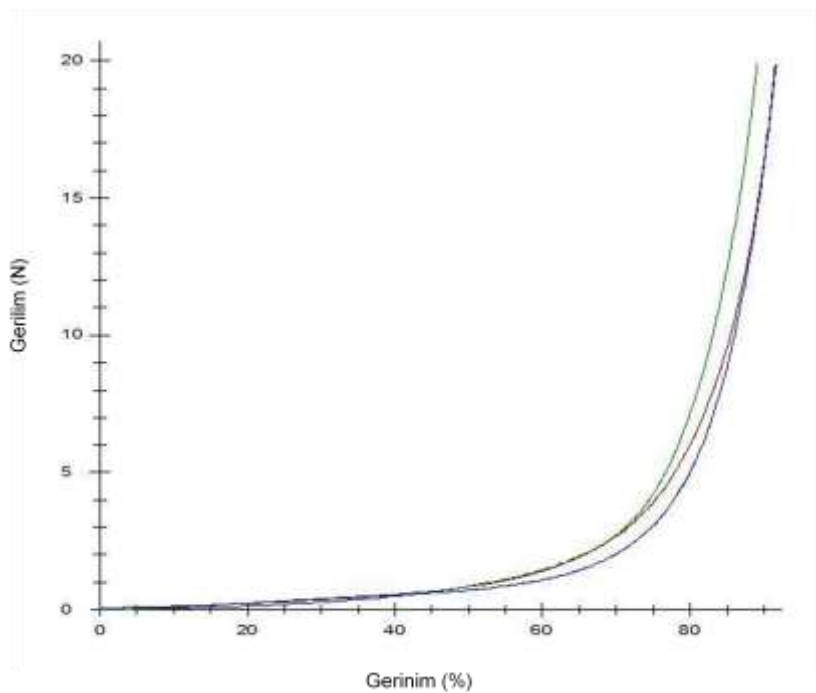
ŞİŞMİŞ HİDROJELLERİN SIKIŞTIRMA DAYANIM EĞRİLERİ

Bölüm 3.3.5'da anlatılan yöntem ile gerçekleştirilen mekanik dayanım testi sonucunda elde edilen gerilim-gerinin eğrileri aşağıdadır:

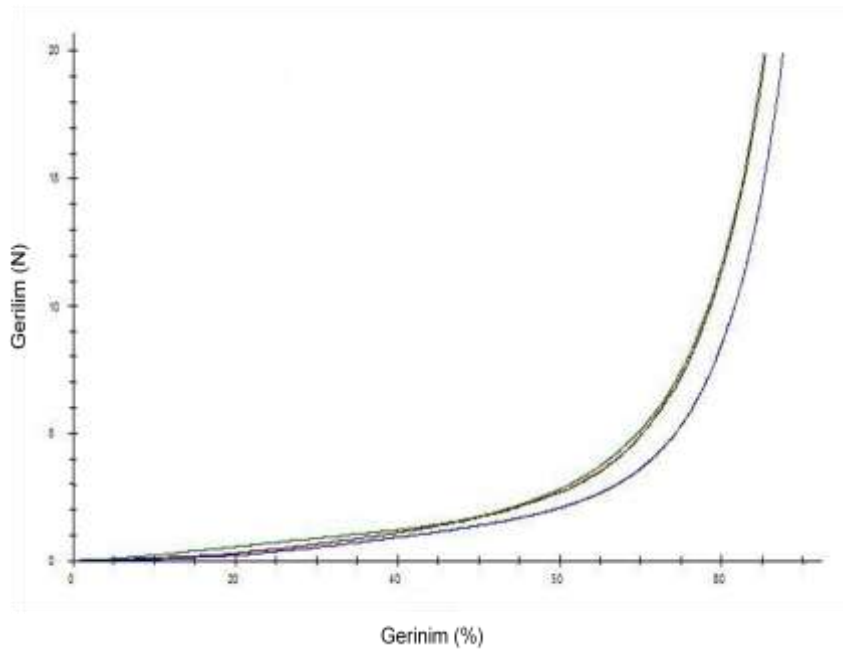
- p(HEMA) SPH'lerine ait grafik



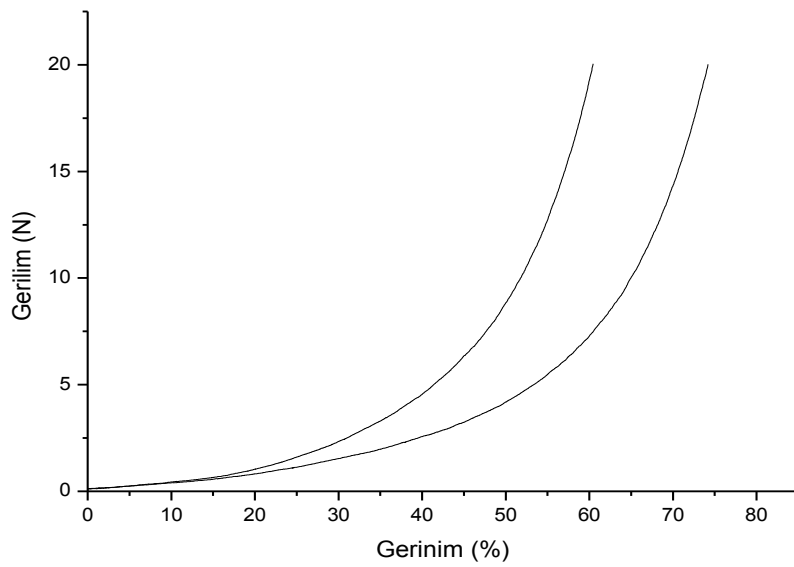
- p(HEMA)-jelatin SPH'lerine ait grafik



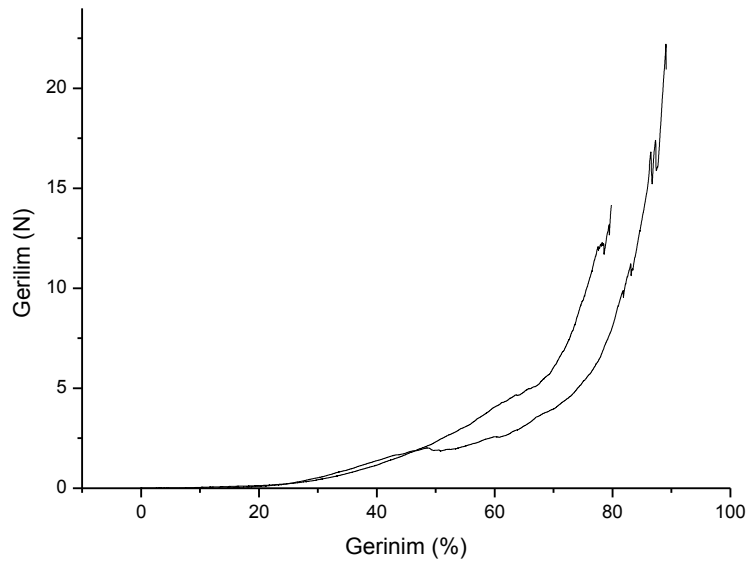
- p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerine ait grafik



