

**YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN KİTOSAN ESASLI  
HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tolga YİRMİBEŞOĞLU**

**Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Polimer Mühendisliği Programı**

**HAZİRAN 2019**



**YALOVA ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN KİTOSAN ESASLI  
HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tolga YİRMİBEŞOĞLU  
155101005**

**Polimer Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Polimer Mühendisliği Programı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mithat ÇELEBİ**

**HAZİRAN 2019**



YALOVA Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 155101005 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Tolga YİRMİBEŞOĞLU**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN KİTOSAN ESASLI HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

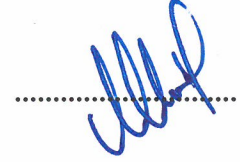
Tez Danışmanı : **Dr. Öğr. Üyesi Mithat ÇELEBİ**  
Yalova Üniversitesi



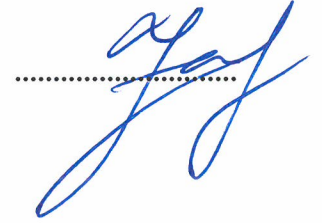
Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Mithat ÇELEBİ**  
Yalova Üniversitesi



**Dr. Öğr. Üyesi M. Arif KAYA**  
Yalova Üniversitesi



**Dr. Öğr. Üyesi Z. Ömer ÖZDEMİR**  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi



Teslim Tarihi : 13 MAYIS 2019  
Savunma Tarihi : 21 HAZİRAN 2019





*Aileme,*





## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini eksik etmeyip çalışmalarım boyunca yardımcı olan Danışman Hocam Dr. Öğretim Üyesi Mithat ÇELEBİ'ye, deneysel çalışmalarım sırasında kitosanın modifikasyonu ve hidrojel sentezinde tecrübeleri ile çalışmalarına yardımcı olan Dr. Arş. Gör. Mehmet Arslan'a, Yalova Üniv. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, sentez ve karakterizasyon aşamalarında laboratuvarının olanaklarının kapılarını açan Boğaziçi Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Amitav SANYAL'a teşekkür ediyorum.

Haziran 2019

Tolga Yirmibeşoğlu  
Polimer Mühendisi

Bu yüksek lisans tezi Yalova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje Numarası: 2017/YL/0010) tarafından desteklenmiştir.



## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	ix
KISALTMALAR .....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY .....	xix
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. KİTOSAN ESASLI HİDROJEL HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ.....</b>	<b>7</b>
2.1 Kimyasal Çapraz Bağlama Yoluyla Kitosan Hidrojellerinin Hazırlanması.....	7
2.2 Çapraz Bağlayıcılar ile Çapraz Bağlanma .....	8
2.3 Fotopolimerizasyon Yoluyla Çapraz Bağlanma.....	9
2.4 Fiziksel Çapraz Bağlanma.....	10
2.5 İyonik Çapraz Bağlı Kitosan Hidrojeller .....	10
<b>3. DENEYSEL BÖLÜM.....</b>	<b>13</b>
3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	13
3.2 Kullanılan Cihazlar .....	13
3.3 Sentez Yöntemleri .....	13
3.3.1 Kitosan türevlerinin sentezi .....	13
3.3.1.1 N-ftaloil kitosan (Ch-Pht) sentezi .....	13
3.3.1.2 p-Tolüen sülfonarla aktive edilmiş PEG sentezi (MeO-PEG-OTs) ...	14
3.3.1.3 PEG aşılantılmış N-ftaloil kitosan (Ch-Pht-PEG) sentezi.....	15
3.3.1.4 PEG aşılantılmış N-ftaloil kitosanın (Ch-Pht-PEG) hidrazinlenmesi ...	15
3.3.1.5 Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılantılmış kitosan sentezi .....	16
3.3.2 Akrioloil ile modifiye edilmiş $\beta$ -siklodekstrin sentezi.....	17
3.3.3 Hidrojel sentezi .....	17
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>19</b>
4.1 Kitosan Esaslı $\beta$ -Siklodekstrin İçeren Hidrojellerin Hazırlanması .....	19
4.1.1 Tiyol modifiye poli(etilen glikol) aşılantılmış kitosan (Ch-PEG-SH) türevi sentezi.....	19
4.1.2 Tiyol modifiye poli(etilen glikol) aşılantılmış kitosan (Ch-PEG-SH) türevlerinin karakterizasyon.....	20
4.1.2.1 FT-IR ve $^1\text{H}$ NMR analizi .....	20
4.1.2.2 PEG aşılantıma derecesinin belirlenmesi .....	22
4.1.2.3 Sülfhidril içeriğinin belirlenmesi .....	22
4.1.2.4 Şişme oranı dengesi (ESRs).....	22
4.1.2.5 Polimer Ch-PEG-SH' nin tiyol içeriğinin belirlenmesi .....	22
4.1.3 Kitosan esaslı $\beta$ -siklodekstrin içeren hidrojellerin tiyol-en klik kimyası ile sentezi.....	24
4.1.3.1 Kitosan esaslı $\beta$ -siklodekstrin içeren hidrojellerin karakterizasyonu..	25

<b>5. SONUÇ</b> .....	<b>29</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>31</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>35</b>



## KISALTMALAR

<b>PEG</b>	: Poli(Etilen Glikol)
<b>CD</b>	: Siklodekstrin
<b>NMR</b>	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
<b>FT-IR</b>	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>DMF</b>	: Dimetilformamid
<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	: Potasyum Karbonat
<b>MWCO</b>	: Moleküler Ağırlığı Ayırma Sınırı
<b>NHS</b>	: N-Hidroksisüksinimid
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>β-CD</b>	: β-siklodekstrin
<b>β-CD-Ac</b>	: β-Siklodekstrin-akrilat



## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa

Çizelge 1.1 : İlaç salınımı için hidrojel uygulamaları.....	5
Çizelge 1.2 : Doku mühendisliğinde hidrojel uygulamaları.....	6
Çizelge 1.3 : Mevcut pazarlanan hidrojeller ve uygulamaları.....	6
Çizelge 4.1 : Değişken Ch-PEG-SH/β-CD-Ac oranına sahip hidrojellerin özellikleri. .....	25







## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 : Kitosanın (a) deasetillenmiş ve (b) asetillenmiş birimleri.....	1
Şekil 2.1 : Kovalent çapraz bağlama ile hazırlanan kitosan bazlı hidrojenin yapısı. ..	7
Şekil 2.2 : Genipin ile kitosan zincirleri arasında çapraz bağlama.....	9
Şekil 2.3 : Üç ana siklodekstrin tipinin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 3.1 : N-ftaloil kitosan sentez reaksiyon şeması. ....	14
Şekil 3.2 : p-Toluensülfonatla aktive edilmiş poli(etilen glikol) tosilat. ....	14
Şekil 3.3 : PEG aşılınmış N-ftaloil kitosan (Ch-Pht-PEG) sentez reaksiyon şeması. .....	15
Şekil 3.4 : PEG aşılınmış N-ftaloil kitosanın (Ch-Pht-PEG) hidrazinlenme şeması. 16	
Şekil 3.4 : Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılınmış kitosan (Ch-PEG-SH) sentez reaksiyon şeması. ....	16
Şekil 3.3 : Akriloil-β-siklodekstrin sentez reaksiyon aşaması.....	17
Şekil 4.1 : PEG aşılınmış, hidrazinoliz ve tiyol modifikasyon adımlarından sonra polimerlerin FT-IR yapısal analizleri. ....	20
Şekil 4.2 : PEG aşılınmış, hidrazinoliz ve tiyol modifikasyon adımlarından sonra polimerlerin <sup>1</sup> H NMR yapısal analizleri. ....	21
Şekil 4.3 : Ch-PEG-SH polimerinin Ellman reaktifi ile tepkimesinin gösterilmesi. .	23
Şekil 4.4 : Ellman analizi sonucu oluşan TNB iyonunun UV spektrumu. ....	23
Şekil 4.5 : Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılınmış kitosanın ve akriloil ile modifiye edilmiş β-CD'nin thiol-ene click reaksiyonu ile hidrojel oluşumunun genel temsili. ....	24
Şekil 4.6 : Dondurarak kurutulmuş hidrojellerin temsili SEM görüntüleri (Ölçek çubuğu: 20 µm). ....	25
Şekil 4.7 : Sudaki hidrojellerin şişme denge profilleri. ....	26
Şekil 4.8 : Hidrojellerin dinamik frekans tarama analizi (G', katı semboller ve G'', açık semboller). ....	27



## BIYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN KİTOSAN ESASLI HİDROJELLERİN GELİŞTİRİLMESİ

### ÖZET

Kitosan dünyada selülozdan sonra en bol bulunan kitinden üretilen çok yönlü bir biyopolimerdir. Kitin kabuklu deniz canlılarında, böceklerde ve mantarlarda bulunur. Kitosan, biyobozunurluğu, antimikrobiyal, antifungal vb. özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. Kitosan toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu, biyobozunur ve antimikrobiyal bir polimerdir. Kitosan polimeri ilaç salınım sistemlerinde, hücre salınım sistemlerinde ve ortopedi, yara iyileşmesi, oftalmoloji, ilaç ve kemik iyileşmesinde kullanılır. Kitosan, ilaç salınım sistemlerinde, hidrojelde ve yara örtülerinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Hücre çoğalmasını ve "histoarchitectural" doku organizasyonunu uyarır. Kitosan yara iyileşmesinde esasen biyolojik uyumluluğu, biyolojik bozunabilirliği, antimikrobiyal yapısı ve ayrıca bakteriyostatik ve mantar özelliklerine bağlı olarak yardımcı olur. Kitosanın biyoyuymululuk özelliğinden yararlanarak implantasyon, enjeksiyon veya topikal göz uygulamaları gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Kitosan filminin, sargı olarak kullanıldığı, sağlam, strese dayanıklı, esnek, esnek ve esnek olması gerektiği ve sargı değişiklikleri sırasında herhangi bir travma olmadan yaraya uygulanması ve çıkarılmasının kolay olduğu saptanmıştır.

Bu tez çalışmasında kitosan esaslı hidrojellerin elde edilmesi amacıyla orta molekül ağırlıklı kitosana çeşitli modifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, serbest amin gruplarının korunması için kitosan ftalik anhidrit ile modifiye edilerek ftaloil kitosan elde edildi. Bir sonraki adımda, poli(etilen glikol) gruplarının kitosanın hidroksil özellikleri ile birleştirilmesi ve amin gruplarının daha sonra kullanılabilmesi için hidroksil grupları üzerine "aşılama" işlemi gerçekleştirildi. Poli(etilen glikol) aşılama işlemi sonrasında, korunmuş ftaloil grupları, amino gruplarını reaktif formlarında tekrardan açığa çıkarılması için hidrazinlenme işlemi gerçekleştirildi. Son adımda, PEG aşılama işlemi kitosanın yan zincirlerinde bulunan amino gruplarının tiyol-en ile reaktif hale getirilmiş merkaptopropiyonik asit ile konjüge edilerek kitosan esaslı hidrojel hazırlandı. Hazırlanan hidrojellerin özellikleri karakterize edildi.

Malzemelerin karakterizasyonları FT-IR ve <sup>1</sup>H NMR analizleri ile yapılmıştır. Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılama işlemi kitosanın toplam sülfhidril içeriği ve tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılama işlemi kitosanın toplam tiyol içeriği, Ellman'ın metodu kullanılarak belirlendi.



## **DEVELOPMENT OF CHITOSAN BASED HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

### **SUMMARY**

Chitosan is a versatile biopolymer produced from the world's most abundant kit after cellulose. The chitin is found in shellfish, insects and fungi. Chitosan can be used in biomedical applications due to its biodegradability, antimicrobial and antifungal properties. Chitosan is a non-toxic, biocompatible, biodegradable and antimicrobial polymer. Chitosan polymer is used in drug release systems, cell release systems and orthopedics, wound healing, ophthalmology, medicine and bone healing. Chitosan has a wide range of applications in drug release systems, hydrogels and wound dressings. It stimulates cell proliferation and "histoarchitectural" tissue organization. Chitosan helps in wound healing mainly due to its biocompatibility, biodegradability, antimicrobial structure as well as bacteriostatic and fungal properties. The polycationic structure of the chitosan and the interaction between the positively charged chitosan and the negatively charged cell wall lead to the leakage of intracellular components and thus the death of the harmful organism. Utilizing the biocompatibility of chitosan, it is used in various biomedical applications such as implantation, injection or topical eye applications. It was found that the chitosan film was used as a dressing, it should be robust, stress resistant, flexible, flexible and flexible, and it was easy to apply and remove to the wound without any trauma during winding changes.