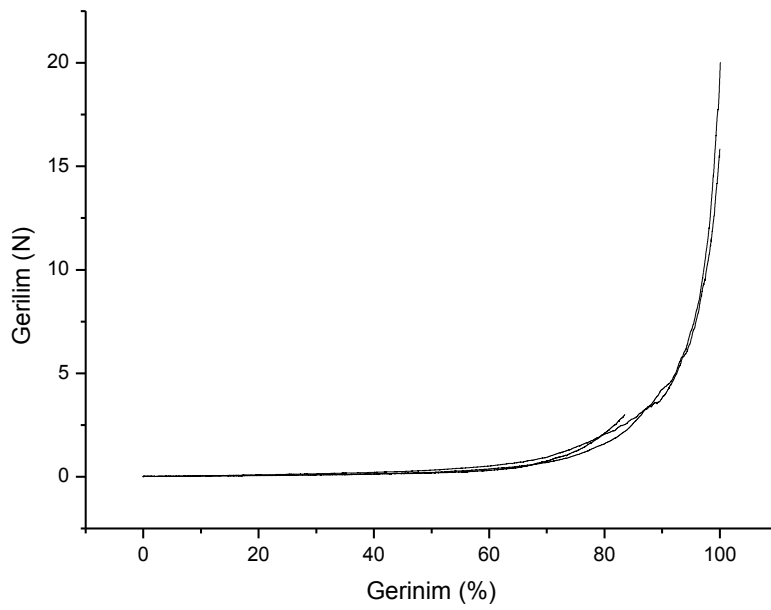
- p(HEMA)-PEG SPH'lerine ait grafik



- p(HEMA-ko-AA) SPH'lerine ait grafik



- p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerine ait grafik



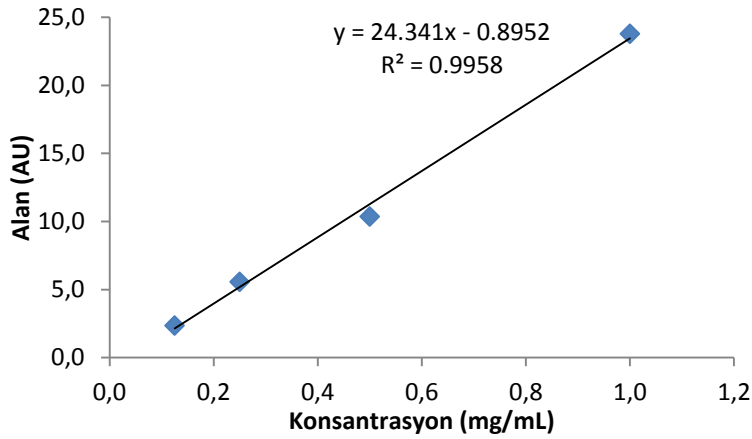
EK-3

PROTEİN YÜKLÜ JELLERDEN KÜMÜLATİF SALIM DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI

- BSA yüklü jellere ait kümülatif salım değerlerinin hesaplanması

BSA yüklü hidrojellerden kümülatif salım değerlerinin hesaplanması amacıyla yapılan in vitro salım deneylerinde, salım ortamı belirli aralıklarla taze tampon ile yenilenecek BSA içeren örnek ile salım ortamı arasındaki konsantrasyon farkı sabit tutulmaya çalışılmıştır (perfect sink conditions). Örnek olarak, emdirme yöntemi kullanılarak 10 mg/mL konsantrasyona sahip BSA çözeltisi ile yüklenen p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerine ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur.

BSA kalibrasyon grafiği (0.0-1.0 mg/mL)



$$m_{\text{kuru jel}} = 0.0709 \text{ mg}$$

$$\text{Rezervuar hacmi} = 25 \text{ mL}$$

$$\text{Yenilene hacim} = 2.5 \text{ mL}$$

$$\text{Jele yüklenen protein miktarı} = 365.2968 \text{ mg BSA/g kuru jel}$$

$$t = 1. \text{ saat}$$

$$\text{Alan} = 12.1943$$

C= 0.5329 mg/mL

Salınan BSA miktarı= 13.3230 mg

Atılan BSA miktarı= 1.3323 mg

Toplam BSA miktarı= 13.3230 + 1.4319= 14.7550 mg

Salınan BSA miktarı (mg/g kuru jel)= 14.7550 / 0.0709= 336.8716 mg/g kuru jel

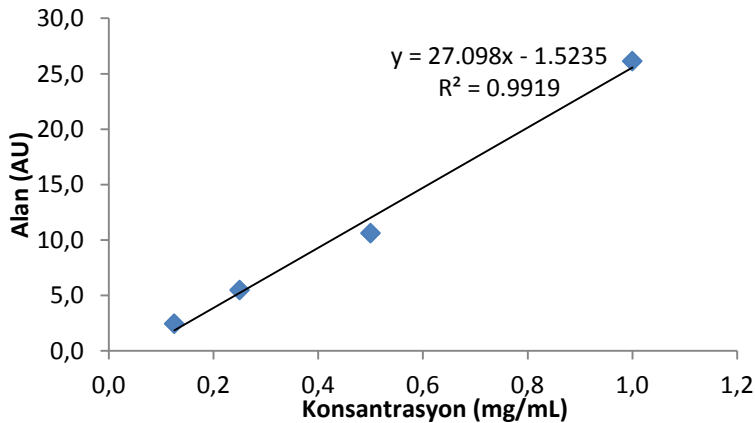
p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'den BSA salımına ait veriler

p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH						
Zaman (saat)	Alan (AU)	C (mg/ml)	Salınan BSA (mg)	Atılan BSA (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Salınan Protein Miktarı (mg BSA/g Jel)
0	0	0	0	0	0	0
30	13.1477	0.5728	14.3193	1.4319	14.3193	326.9257
60	12.1943	0.5329	13.3230	1.3323	14.7550	336.8716
120	11.1044	0.4874	12.1841	1.2184	14.9483	341.2862
180	9.9858	0.4406	11.0152	1.1015	14.9978	342.4157
360	9.0119	0.3999	9.9974	0.9997	15.0816	344.3288
1440	8.2935	0.3699	9.2467	0.9247	15.3306	350.0141

- FG yüklü jellere ait kümülatif salım değerlerinin hesaplanması

FG yüklü hidrojellerden kümülatif salım değerlerinin belirlenmesi için, emdirme yöntemi kullanılarak 10 mg/mL konsantrasyona sahip BSA çözeltisi ile yüklenen p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'lerine ait kümülatif salım hesaplamaları aşağıda sunulmuştur.