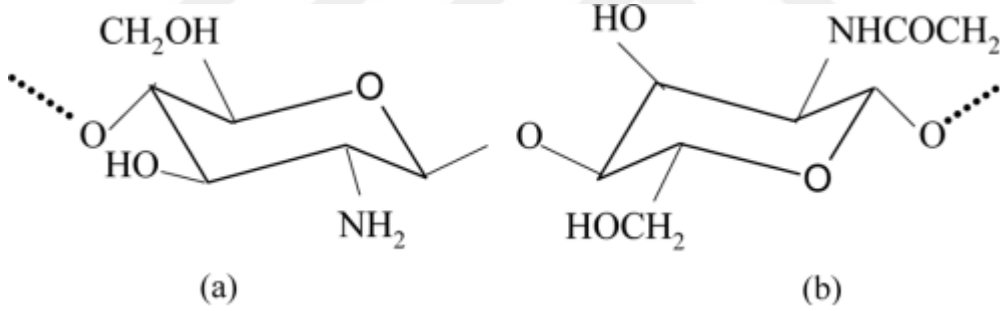
In this thesis, in order to obtain chitosan-based hydrogels, various modification processes were carried out in the middle molecular weight chitosan. Primarily, chitosan was modified with phthalic anhydride to protect the free amine groups and phthaloyl chitosan was obtained. In the next step, grafting process was carried out on the hydroxyl groups to combine the poly(ethylene glycol) groups with the hydroxyl properties of the chitosan and the later use of the amine groups. Following poly(ethylene glycol) inoculation, hydrazination was carried out to restore protected phthaloyl groups in their reactive forms in amino groups. In the last step, chitosan-based hydrogels were prepared by conjugation with NHS-activated 3-mercaptopropionic acid to carry out the introduction of thiol-en-reactive merkapto groups of amino groups in the side chains of PEG grafted chitosan. Properties of prepared hydrogels were characterized.

Materials characterization was done by FT-IR and  $^1\text{H}$  NMR analysis. The total sulfhydryl content of thiol-modified PEG grafted chitosan was and the total thiol content of thiol-modified PEG grafted chitosan was determined using Ellman's method.



## 1. GİRİŞ

Kitosan, doğada en bol miktarda bulunan selülozdan sonra kitin biyopolimerinin kimyasal modifikasyonu ile elde edilen biyouyumlu, biyobozunur ve antimikrobiyal bir polimerdir. Bununla birlikte, kitin uygulamaları, kitosan ile karşılaştırıldığında sınırlıdır çünkü kitin, yapısal olarak selüloza benzer ancak kimyasal olarak inert olduğundan uygulamada zorluklar yaşanmaktadır. Bundan dolayı çeşitli modifikasyonlar yapılmaktadır. Kitosan,  $\beta$ -(1-4) glikozidik bağlarından meydana gelir. Kitosan glukozaminin baskın yinelenen birim olduğu D-glikosamin ve N-asetil D-glikozamin monomerlerin oluşan lineer bir kopolimeridir. Kitin ve kitosanın molekül kütlesi birkaç milyon dalton'a kadar olan uzun zincirli polimeri temsil eder (Taylor et al, 2014).



**Şekil 1.1** : Kitosanın (a) deasetillenmiş ve (b) asetillenmiş birimleri.

Kitosan, genellikle, kitinin alkalik deasetilasyonu ile elde edilen  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) bağlı 2-asetamido-2-deoksi-D-glikopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-D-glükopiranoz ünitelerinden oluşan bir kopolimerdir. Kabukluların dış iskeletinin ana bileşenidir (Chen et al., 2016).

Kitosan toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen antimikrobiyal bir polimerdir. Kitosan polimeri ilaç salınım sistemlerinde, hücre dağıtım sistemlerinde ve ortopedi, yara iyileşmesi, oftalmoloji, ilaç ve kemik iyileşmesinde kullanılır. Bakteri, mantar ve mayaya karşı antimikrobiyal aktivite gösterir. Hipoalerjeniktir ve kanı hızlı pıhtılaştırma özelliğine sahiptir. Ayrıca kitosan

katyonik doğal bir polielektrolit olduğundan dolayı diyet lipidlerine bağlanarak yağ çekici olarak davranır. Kitosanın kan durdurucu özelliği iyidir ve yaraların daha hızlı iyileşmesine yardımcı olan makrofaj fonksiyonuna etki eder. Ek olarak, açık yara tedavisi için yararlı olan bakteriyostatik ve fungistatik özellikler gösterir. Yara sargısı olarak kullanılan kitosan yara için en uygun iyileşme ortamı oluşturmaktadır (Díez-Pascual & Díez-Vicente, 2015).

Kitosan, ilaç salınım sistemlerinde, hidrojellerde ve yara örtülerinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Hücre çoğalmasını ve “histoarchitectural” doku organizasyonunu uyarır. Kitosan yara iyileşmesinde esasen biyolojik uyumluluğu, biyolojik bozunabilirliği, antimikrobiyal yapısı ve ayrıca bakteriyostatik ve mantar özelliklerine bağlı olarak yardımcı olur. Kitosanın polikasyonik yapısı ve pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü hücre duvarı arasındaki etkileşim, hücre içi bileşenlerin sızıntısına ve dolayısıyla zararlı organizmanın ölümüne yol açar. Kitosanın biyoyumluluk özelliğinden yararlanarak implantasyon, enjeksiyon veya tropikal göz uygulamaları gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Kitosan filminin, sargı olarak kullanıldığı, sağlam, strese dayanıklı, esnek, esnek ve esnek olması gerektiği ve sargı değişiklikleri sırasında herhangi bir travma olmadan yaraya uygulanması ve çıkarılmasının kolay olduğu saptanmıştır. Filmlerin mekanik özellikleri önemlidir ve çeşitli yapılara sahip olan vücudun farklı bölümleri tarafından uygulanan gerilmeleri taşıyabilecek makul gerilme özelliklerine sahip olmalıdır. Üstelik sargı hızlı ve tekdüze yapışık olmalı ve hava veya sıvı cep oluşumunu önlemek için yara topografyası ve şekline uymalıdır. İyi yapışma; ağrıyı azaltır, dekontaminasyonu kolaylaştırır, bakteriler tarafından yaraya çevresel kanallanmayı önler ve dokulara yapışmayı arttırır. Sargı, bakteri girişine karşı mutlak bir engel oluşturmalı ve yara organizmalarının giyinme yüzeyine çıkmasını önlemelidir. Su buharı geçirgenliği için tercihen geçirgen olmakla birlikte, yara yatağının kurutulmasına yol açan fazla sıvı emme ve buharlaştırmanın da bu sargılarla önlenmiş olduğu saptanmıştır (Dragostin et al. 2016).

Kitosan yüzey modifikasyonu ve liyofilizasyon yoluyla stabil, gözenekli bir iskelet haline getirilebilir. Bununla birlikte, çeşitli katkı maddeleri ile harmanlanması biyoyumluluk derecesini etkileyebilir. Bu nedenle, çeşitli biyomedikal sınıfı kitosan türevlerinin biyoyumluluklarının değerlendirilmesi, insan yarasının yönetimi için



yüksek kalitede ve biyolojik olarak uyumlu malzeme mühendisliği için gereklidir. Jeller, zarlar, nanofiberler, nanofibriller, boncuklar, mikropartiküller, nanopartiküller, iskele ve sünger benzeri formlara kolayca işlenebilme avantajını sunar. Oluşturulan kitosan hidrojellerinin çeşitli yapıları aşağıda verilmektedir (Dragostin et al., 2016).

- Çapraz Bağlanmış Kitosan,
- Hibrid Polimer Ağı,
- Yarı-Nüfuz Eden Ağ,
- İyonik Çapraz Bağlanma.

Çapraz bağlayıcının doğasına bağlı olarak, bağlayıcıyı oluşturan ana etkileşimler, ağ kovalent veya iyonik bağlardır (Dragostin et al., 2016).

Jin ve ark. (2007) yanıkların erken tedavisinde kitosanın heparin ile etkilerini karşılaştırmışlardır. Sıçanların sırtlarındaki yanıklara, kitosan tozu, heparin tozu ve kitosan karışımı ve heparin uygulanmıştır. 72 saat sonra histolojik muayene, kitosan ile tedavi edilen grubun yanma derecesinin kontrol grubuna göre daha az şiddetli olduğunu ve kitosanın erken fazda yanıkların genişlemesini büyük ölçüde önlediğini göstermiştir. Aksine, heparin, yanıkların erken tedavisinde koruyucu bir etkiye sahip değildir. Jin ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada kitosan ve heparinin birlikte kullanılması ile kitosanın koruyucu etkisini zayıflattığı sonucuna ulaşmışlardır (Jin, Ling, He, & Zhang, 2007).

Alsarra, farklı molekül ağırlıklı ve DDA aralıklı sıçanların yanıklarına karşı kitosanın yara iyileştirici etkinliğini araştırdı. En yüksek yara iyileşme, yüksek molekül ağırlıklı ve yüksek DDA kitosan ile tedavi edilen grupta bulundu. Yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile tedavi edilen yanıklarda anlamlı olarak daha fazla epitel dokusu vardı ve en iyi reepitelyalizasyon ve en hızlı yara kapanması, yüksek molekül ağırlıklı kitosan tedavi grubunda bulundu. Histolojik inceleme ve kollajenaz aktivite çalışmaları, yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile tedavi edilen yaralarda gelişmiş granülasyon dokusu oluşumu ve epitelializasyon olduğunu ortaya koydu (Alsarra, 2009).

No ve ark. kitosan ve kitosan oligomerlerinin antibakteriyel aktivitelerini Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere karşı etkisini araştırdılar. Kitosanlar, kitosan oligomerlerine kıyasla daha yüksek antibakteriyel aktiviteler göstermekle birlikte,

inhibisyon etkileri, kitosan ve belirli bakterilerin moleküler ağırlıkları ile farklılık göstermesine rağmen, test edilen bakterilerin çoğalmasını önemli ölçüde inhibe etmiştir. Kitosan genelde gram-pozitif bakterilerde % 0,1 kitosan varlığında gram-negatif bakterilere kıyasla daha güçlü bakterisidal etki gösterdi. Kitosan çözücü olarak %1 asetik asit, %1 laktik veya formik asitlerle daha etkili şekilde bastırılmış laktik asit bakterileri hariç, test edilen bakterilerin çoğunun büyümesini inhibe etmede etkili olmuştur. Kitosanın antibakteriyel aktivitesi, daha düşük pH değerlerinde daha yüksek aktiviteye sahiptir (No, Young Park, Ho Lee, & Meyers, 2002).

Seyfarth ve ark (2008), *C. albicans*, *Candida krusei* ve *Candida glabrata* mantar türlerine karşı suda çözünür düşük ve yüksek molekül ağırlıklı kitosan hidroklorür, karboksimetil kitosan, kitosan oligosakarit ve Nasetil-D-glukosaminin antifungal aktivitelerini incelemiştir. Araştırmacılar, asit ortamında fungal türlere karşı düşük molekül ağırlıklı ve yüksek moleküler ağırlıklı kitosan hidroklorür konsantrasyona bağlı olarak antifungal aktiviteye etkisi olduğunu tespit ettiler. Düşük molekül ağırlık, düşük antifungal aktiviteye neden olmaktadır. Karboksimetil kitosanın mantar türlerine karşı aktivitesi düşük oldu. Araştırmacılar, bu fonksiyonel grup katyonik amino gruplarını maskelediğinden, kitosanın polikasyonik karakterinin antifungal aktivite için çok önemli olduğu sonucuna varıldı (Seyfarth, Schliemann, Elsner, & Hipler, 2008).

Kulkarni ve ark. (2005) Tiazolidinon türevlerine (TDK'ler) dönüştürdükten sonra, kitosanın antibakteriyel etkinliğini bildirmiştir. TDK'lar, kitosanı, kitosanın Schiff bazlarına dönüştürerek, ardından merkaptoasetik asit ile muamele edilerek hazırlandı. 100 ppm konsantrasyonda polimer örnekleri (orijinal kitosan ve kimyasal olarak modifiye edilmiş kitosan TDK'ler), disk difüzyon yöntemi kullanılarak inhibisyon zonunun ölçülmesiyle *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *P. aeruginosa* ve *Bacillus subtilis*'e karşı antimikrobiyal özellik açısından test edildi. Kitosanın antibakteriyel aktivitesinin karşılık gelen TDK'de yaklaşık on kat arttığı gözlenmiştir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş kitosanın artmış antibakteriyel aktivitesinin, yeni katılan gruplar ve polimer ile bakteri hücre duvarı arasındaki artan etkileşim ve polielektrolit komplekslerinden kaynaklandığı ileri sürüldü. Bir polimerin difüzyon geçirgenliği de antibakteriyel aktivite için önemli bir parametre olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Kulkarni, Kulkarni, Keshavayya, Hukkeri, & Sung, 2005).

Tang ve ark. (2010), Gram negatif bakteriler *Pseudomonas fluorescens* ve *E. coli* üzerinde, başka bir kitosan türevi arginin kitosanın antibakteriyel aktivitesini araştırdı. Araştırmacılar, iki farklı arginin türevli kitosanın (%6 arginin ile süstitüe edilmiş ve % 30 arginin ile süstitüe edilmiş) hem *P. fluorescens* hem de *E. coli* büyümesini şiddetle inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir. 5000 mg/L konsantrasyonunda sırasıyla % 6 ve % 30 oranında ikame edilmiş arginin türevli kitosan, 2,7 log ve 4,5 log *P. fluorescens* ve 4,8 log ve 4,6 log *E. coli*'yi 4 saatte inhibe etmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (<500 mg / l), % 6'lık ikame edilmiş arginin türevli kitosan, hem *P. fluorescens*'in hücre zarlarını geçirgen hale getirirken daha etkili olduğu ortaya çıkmasına rağmen, hücre büyümesinin engellenmesinde daha etkili olmuştur (Tang et al. 2010).

Hidrojeller hem ilaç hem de gen salınımı için matriks olarak kullanılmaktadır. Hidrojeller, makromolekül ilaçlarını özellikle proteinleri polimerik zincirlerinin içine almakta kullanılmaktadır. Hidrojellerin polimerik ağı, ilaçları hızlı çözünmeden ve matrislerden hızlı salınımdan korur. Hidrojeller oral, oküler, nazal, vajinal ve subkütan yollarla uygulanabilir.

**Çizelge 1.1 : İlaç salınımı için hidrojel uygulamaları.**

<b>Polimer Bazlı Hidrojeller</b>	<b>İlaç Yüklü Sistemler</b>	<b>Uygulama Alanları</b>
<b>Sodyum karboksimetil selüloz ve poli vinil alkol</b>	Diklofenak sodyum	Ağızdan ilaç salınımı
<b>4 kollu PEG-Mal ve 4 kollu PEG-SH</b>	Bevacizumab	Oküler ilaç salınımı
<b>N-trimetil kitosan klorür ve poli(etilen glikol)</b>	-	Burundan ilaç salınımı
<b>Poloksamer</b>	Baicalein flavonoidleri	Vajinal ilaç salınımı
<b>Pluronic ® F127</b>	Rekombinant hirudin varyantı-2 (rHV2)	Deri altından ilaç salınımı
<b>Kitosan ve dekstran</b>	Vankomisin	Yara iyileşmesi için topikal ilaç salınımı

Hidrojeller ayrıca doku onarımında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hidrojellerin bazı örnekleri Çizelge 1.2’ de sunulmuştur.

**Çizelge 1.2 : Doku mühendisliğinde hidrojel uygulamaları.**

<b>Polimer Bazlı Hidrojeller</b>	<b>İlaç / Hücre Yüklü Sistemler</b>	<b>Uygulama Alanları</b>
<b>foto çapraz bağlanabilir metakrilatlanmış glikol kitosan</b>	Yağdan türetilmiş kök hücre	Yumuşak doku mühendisliği
<b>PEG içinde polimerize edilmiş jelatin metakrilamid (Gel-MA)</b>	-	İç hücre kapsülleme ve yüzey hücre yapışması
<b>Oligo (poli(etilen glikol) fumarat)</b>	Büyüme faktörü 1 ve kemik morfojenik protein-2	Osteokondral doku onarımı
<b>Oksitlenmiş alginat ve jelatin</b>	Murin kondrositleri	Kıkırdak rejenerasyonu ve osteoartrit tedavisi
<b>Jelatin ve kitosan</b>	Kardiyomiyosit	Konjenital kalp hastalığı ve kardiyak doku mühendisliği

Hidrojeller ayrıca yapay kıkırdaklar, kontakt lensler, yapay kornealar, biyosensörler ve cerrahi yardımcıları olarak geliştirilmiştir. Sentetik materyaller ayrıca hücre dışı matrise alternatif olarak uygulanır. Çizelge 1.3, klinik uygulamaları için ticari olarak üretilen bazı hidrojelleri göstermektedir.

**Çizelge 1.3 : Mevcut pazarlanan hidrojeller ve uygulamaları.**

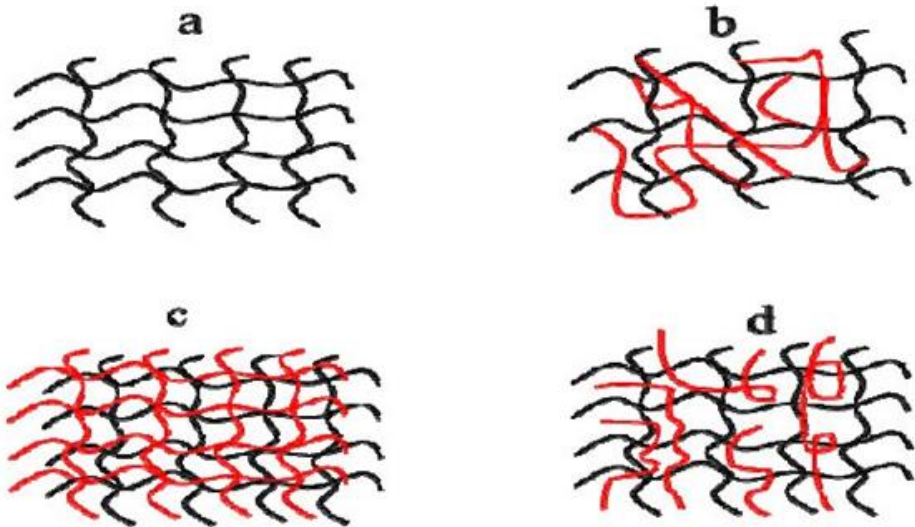
<b>Ürün Adı</b>	<b>Kullanım Alanı</b>
<b>Bioglu® cerrahi yapıştırıcı</b>	Hemostaz sağlamak için dikişler gibi standart kalp ve damar onarım yöntemlerine ek olarak
<b>SurgiSeal®</b>	Topikal cilt yapıştırıcı
<b>Derma seal</b>	Transtibial ampute için kullanılır
<b>Gluetiss®</b>	Kulak Burun Boğazda doku yapıştırıcısı

## 2. KİTOSAN ESASLI HİDROJEL HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Kitosanın zincirleri arasındaki moleküller arası kuvvetler hidrojen bağı, hidrofobik ve iyonik etkileşimlerdir. Bu etkileşimler moleküler ağırlık ve iyonik kuvvetten etkilenir. Kitosan polimerlerinin çapraz bağlanması, ilaç salınımı için stabilite ve dayanıklılık gibi kitosan özelliklerini geliştirmek için gereklidir. Kitosan bazlı hidrojeller kitosan çapraz bağlama yöntemine göre sınıflandırılır.

### 2.1 Kimyasal Çapraz Bağlama Yoluyla Kitosan Hidrojellerinin Hazırlanması

Kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojeller, bağ oluşumunun geri dönüşümsüzdür, kitosan zincirlerinin kovalent bağlanmasıyla oluşturulur. Kimyasal çapraz bağlı hidrojeller, dört oluşum halinde bulunur, a) kitosan çapraz bağlı sistem, b) hibrit polimer ağları (HPN) c) iç içe geçmiş polimer ağları (IPN) ve d) yarı iç içe geçmiş polimer ağları (SIPN). Kitosan hidrojellerinin sınıflandırılması Şekil 2.1'de özetlenmektedir.



Şekil 2.1 : Kovalent çapraz bağlama ile hazırlanan kitosan bazlı hidrojenin yapısı.

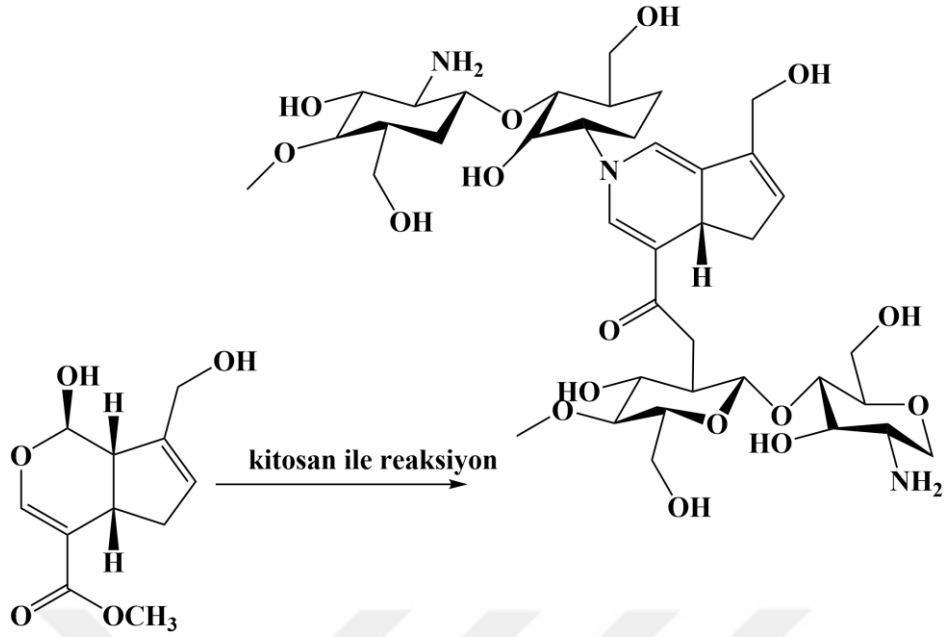
Kitosan bazlı hidrojeller a; sadece kitosan zincir çapraz bağları, b; kitosan, farklı bir polimer ile çapraz bağlanır, c; kitosan ve başka bir polimer karıştırılır ve her polimer tipi çapraz bağlıdır, d; kitosan makromerleri çapraz bağlama yapan başka bir polimer kitosan ile karıştırılır.

Kimyasal hidrojel oluşumunun en basit şekli, kitosan kendi başına başka bir polimerik zincir ile çapraz bağlanma reaksiyonuna girdiğinde ortaya çıkar. Kitosan zincirleri üzerinde bulunan aminler ve hidroksil grupları kimyasal çapraz bağlanmadan sorumludur. Kimyasal çapraz bağlama, çapraz bağlayıcılar veya fotopolimerizasyon reaksiyonu yoluyla meydana gelebilir.

## **2.2 Çapraz Bağlayıcılar ile Çapraz Bağlanma**

Polimerlerin kendileri arasında ya da polimerler ile bir çapraz bağlayıcı arasında çapraz bağlama oluşturulabilir. Çapraz bağlayıcılar kitosan zincirleri arasında çapraz bağlanma reaksiyonunu başlatır. Yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlar; glutaraldehit ve genipin, paladyum katyonu, diizosiyanat ve akrilik asit gibi diğer reaktifler gibi dialdehit bileşiklerini içerir.