FG kalibrasyon grafiği (0.0-1.0 mg/mL)



$m_{\text{kuru jel}} = 0.0334 \text{ mg}$

Rezervuar hacmi= 25 mL

Yenilene hacim= 2.5 mL

Jele yüklenen protein miktarı= 331.0526 mg FG/g kuru jel

$t = 1. \text{ saat}$

Alan= 5.5037

$C = 0.2610 \text{ mg/mL}$

Salınan FG miktarı= 6.5259 mg

Atılan FG miktarı= 0.6526 mg

Toplam FG miktarı= 6.5259 + 0.6561= 7.1819 mg

Salınan FG miktarı (mg/g kuru jel)= 7.1819 / 0.0334= 236.2481 mg/g kuru jel

p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH'den FG salımına ait veriler

p(HEMA-ko-AA)-PEG SPH						
Zaman (saat)	Alan (AU)	C (mg/ml)	Salınan FG (mg)	Atılan FG (mg/ml)	Toplam Protein (mg)	Salınan Protein Miktarı (mg FG/g Jel)
0	0	0	0	0	0	0
30	5.5416	0.2624	6.5606	0.6561	6.5606	215.8080
60	5.5037	0.2610	6.5259	0.6526	7.1819	236.2481
120	6.5419	0.2990	7.4758	0.7476	8.7845	288.9633
180	5.9670	0.2780	6.9498	0.6950	9.0060	296.2511
360	5.7244	0.2691	6.7278	0.6728	9.4790	311.8104
1440	4.8950	0.2388	5.9689	0.5969	9.3929	308.9775