Glutaraldehid, kitosanın kimyasal çapraz bağlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Glutaraldehit esas olarak, özelliklerinin değiştirilmesi için kitosana ikinci bir polimer eklendiğinde çapraz bağlama için kullanılır. Kitosanın modifikasyonu için Pluronic F127 kullanılmıştır ve bu hibrid, 5-FU'nun kontrollü verilmesi için glutaraldehit ile çapraz bağlanmıştır. Genipin,  $\beta$ -glukosidaz enzim tarafından geniposit olarak adlandırılan bir glikozitten yapılan, suda çözünebilir ve bifonksiyonel bir çapraz bağlayıcıdır. Genipin, gardenya meyvelerinden izole edilir ve Şekil 2.2' de gösterildiği gibi, amin, protein ve kitosan amino grupları ile reaksiyona girebilir.



**Şekil 2.2 :** Genipin ile kitosan zincirleri arasında çapraz bağlama.

Genipin, doku fiksasyonunda, gıda endüstrilerinde ve ilaç uygulamasında, diğer çapraz bağlayıcılara göre daha düşük toksisitesi ve daha yüksek biyouyumluluğu ile yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kitosanın genipin ile çapraz bağlanması üzerine çok sayıda çalışma vardır. Kıkırdak doku onarımı için genipin ile çapraz bağlı kitosan/jelatin ağları geliştirilmiştir. Genipin-çapraz bağlı kitosan hidrojelleri, glutaraldehyd-çapraz bağlı hidrojelere ve daha yüksek biyo-uyumluluğa kıyasla daha yavaş degradasyon oranına sahiptir, fakat hidrojel içine yüklenen terapötik madde ile uyumsuzluk riski vardır.

### 2.3 Fotopolimerizasyon Yoluyla Çapraz Bağlanma

Kovalent olarak çapraz bağlı kitosan hidrojellerinin oluşturulmasının diğer yöntemi ise fotopolimerizasyondur. Fotopolimerizasyon, görünür ya da UV ışınlarının yardımı ile sıvı çözeltinin jel haline getirilmesi işlemidir. Bu teknik in vivo ve in vitro olarak da kullanılır. Polimerik reaksiyon, maruz kalma mesafesini ve süresini ayarlayarak kontrol edilir. Foto-başlatıcılar olarak adlandırılan moleküller ile reaksiyon halinde UV veya görünür ışık, radikal polimerizasyonu başlatan ve çapraz bağlı hidrojel oluşturan serbest radikaller üretir. Fotopolimerizasyon, genel polimerizasyon yöntemlerine göre belirgin bir üstünlüğe sahiptir ve bu, in vivo in vivo olarak, laparoskopik cihazlarda, subkutanöz enjeksiyon veya farklı ameliyatlarda çeşitli

uygulamalar için kullanılabilen hidrojel oluşumudur. Kitosan için azid ve laktoz yarımaları katılarak, bu polimerin bir foto çapraz bağlanabilir türevi sentezlenmiştir. Bu modifiye kitosan doku yapıştırıcısı (tissue adhesive) olarak kullanılabilir.

## 2.4 Fiziksel Çapraz Bağlanma

Kitosan bazlı hidrojel ağlarını oluşturmak için fiziksel çapraz bağlama, başka bir çapraz bağlama sınıfıdır. Fiziksel etkileşimler, iyonik olarak çapraz bağlanmış kitosan hidrojelleri ve polielektrolit komplekslerinde olduğu gibi iyonik etkileşimler olabilir veya aşılansmış/graft kitosan hidrojelleri ve dolaştırılmış kitosan hidrojelleri olarak adlandırılan ağlar gibi ikincil etkileşimler olabilir.

## 2.5 İyonik Çapraz Bağlı Kitosan Hidrojeller

Kitosan iyonize olabilen amin gruplarına sahip bir katyonik polielektrolit polimeri olduğu için, iyonlar, iyonik olarak çapraz bağlı kitosan hidrojellerini çalıştırmak için genellikle iyonik çapraz bağlayıcılar olarak kullanılır.

Hidrojeller, yüksek su emme kapasitesine sahip gözenekli yapılara sahip oldukları ve doğal hücre dışı matrisine (ECM) yapısal benzerliklerinin doğal sistemlerin taklit edilmesine imkan verdiğiinden, geniş kapsamlı biyomedikal uygulamalar için çekici polimerik malzemelerdir. Viskoelastik özellikler, esneklik, yüksek biyo-uyumluluk ve ayarlanabilir mekanik özellikleri korurken şişme yeteneği, hidrojelleri kullanıma uygun malzemeler haline getirir. Hidrojellerin önemli bir uygulaması, birkaç on yıl boyunca çok dikkat çeken ilaç verme sistemlerinin üretimini içerir.

Kontrollü ilaç salınım sistemlerinin tasarımı, ilaçların kontrollü bir şekilde, istenen bir oranda ve bir zaman diliminde teslim edilmesi veya bırakılması ihtiyacından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, kontrollü ilaç salınım sisteminin temel amacı, ilaçları amaçlanan terapötik etki ile uyumlu hale getirmektir. (Ron E. and L. Bromberg, 1998) (Kost J. and R. Langer, 2001)

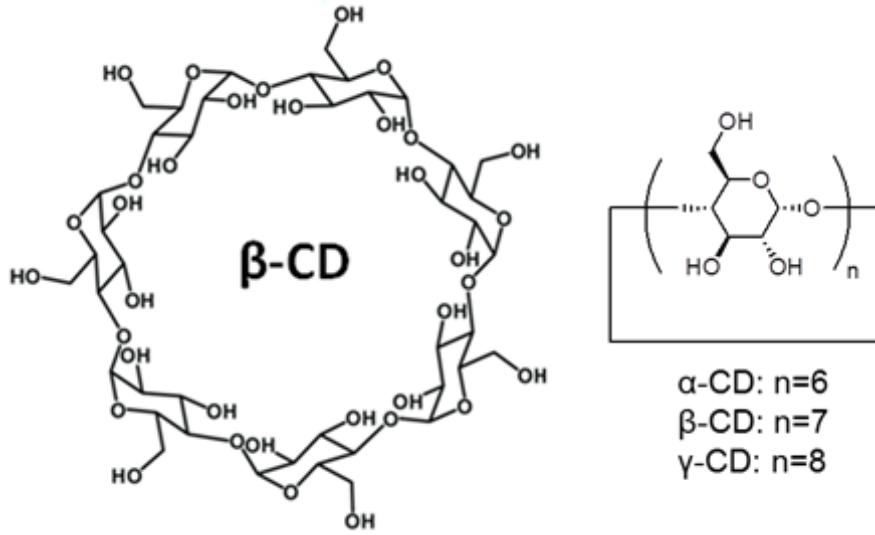
Siklodekstrinler (CD'ler), hidrofilik dış kabuğa ve 1,4-bağlı D-glukopiranoz birimlerinden oluşan siklik oligosakkaritlerden yapılmış hidrofobik bir iç oyuğa sahip olan bir torus şekilli moleküller ailesidir. CD'lerin bu eşsiz yapısı, sulu ortamda inklüzyon kompleksi oluşumuyla hidrofobik moleküllerin iç boşluklarına dahil



edilmesini sağlar. Yaygın olarak kullanılan siklodekstrinler, bir halka yapısındaki altı ila sekiz monomer arasında değişen glukoz tekrarlaması birimleri içerir (Şekil 2.4). 6, 7 veya 8 tekrarlayan üniteye sahip siklik oligosakkaritler, sırasıyla  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ve  $\gamma$ -CD olarak adlandırılır.

Siklodekstrinlerin dış kabuğu hidroksil gruplarının varlığına bağlı olarak çok hidrofiliktir, iç bölge ise oldukça hidrofobiktir. Siklodekstrinlerin iç ve dış kabukları arasındaki hidrofiliklik farkı, sulu ortamlarda hidrofobik moleküller ile inklüzyon kompleksleri oluşturabilecekleri eşsiz bir kabiliyete yol açar. Hidrofobik moleküller ile kompleks oluşumun doğrudan sonucu, bu tür bileşiklerin çözünürlüğünü ve biyoyararlılığını arttırmaktır. CD'ler, doğal olarak hidrofobik ilaç moleküllerinin çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını önemli ölçüde artırma kabiliyetleri nedeniyle farmasötik bilimlerde yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Uekama, K., F. Hirayama, and T. Irie, 1998) (Loftsson, T., P. Jarho, M. Másson, and T. Järvinen, 2005).

CD içeren hidrojel, sulu ortamlarda çeşitli hidrofobik ilaç molekülleri ile inklüzyon kompleksleri oluşturma yeteneklerinden dolayı birçok ilaç verme alanında umut verici adaylar olarak araştırılmıştır. Siklodekstrinlerin hidrofobik moleküller ile etkileşimi dinamik bir dengedir ve çevre koşullarına bağlı olarak inklüzyon kompleksinin oluşumu ve ayrışmasını sağlar (Nishikawa S. and T. Ugawa, 2000). Rakip bir konakçı molekülün varlığında veya sulu ortamın seyreltilmesinde, kaviteye dahil olan molekül serbest bırakılabilir. Bu davranıştan ötürü, siklodekstrinler, salım kinetiklerini modifiye etmek için polimer/hidrojel bazlı sürekli ilaç verme sistemlerinin tasarımında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Özellikle, göz içi gibi uzun süreler boyunca sürekli olarak ilaç konsantrasyonunun muhafaza edilmesinin zor olabileceği bazı hastalıklar için, kontakt lensler gibi çapraz bağlanmış polimerik malzemeler kullanılarak bölgesel uygulama sağlanabilir (Ribeiro, A., F. Veiga, D. Santos, J. J. Torres-Labandeira, A. Concheiro, and C. Alvarez-Lorenzo, 2012).



Şekil 2.3 : Üç ana siklodekstrin tipinin kimyasal yapısı.

### **3. DENEYSEL BÖLÜM**

#### **3.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

Orta molekül ağırlıklı kitosan (%75-85 asetilasyon derecesi),  $\beta$ -siklodekstrin, poli(etilen glikol) monometil eter (ortalama Mn=2000), ftalik anhidrit, hidrazin hidrat, 3-merkaptopropiyonik asit, akriloil klorür, 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) Aldrich Chemical Co.'dan temin edildi. Tüm çözücüler ve inorganik malzemeler Merck Co.'dan satın alındı.

#### **3.2 Kullanılan Cihazlar**

Malzemelerin karakterizasyonu,  $^1\text{H}$  NMR spektroskopisi (Varian 400 MHz) ve zayıflatılmış toplam yansıma Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR ATR) (Nicolet 380) kullanılarak yapıldı. UV çalışmaları Varian Cary 50 Scan UV/vis spektrofotometre ile yapıldı. Hidrojel yüzey morfolojileri, 10 kV hızlanma gerilimi olan ESEM-FEG / EDAX Philips XL-30 (Philips, Eindhoven, Hollanda) cihazı kullanılarak analiz edildi. Dinamik frekans tarama analizleri, 0,05-100 rad/s (25 °C) arasında %0,5 gerilimi olan Anton Paar MCR 302 reometresi kullanılarak yapıldı. 8 mm çapında bir paralel plaka kuruldu ve plaka boşluğu 2.0 mm'ye ayarlandı.

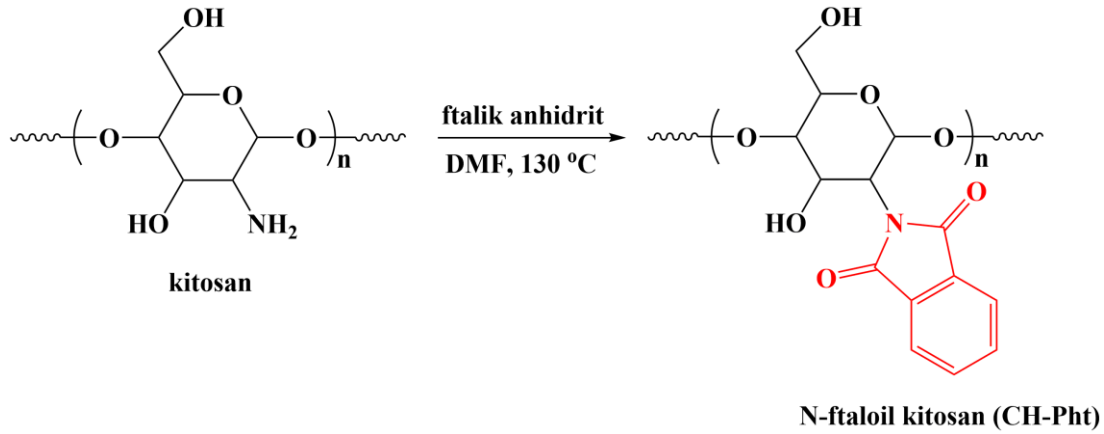
#### **3.3 Sentez Yöntemleri**

##### **3.3.1 Kitosan türevlerinin sentezi**

###### **3.3.1.1 N-ftaloil kitosan (Ch-Pht) sentezi**

Orta molekül ağırlıklı kitosan (5.00 g, 31 mmol glukozamin birimi, %75-85 asetilasyon derecesi) ve ftalik anhidrit (13.8 g, 91 mmol), N, N-dimetilformamid (DMF) (100 mL) içerisinde, azot atmosferi altında 130 °C de 7 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra elde edilen berrak çözelti, 1000 mL etanol

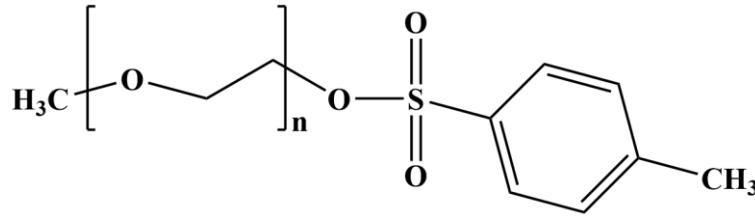
içerisinde oda sıcaklığında soğutulduktan sonra filtre edildi. Oluşan ürün vakumda kurutuldu ve oda sıcaklığında N-ftaloil kitosan elde edildi (Verim: %96).



Şekil 3.1 : N-ftaloil kitosan sentez reaksiyon şeması.

### 3.3.1.2 p-Tolüen sülfonatla aktive edilmiş PEG sentezi (MeO-PEG-OTs)

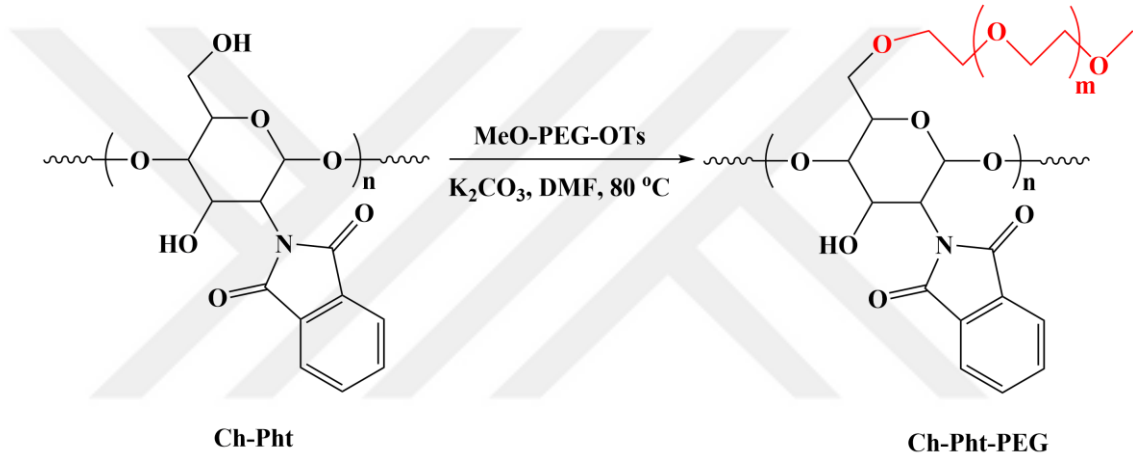
100 mL diklorometan (DCM) içerisine 5 g PEG 2000 monometil eter ve 5 mL trietilamin eklendi ve karışım buz banyosunda 0 °C' ye soğutuldu ve 30 dakika boyunca karıştırıldı. Üzerine p-toluensülfonil klorür (2 g, 0.01 mol, 20 mL DCM içerisinde) damla damla eklenerek reaksiyon bir gece devam ettirildi. Reaksiyon sonrasında doygun sodyum bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) (20 mL) çözeltisi kullanılarak ekstraksiyon yapıldı. Sırasıyla 50 mL kloroform ve 20 mL soydum klorür (NaCl) doygun çözeltisi eklenerek ekstraksiyonlar yapıldı. Ekstraksiyon sonucu elde edilen çözeltilere sodyum sülfat eklenerek kurutma işlemi ardından da süzme işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen çözelti içerisinde bulunan uçucu kimyasallar rotary evaporator kullanılarak uzaklaştırıldı ve tosilenmiş poli(etilen glikol) elde edildi.



Şekil 3.2 : p-Toluensülfonatla aktive edilmiş poli(etilen glikol) tosilat.

### 3.3.1.3 PEG aşılantmış N-ftaloil kitosan (Ch-Pht-PEG) sentezi

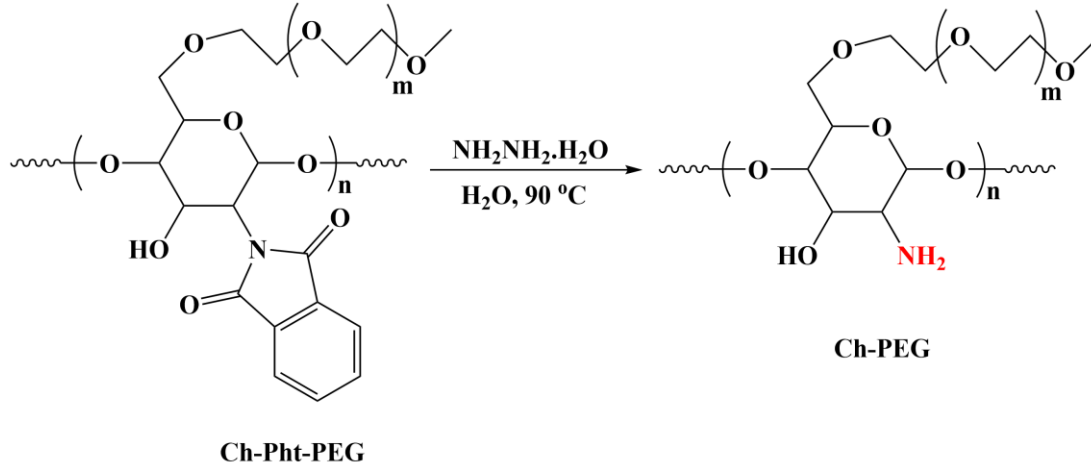
N-ftaloil kitosan (1.0 g, 3.2 mmol tekrarlayan birim), manyetik balık ile birlikte iki boyunlu yuvarlak tabanlı şişeye konuldu ve ultrasonik banyoda dimetilformamit (DMF, 20 mL) içerisinde çözüldü. Bu karışıma, p-toluensülfonatla aktive edilmiş poli(etilen glikol) 10 mL DMF içindeki metil eter (8.2 g, 3.84 mmol) ve  $K_2CO_3$  (0.53 g, 3.84 mmol) eklendi. Reaksiyon karışımı azot atmosferi altında 80 °C'de 24 saat karıştırıldı. Reaksiyondan sonra, elde edilen polimerin saflaştırılması için bir diyaliz membranı (MWCO 10K) kullanılarak suya karşı diyaliz yapılarak gerçekleştirildi. Saflaştırılmış polimer, çözücü buharlaştırılarak ve 50 °C'de gece boyunca kurutularak toplandı. (Verim: %77)



Şekil 3.3 : PEG aşılantmış N-ftaloil kitosan (Ch-Pht-PEG) sentez reaksiyon şeması.

### 3.3.1.4 PEG aşılantmış N-ftaloil kitosanın (Ch-Pht-PEG) hidrazinlenmesi

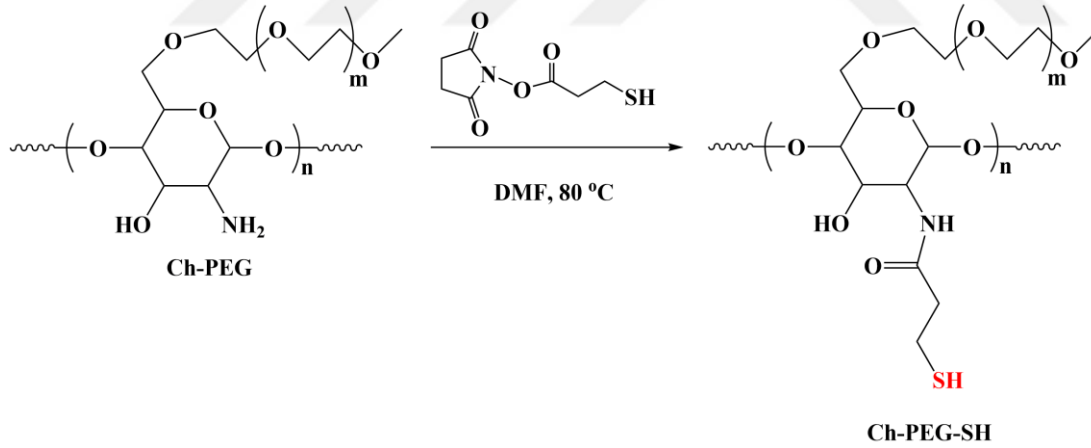
5.4 g PEG aşılantmış N-ftaloil kitosan ve hidrazin hidrat (30 mL), distile su (60 mL) içinde çözüldü. Karışım 90 °C'de 16 saat karıştırıldı. Reaksiyondan sonra, polimerin saflaştırılması için diyaliz membran (MWCO 10K) kullanılarak suya karşı diyaliz işlemi yapılarak gerçekleştirildi. Elde edilen polimer PEG aşılantmış kitosan, çözücü uzaklaştırılarak ve gece boyunca 50 °C'de kurutularak toplandı. (Verim: %86)



**Şekil 3.4 :** PEG aşılansmış N-ftaloil kitosanın (Ch-Pht-PEG) hidrazinlenme şeması.

### 3.3.1.5 Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılansmış kitosan sentezi

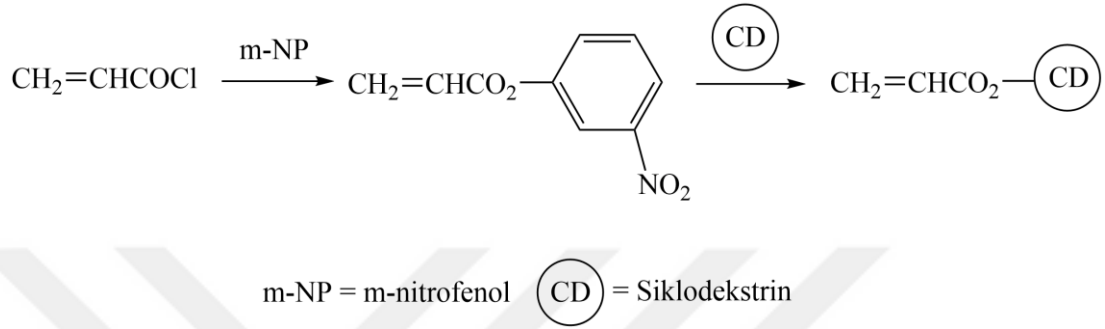
PEG aşılansmış kitosan (10 mL DMF içerisinde 1.0 g) çözeltisine, NHS ile aktive edilmiş 3-merkaptopropiyonik asit çözeltisi (1.0 g, 5.0 mmol) (5 mL DMF içerisinde) ilave edildi. Reaksiyon, azot atmosferi altında 80 °C'de 16 saat karıştırıldı. Reaksiyondan sonra, karışım suya karşı (MWCO 10K) diyaliz edildi, buharlaştırıldı ve 50 °C'de kurutuldu. (Verim: %94)



**Şekil 3.4 :** Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılansmış kitosan (Ch-PEG-SH) sentez reaksiyon şeması.