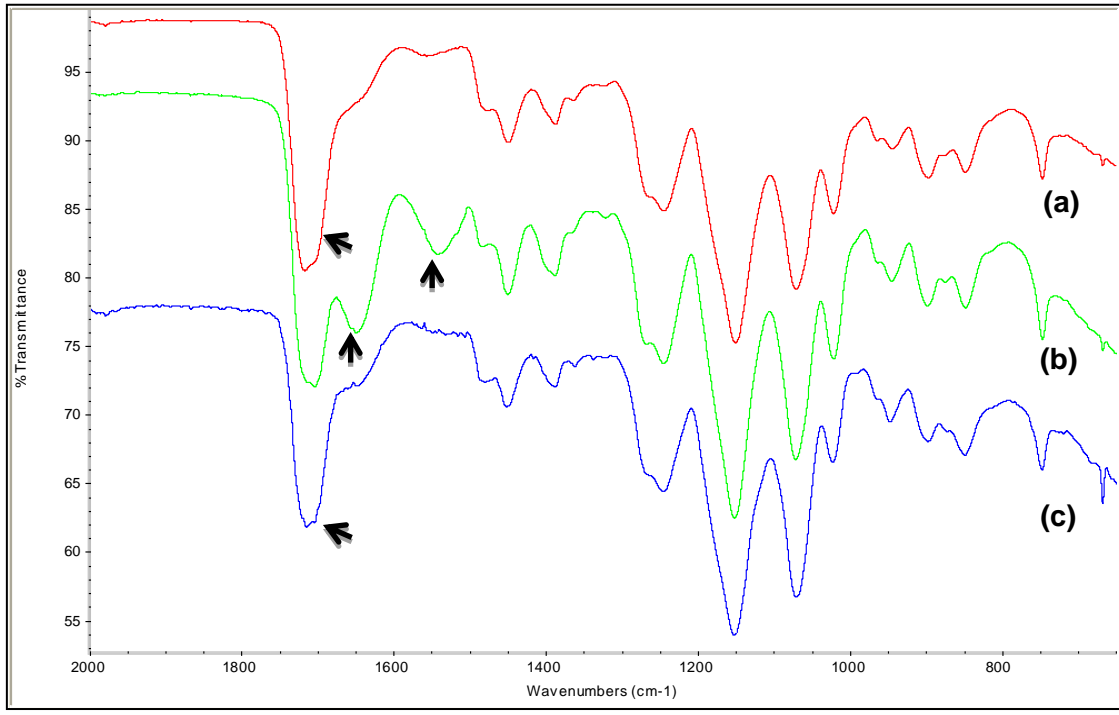
EK-4

PROTEİN YÜKLÜ VE SALIM SONRASI HİDROJELLERİN FTIR-ATR SPEKTRUMLARI

- BSA yüklü ve salım sonrası hidrojellere ait örnek FTIR-ATR spektrumları

p(HEMA)-jelatin SPH için FTIR analizi

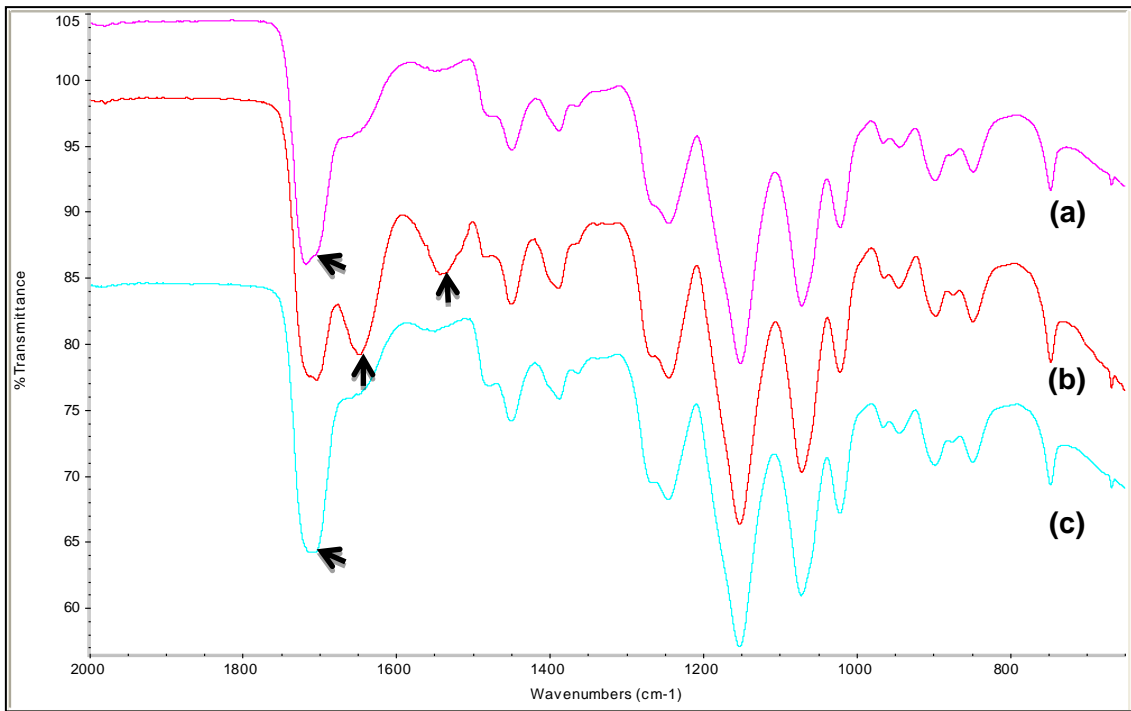
p(HEMA)-jelatin SPH'lerine ait FTIR spektrumları aşağıda görülmektedir; (a) p(HEMA)-jelatin SPH, (b) BSA yüklü p(HEMA)-jelatin SPH ve (c) salım sonrası p(HEMA)-jelatin SPH.



- FG yüklü ve salım sonrası hidrojellere ait örnek FTIR-ATR spektrumları

p(HEMA)-jelatin SPH-IPN için FTIR analizi

p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'lerine ait FTIR spektrumları aşağıda görülmektedir; (a) p(HEMA)-jelatin SPH-IPN, (b) FG yüklü p(HEMA)-jelatin SPH-IPN ve (c) salım sonrası p(HEMA)-jelatin SPH-IPN'e ait FTIR spektrumları.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Pınar TÜRKYILMAZ

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 22.11.1985

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği (2009-2012)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu (2004-2005)

: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği (2005-2009)

Lise : Batıkent Süper (YDA) Lisesi (1999-2003)

Yabancı Dil : İngilizce (ileri)

İş Deneyimi:

2010- 2011 : Türk Henkel, UW İş-İşçi güvenliği/Çevre/Kalite Departmanı
Stajyer Kimya Mühendisi