### 3.3.2 Akriloil ile modifiye edilmiş $\beta$ -siklodekstrin sentezi

Akriloil- $\beta$ -siklodekstrin, Shun-ichi Nozakura ve Makoto Komiyama grubu tarafından Şekil 3.3'de tarif edildiği gibi sentezlendi (A. Harada, M. Furue, S. Nozakura, 1976) (H. Asanumal, T. Akiyama, K. Kajiya, T. Hishiya, M. Komiyama, 2001). Kısaca, su içinde -CD ile m-nitrofenil akrilatın ester-değişim reaksiyonu yoluyla sentezlendi ve akriloil klorür ve m-nitrofenol kullanılarak m-nitrofenil akrilat sentezlendi.



Şekil 3.3 : Akriloil- $\beta$ -siklodekstrin sentez reaksiyon aşaması.

### 3.3.3 Hidrojel sentezi

Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılınmış kitosan (100 mg) şişeye yerleştirildi ve distile su (200  $\mu$ L) içinde çözüldü. Gerekli miktarda  $\beta$ -CD-Ac ve katalitik miktarda trietilamin (0.1 eşdeğer -SH) destile su (200  $\mu$ L) içinde çözüldü ve daha sonra polimer çözeltisine eklendi. Jel çözeltisi homojen jelleşmeye yardımcı olmak amacıyla kısa süreyle ultrasonik işleminden geçirildi. Yaklaşık 10 dakika sonra hiçbir numune akışı gözlenmedi ve mevcut tam çapraz bağlanmayı sağlamak için jelleşme 6 saat devam ettirildi. Daha sonra, reaksiyona girmemiş türler, distile su kullanılarak birkaç kez yıkanarak uzaklaştırıldı. Kurumuş hidrojeller, su içerisinde şişmiş örneklerin dondurarak kurutma işlemiyle elde edildi. (Jel dönüşümleri: %66-87)





## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Kitosan Esaslı $\beta$ -Siklodekstrin İçeren Hidrojellerin Hazırlanması

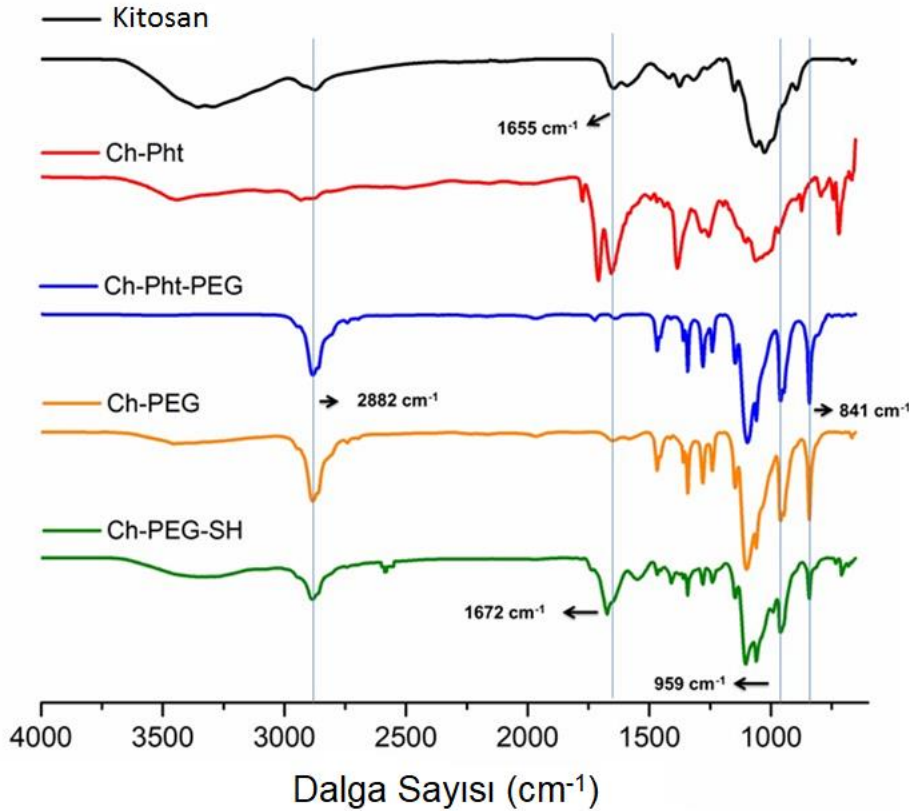
#### 4.1.1 Tiyol modifiye poli(etilen glikol) aşılansmış kitosan (Ch-PEG-SH) türevi sentezi

Tiyol ile modifiye edilmiş kitosan bazlı hidrofilik polimer elde etmek için, bir dizi sentez ve polimerizasyon sonrası modifikasyon adımı gerçekleştirildi (Şekil 4.1). İlk adımda, daha sonra tiyol içeren molekülün konjugasyonunda kullanılan serbest amin gruplarının korunması için doğal kitosan ftalize edildi. Bir sonraki adımda, PEG gruplarının kitosanın hidroksil özellikleri ile birleştirilmesi amacıyla "aşılama" işlemi gerçekleştirildi. PEG aşılama işlemi, biyolojik uyumluluğun yanı sıra suda çözünürlüğünü arttırmak için kitosan türevlerinin modifikasyonunda yaygın olarak kullanılan bir uygulamadır (Casettari L, Vllasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L, 2012). Bununla birlikte, kitosan modifikasyonunun ortak yaklaşımları amino gruplarının kimyasal katılımına uygun hale getirilmesine dayanır (Casettari L, Vllasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L, 2012). Çalışmamızda, amino gruplarının daha sonra kullanılabilmesi için hidroksil grupları üzerine PEG aşılama işlemi gerçekleştirildi. Hidrofilik yan zincirlere aktif monometoksi PEG polimerinin nükleofilik süstitüsyon esaslı bir aşılansması, kitosan omurgasına eklenmesine neden olmuştur. PEG aşılansmasının ardından, korunmuş ftaloil grupları, amino gruplarını reaktif formlarında tekrardan açığa çıkarılması için hidrazinoliz işlemi gerçekleştirildi. Son adımda, PEG aşılansmış kitosanın yan zincirlerinde bulunan amino gruplarının tiyol-en ile reaktif hale getirilmiş merkaptto gruplarının yerleştirilmesini gerçekleştirmek için NHS ile aktive edilmiş 3-merkaptopropiyonik asit ile konjüge edildi.

## 4.1.2 Tiyol modifiye poli(etilen glikol) aşılansmış kitosan (Ch-PEG-SH) türevlerinin karakterizasyonu

### 4.1.2.1 FT-IR ve <sup>1</sup>H NMR analizi

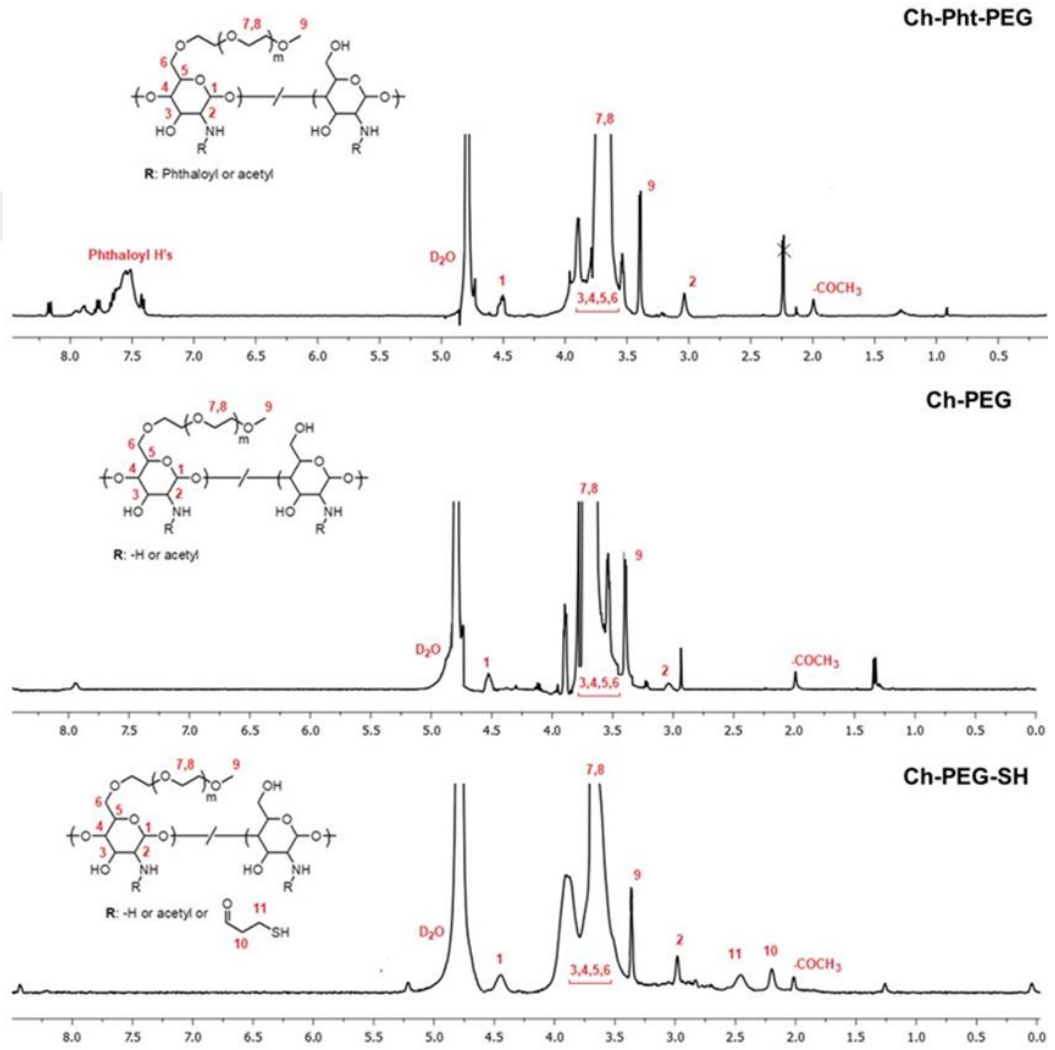
N-ftaloil kitosan (Ch-Pht) üzerine PEG aşılansması, FT-IR çalışmaları ( $v_{\max} / \text{cm}^{-1}$ ) 2882 (C-H germe), 1069 ve 959 (C-O) yapılarak başarılı bir çalışma gerçekleştirildiği doğrulanmıştır (Şekil 4.1). Elde edilen ftalil ve PEG aşılansmış kitosan (Ch-Pht-PEG)'in <sup>1</sup>H NMR analizi, kitosan piranoz grupları ve ftaloil kısımlarının proton sinyallerinin yanı sıra PEG yinelenen birimlerin ve metoksi (-OCH<sub>3</sub>) uç gruplarının sinyallerini de ortaya koymuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 : PEG aşılansmış, hidrazinliz ve tiyol modifikasyon adımlarından sonra polimerlerin FT-IR yapısal analizleri.

Ftaloil gruplarının hidrazinlenme işlemiyle ortaya çıkarılmasından sonra, FT-IR analizi, imid absorpsiyon bantlarının ( $v_{\max} / \text{cm}^{-1}$ ) 1771 ve 1707'de kaybolduğunu ortaya koymuştur. Bu dönüşüm aynı zamanda ftaloil aromatik sinyallerin 7.3-8.0

ppm'de ortadan kalkması ile de doğrulanmıştır. Son adımda, NHS grupları ile önceden aktive edilmiş Ch-PEG-SH verecek şekilde, serbest amino gruplarının kitosan polimerinin 3-merkaptopropiyonik asit ile reaksiyonunu içerir. 1672  $\text{cm}^{-1}$  FT-IR spektrumunda yeni bir amid bandının oluşumu ve alifatik proton sinyalleri,  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda merkaptopropionamit birimlerinin sinyalleri ile başarılı bir şekilde birleştiğini göstermiştir.



**Şekil 4.2 :** PEG aşılınmış, hidrazinoliz ve tiyol modifikasyon adımlarından sonra polimerlerin  $^1\text{H}$  NMR yapısal analizleri.

#### 4.1.2.2 PEG aşılama derecesinin belirlenmesi

PEG aşılama derecesi, Şekil 4.3' de yer alan 4.5 ppm'de D-glikopiranoz sinyalinin, 3.4 ppm'de PEG metoksi sinyalinin entegrasyonu ile belirlenmiştir (%43 (mol PEG / mol D-glukosamin)).

#### 4.1.2.3 Sülfhidril içeriğinin belirlenmesi

Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılama kitosanın toplam sülfhidril içeriği, Ellman'ın metodu kullanılarak belirlendi (Ellman GL, 1959). Kısaca, 4,0 mg 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit), 1 mL reaksiyon tamponu (0,1 M sodyum fosfat, 1 mM EDTA (pH 8,0)) içerisinde çözüldü ve bu çözeltinin üzerine, 1 mL reaksiyon tamponu içindeki 5,0 mg tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılama kitosan ilave edildi. Elde edilen karışım 37 °C'de 2 saat süreyle inkübe edildi. Numunedeki toplam sülfhidril grubu içeriği, 412 nm'de maksimum absorbansın ölçülmesi ve 2-nitro-5-tiyobenzoat (TNB<sup>2-</sup>) iyonunun molar sönme katsayısı (14,150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) kullanılarak elde edildi (Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B, 1983)

#### 4.1.2.4 Şişme oranı dengesi (ESRs)

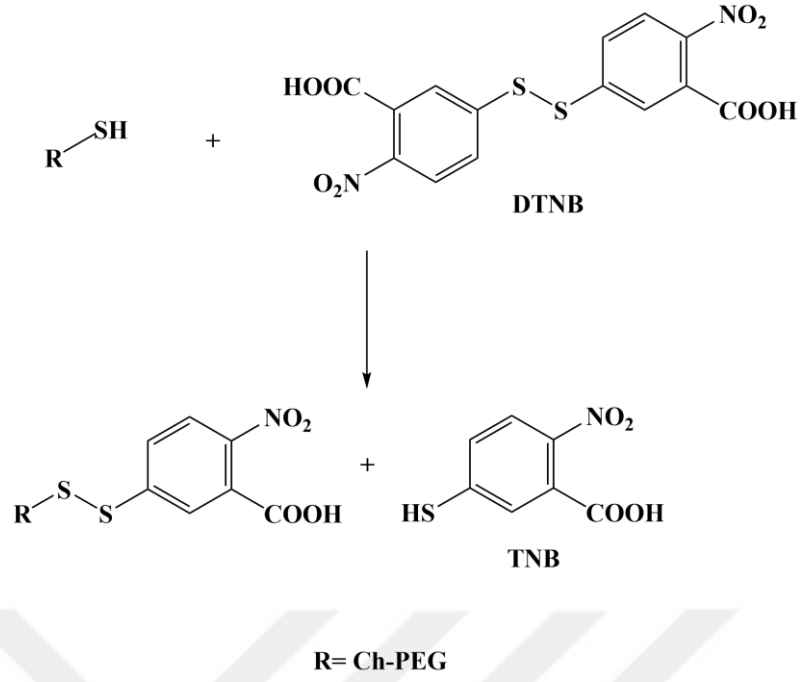
Şişme oranı dengesi (ESRs)'ler distile su içerisine 20 mg hidrojel numunesi alınarak, şişmiş hidrojellerin sabit ağırlık gösterene kadar zamana bağlı olarak numune kütleindeki artışı takip ederek belirlendi. Şişme yüzdesi, aşağıdaki denklem kullanılarak belirlendi (4.1)

$$ESR (\%) = \left( \frac{W_{ıstak} - W_{kuru}}{W_{kuru}} \right) * 100 \quad (4.1)$$

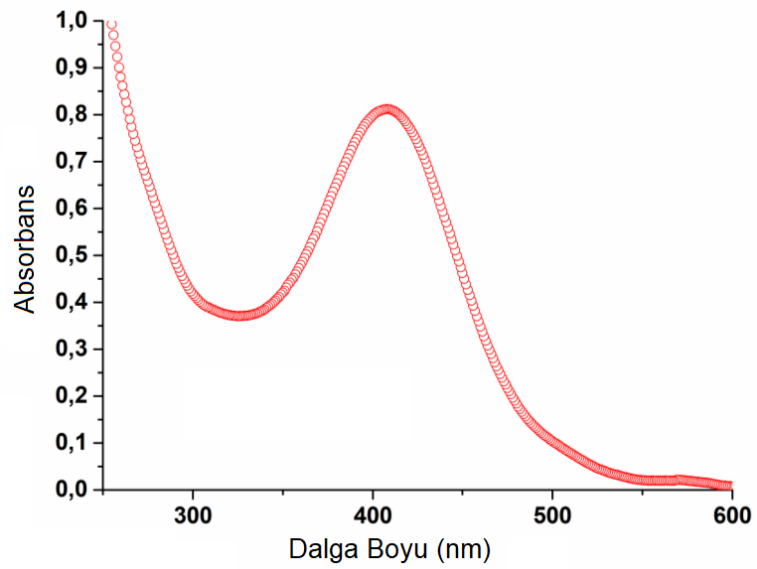
Şişme çalışmaları üç kez tekrarlandı ve şişme eğrilerini elde etmek için ortalama veriler kullanıldı.

#### 4.1.2.5 Polimer Ch-PEG-SH' nin tiyol içeriğinin belirlenmesi

Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılama kitosanın toplam tiyol içeriği, Ellman'ın metodu 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) kullanılarak belirlendi (Ellman GL, 1959).



**Şekil 4.3 :** Ch-PEG-SH polimerinin Ellman reaktifi ile tepkimesinin gösterilmesi.

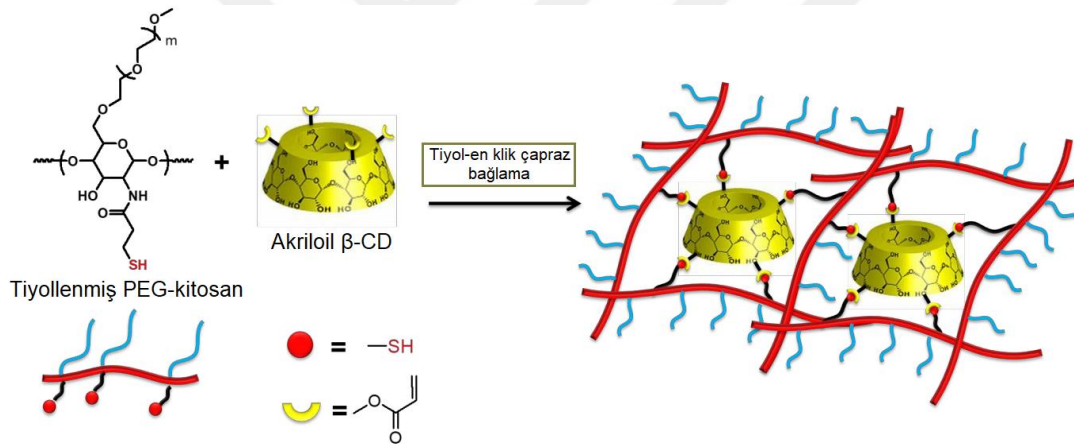


**Şekil 4.4 :** Ellman analizi sonucu oluşan TNB iyonunun UV spektrumu.

Ellman analizi sonucu Ch-PEG-SH polimerindeki tiyol miktarı  $8.4 \times 10^{-4}$  mmol/g polimer olarak hesaplanmıştır.

### 4.1.3 Kitosan esaslı $\beta$ -siklodekstrin içeren hidrojenlerin tiyol-en klik kimyası ile sentezi

Hidrojenler, tiyol-en reaksiyonu kullanılarak PEG aşılınmış kitosan polimerinin (Ch-PEG-SH) akriloil ile modifiye edilmiş  $\beta$ -siklodekstrin çapraz bağlayıcı ( $\beta$ -CD-Ac) ile reaksiyona girmesiyle hazırlandı (Şekil 4.5). Akriloil gruplarına birden fazla tiol eklenmesiyle, yaklaşık on dakikada hızlı çapraz bağlanma ağı oluşumu gözlenmiş ve hiçbir numune akışı gözlenmemiştir. Çapraz bağlama işlemi tamamlamak için, jelleşme 6 saat boyunca devam ettirilmiştir. Jel oluşumu, katalitik miktarda nükleofilik olmayan organik bazlı trimetilamin ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) kullanılarak desteklendi. Çeşitli miktarlarda Ch-PEG-SH/-CD-Ac CD eklenerek elde edilen jellerin çapraz bağ oranının fiziksel ve morfolojik özelliklerine etkisini karşılaştırmak için, hidrojel kütüphanesi hazırlanmıştır (Çizelge 4.1, hidrojenler CCH- (1-4)). Elde edilen hidrojenlerin özellikleri Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.



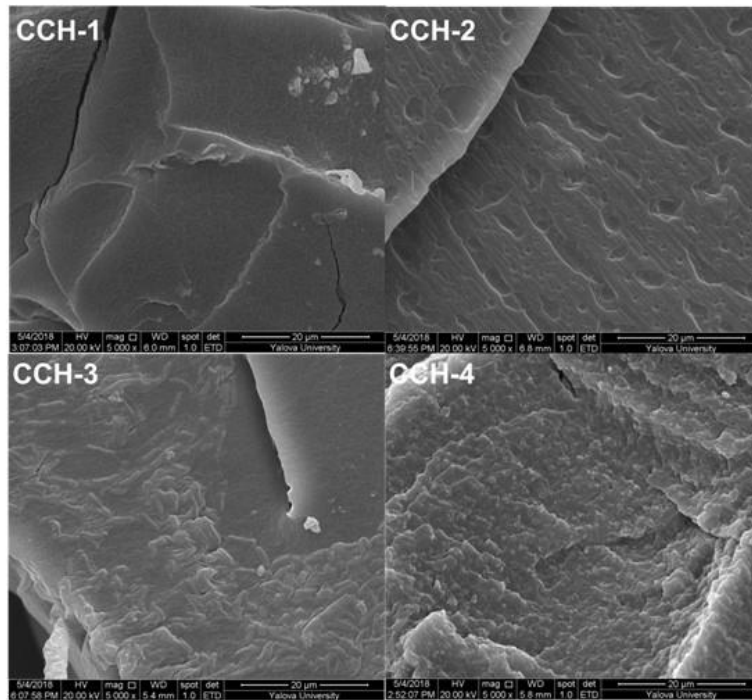
**Şekil 4.5 :** Tiyol ile modifiye edilmiş PEG aşılınmış kitosanın ve akriloil ile modifiye edilmiş  $\beta$ -CD'nin tiyol-ene click reaksiyonu ile hidrojel oluşumunun genel temsili.

**Çizelge 4.1 :** Değişken Ch-PEG-SH/ $\beta$ -CD-Ac oranına sahip hidrojellerin özellikleri.

Numune Numarası	Hidrojel	-SH: Akrilat	Jel Dönüşümü (%)	ESR ( $\times 100\%$ )
1	CCH-1	0.5: 0,5	87	9.2
2	CCH-2	0.6: 0,4	76	13.3
3	CCH-3	0.7: 0,3	71	15.6
4	CCH-4	0.8: 0,2	66	19.5

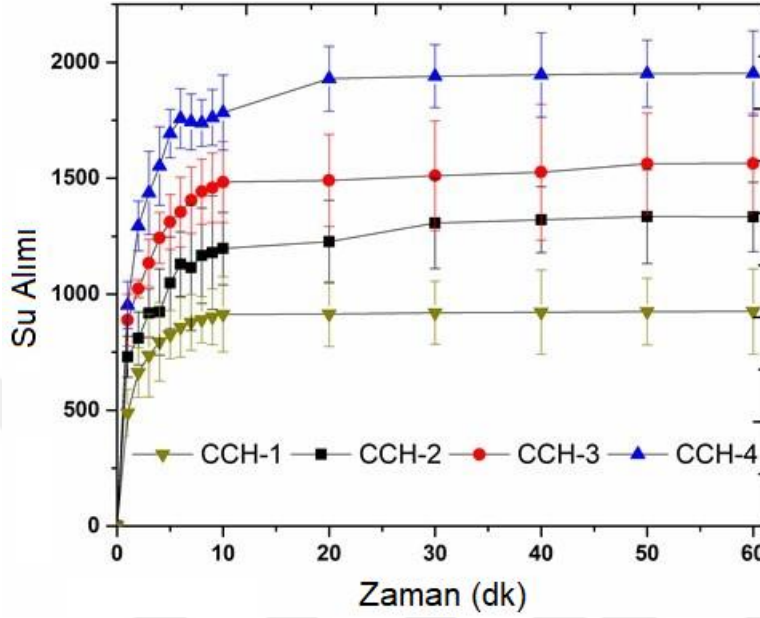
#### 4.1.3.1 Kitosan esaslı $\beta$ -siklodekstrin içeren hidrojelere karakterizasyonu

Tiyol-en ekleme reaksiyonları ile elde edilen hidrojelerde iyi derecede jel dönüşümleri elde edildi. Beklendiği gibi, daha yüksek miktarda  $\beta$ -CD-Ac çapraz bağlayıcı kullanılması durumunda daha yüksek jel dönüşümleri elde edildi. Jeller ıslak durum görünümünde saydam şeffaf numunelerdir. Taramalı elektron mikroskopisine (SEM) dayanan mikroyapı analizleri, düşük gözenekliliğe sahip sürekli jel yapılarının ortaya çıktığını göstermiştir (Şekil 4.6). Düşük miktarda çapraz bağlama ajanlarının kullanılması durumunda gözeneklilikte çok hafif bir artış olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.6 :** Dondurarak kurutulmuş hidrojelere temsili SEM görüntüleri (Ölçek çubuğu: 20  $\mu$ m).

Hidrojeller, sabit bir ağırlığa ulaşılan kadar önceden belirlenmiş zaman aralıklarında su alımı kaydedilerek şişme davranışları açısından incelenmiştir. Tüm hidrojeller, polimer omurgalarında hidrofilik yan zincirlerin varlığından dolayı iyi bir şişme kapasitesi ve hızlı kinetik özellikler göstermiştir (Şekil 4.7).



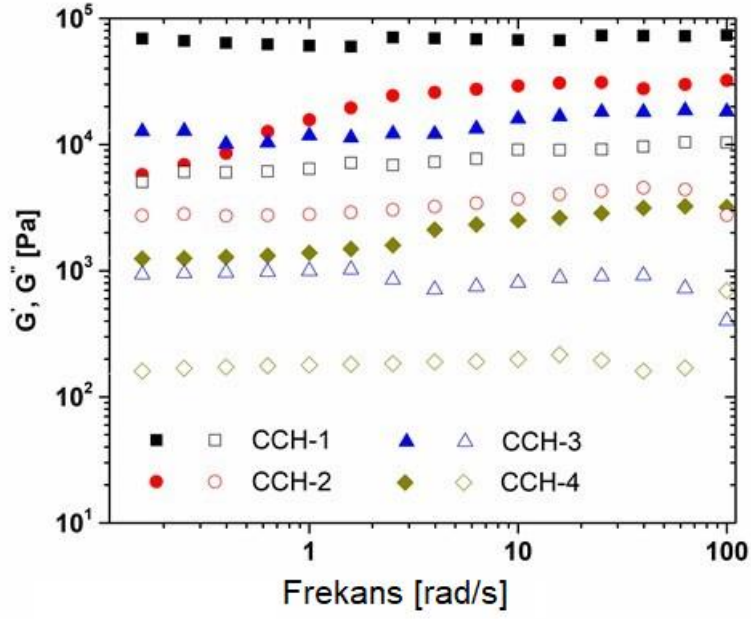
Şekil 4.7 : Sudaki hidrojellerin şişme denge profilleri.

Beklendiği gibi, hidrojellerin şişme özellikleri hidrofilik polimerin beslenmesine ve çapraz bağlayıcı oranlarına bağlı olarak değişiklikler gösterdiği gözlenmiştir.

Ağın serbest jel hacimlerindeki artışa atfedilebilir çapraz bağlayıcı oranının azaltılmasıyla nispeten daha yüksek şişme dereceleri elde edildi.

Suda şişen hidrojellerin visko-elastik jel özellikleri, dinamik frekans tarama analizi ile incelenmiştir. Yapılan ölçümlerde, ağların depolama ve kayıp modüllerinin homojen ağ oluşumunu gösteren nispeten düşük salınım frekans bağımlılığı gösterdiğini ortaya koydu (Şekil 4.8) (Siemoneit U, Schmitt C, 2006).





Şekil 4.8 : Hidrojellerin dinamik frekans tarama analizi ( $G'$ , katı semboller ve  $G''$ , açık semboller).

Depolama modülü ( $G'$ ) ve kayıp modülü ( $G''$ ) değerleri  $10^2$  ila  $10^5$  Pa arasında değişmiştir ve test edilen tüm numuneler için, depolama modülünün elastik katı malzemeler için karakteristik bir özellik olan kayıp modülünden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Daha yüksek miktarda  $\beta$ -CD bazlı çapraz bağlayıcı kullanılarak hazırlanan hidrojeller için daha yüksek modül değerleri elde edildi.



## 5. SONUÇ

Kitosan çok yönlü bir polimerdir ve seyreltik asitlerde çözünmektedir. Kitosanın biyomedikal uygulamalarda kullanılması için çözünürlüğünün geliştirilmesi gereklidir. Bu nedenle bu tez çalışmasında kitosanın çözünürlüğünü arttırmak için kitosan PEG ile modifiye edildi. Siklodekstrin ise ilaç salınım uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Siklodekstrin akriloillenerek PEG lenmiş kitosan ile çapraz bağlanması sağlandı. Bu tez çalışmasında sentelenen kitosan esaslı hidrojellerin enjekte edilebilir ilaç salınım sistemlerinde kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.



## KAYNAKLAR

- Alsarra, I. A. (2009).** Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.03.010>
- A. Harada, M. Furue, S. Nozakura,** *Macromolecules* 9 (1976) 701.  
H. Asanumal, T. Akiyama, K. Kajiya, T. Hishiya, M. Komiyama, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 25
- Chen, Y., Zhang, Y., Wang, F., Meng, W., Yang, X., Li, P., ... Zheng, Y. (2016).** Preparation of porous carboxymethyl chitosan grafted poly (acrylic acid) superabsorbent by solvent precipitation and its application as a hemostatic wound dressing. *Materials Science and Engineering C*, 63, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.048>
- Casettari L, Vllasaliu D, Castagnino E, Stolnik S, Howdle S, Illum L.** PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Progress in Polymer Science*. 2012; 37(5): 659-85.
- Díez-Pascual, A. M., & Díez-Vicente, A. L. (2015).** Wound healing bionanocomposites based on castor oil polymeric films reinforced with chitosan-modified ZnO nanoparticles. *Biomacromolecules*, 16(9), 2631–2644. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00447>
- Dragostin, O. M., Samal, S. K., Dash, M., Lupascu, F., Pânzariu, A., Tuchilus, C., ... Profire, L. (2016).** New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 141, 28–40. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.078>
- Ellman GL.** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959; 82(1): 70-77.
- F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. Mohammadi Samani, and Z. Amoozgar,** Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications *Res Pharm Sci*. 2015 Jan-Feb; 10(1): 1–16.
- Jin, Y., Ling, P. X., He, Y. L., & Zhang, T. M. (2007).** Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. *Burns*, 33(8), 1027–1031. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2006.12.002>
- Kulkarni, A. R., Kulkarni, V. H., Keshavayya, J., Hukkeri, V. I., & Sung, H. W. (2005).** Anti-microbial activity and film characterization of

thiazolidinone derivatives of chitosan. *Macromolecular Bioscience*, 5(6), 490–493. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400207>

**Kost J. and R. Langer**, “Responsive Polymeric Delivery Systems”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 46, No. 1–3, pp. 125–148, 2001.

**Loftsson, T., P. Jarho, M. Másson, and T. Järvinen**, “Cyclodextrins in Drug Delivery”, *Expert Opinion in Drug Delivery*, Vol. 2, No. 2, pp. 335–351, 2005.

**Nishikawa S. and T. Ugawa**, “Dynamic Interaction Between Cyclodextrin and Nonelectrolytes in Aqueous Solutions by Ultrasonic Relaxation Method”, *Journal of Physical Chemistry A*, Vol. 104, No. 13, pp. 2914–2918, 2000.

**No, H. K., Young Park, N., Ho Lee, S., & Meyers, S. P. (2002)**. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1–2), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00717-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00717-6)

**Ron E. and L. Bromberg**, “Temperature-responsive Gels and Thermogelling Polymer Matrices for Protein and Peptide Delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 31, No. 3, pp. 197–221, 1998.

**Ribeiro, A., F. Veiga, D. Santos, J. J. Torres-Labandeira, A. Concheiro, and C. Alvarez-Lorenzo**, “Hydrophilic Acrylic Hydrogels with Built-in or Pendant Cyclodextrins for Delivery of Anti-glaucoma Drugs”, *Carbohydrate Polymers*, Vol. 88, No. 3, pp. 977–985, 2012.

**Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B.** Reassessment of Ellman’s reagent. *Methods in Enzymology*. 1983; 91: 49-60.

**Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., & Hipler, U. C. (2008)**. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1–2), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.029>

**Szente L. and J. Szemán**, “Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host-guest Type Molecular Recognition”, *Analytical Chemistry*, Vol. 85, No. 17, pp. 8024–8030, 2013.

**Siemoneit U, Schmitt C, Alvarez-Lorenzo C, Luzardo A, Otero-Espinar F, Concheiro A, Blanco-Méndez J.** Acrylic/cyclodextrin hydrogels with enhanced drug loading and sustained release capability. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 312(1-2): 66-74.

**Taylor, P., Wani, M. Y., Hasan, N., Malik, M. A., Wani, M. Y., Hasan, N., & Malik, M. A. (n.d.)**. Chitosan and Aloe Vera : Two Gifts of Nature

Chitosan and Aloe Vera : Two Gifts of Nature, (July 2014), 37–41.  
<https://doi.org/10.1080/01932690903333606>

**Tang, H., Zhang, P., Kieft, T. L., Ryan, S. J., Baker, S. M., Wiesmann, W. P., & Rogelj, S. (2010).** Antibacterial action of a novel functionalized chitosan-arginine against Gram-negative bacteria. *Acta Biomaterialia*, 6(7), 2562–2571. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.002>

**Uekama, K., F. Hirayama, and T. Irie,** “Cyclodextrin Drug Carrier Systems”, *Chemical Reviews*, Vol. 98, No. 5, pp. 2045–2076, 1998.







## ÖZGEÇMİŞ



**Ad Soyad:** Tolga Yirmibeşoğlu

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Samsun, 1990

**Adres:** Atatürk Mah. Güner Sok. No:1 Metropark Sitesi B2 Blok Daire No:31  
Küçükçekmece/İSTANBUL

**E-Posta:** [tolgayirmibesoglu@gmail.com](mailto:tolgayirmibesoglu@gmail.com)

**Lisans:** Polimer Mühendisliği, Yalova Üniversitesi, 2014

### TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- Arslan M, Yirmibesoglu T, Celebi M. In situ Crosslinkable Thiol-ene Hydrogels Based on PEGylated Chitosan and  $\beta$ -Cyclodextrin. JOTCSA. 2018;5(3):1327–36. <https://doi.org/10.18596/jotcsa.460275>
- Mehmet Arslan, Tolga Yirmibeşoğlu, Mithat Çelebi, In situ Crosslinkable Thiol-ene Hydrogels Based on PEGylated Chitosan and  $\beta$ -Cyclodextrin, International Eurasian Conference on Science, Engineering and technology, 22-23 November 2018, Ankara, Turkey, Sözlü