

**KONDROİTİN SÜLFAT İÇEREN
HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI VE
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Aygün ALIYEVA

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Aysun KARABULUT**

Yüksek Lisans Tezi-2018

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONDROİTİN SÜLFAT İÇEREN HİDROJELLERİN HAZIRLANMASI VE
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

AYGÜN ALIYEVA

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı Prof. Dr. Aysun Bay KARABULUT

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından 2016
/152 Proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA

2018

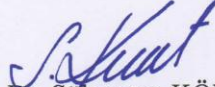
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Aygün ALIYEVA'nın "Kondroitin Sülfat İçeren Hidrojellerin Hazırlanması ve Biyokimyasal Özelliklerin İncelenmesi "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/07/2018



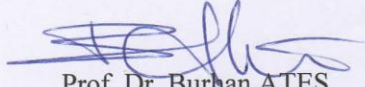
Prof. Dr. Turgay SEÇKİN
İnönü Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE
İnönü Üniversitesi
Üye



Dr. Öğr. Üyesi A. Şebnem ERENLER
İnönü Üniversitesi
II. Tez Danışmanı
Üye



Prof. Dr. Burhan ATEŞ
İnönü Üniversitesi
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Kouroush SALİMİ
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2018 tarih ve 2018/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kondroitin Sülfat	4
2.1.1. Kondroitin sülfatın yapısal özelliği	5
2.2. Hidrojeller.....	8
2.2.1. Hidrojellerin sınıflandırılması.....	10
2.2.3. Hazırlanma Yöntemlerine Göre Hidrojeller.....	12
2.2.4. Hidrojellerde Şişme Potansiyelinin Karakterizasyonu	15
2.2.5. Hidrojellerde Karboksimetil Selüloz Kullanımı.....	17
2.2.6. Hidrojellerin Kullanım Alanları	18
2.2.7. Polimerik Hidrojel İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması.....	21
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri.....	25
3.2. Hidrojel Karakterizasyonunda Kullanılan Cihaz ve Aletler	26
3.2.1. FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) Spektrofotometre	26
3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM-scanning electron microscope) ..	26
3.2.3. (UV - VİS) Spektrofotometre	27
3.2.4. Kullanılan diğer cihaz ve aletler	27
3.3. Deneysel Çalışmalar	28
3.3.1. Poliakrilamid (PAM) bazlı hidrojellerin sentezi	28
3.3.2. Farklı oranlarda Aak katkılı PAM hidrojellerinin sentezi.....	28
3.3.3. Farklı oranlarda çapraz bağlayıcı katkılı hidrojel sentezi	29
3.3.4. Farklı konsantrasyonlarda (KMS) katkılı hidrojellerin sentezi	29
3.3.5. Kondroitin sülfat katkılı hidrojellerin sentezi	29
3.3.6. Kondroitin sülfat ve karboksimetil selüloz katkılı hidrojellerin sentezi	30
3.3.7. Farklı oranlarda kondroitin sülfat katkılı hidrojellerin hazırlanması...	30
3.3.8. Hidrojellerde şişme testlerinin uygulanması.....	30

3.3.9. Hidrojellerde Biyouyumluluk Deneyleri	31
3.3.10. İlaç salım deneyleri.....	32
4. BULGULAR	34
4.1. PAM KS HidrojellerininYapısal Karakterizasyonu.....	34
4.2. Farklı KS Oranlarında Hazırlanmış PAM KS Hidrojellerinin Yapısal Karakterizasyonu	35
4.3. Farklı Oranda Akrilamid İçeren Hidrojellerin Yapısal Karakterizasyonu .	36
4.4. Farklı Oranlarda Ç.B Katkılı Hidrojellerin Yapısal Karakterizasyonu	38
4.5. Farklı Oranlarda Sentezlenen PAM KMS HidrojellerininYapısal Karakterizasyonu	40
4.6. SEM Karakterizasyonları	41
4.7. Hidrojellerin Şişme Test Sonuçları.....	45
4.8. Biyouyumluluk Testleri	49
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR.....	58

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenim süresince bilgi ve deneyimleriyle çalışmalarım sırasında ilgi ve anlayış göstererek desteğini esirgmeden her türlü yardımı sağlayan, bilimsel vizyon kazanmamdaki önemli rol oynayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aysun BAY KARABULUT'a

Yüksek lisans eğitim aşamasında ve Malatya daki ikamet sürecimde en büyük destekçim, olan ve aile şevkatini bir an bile esirgemeyen, maddi ve manevi desteği ile her an yanımda olan, engin bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, yoluma ışık tutan, İkinci Tez Danışmanım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Şebnem ERENLER' e

Tez konumun baş mimarı olan ve engin bilgileriyle ufkuma yenilik katan, çok değerli hocam İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Fizikokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Turgay SEÇKİN'e

Tezimin deneysel aşamasında yardımlarının esirgemeyen İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Fizikokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye ve Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e

Çalışmalarım boyunca ve her türlü yardımlarını esirgemeyen Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi değerli hocam Prof. Dr. Elif APOHAN'a

Çalışmalarım esnasında ve buradaki iki yıllık ikamet sürecimde bana bir abla olan, her türlü deneyimlerini benle paylaşan, akıl danışmanım ve çok sevdiğim değerlim Doktora Öğrencisi Esra Nezafed ÜLKE'ye

Her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım, İmren ÖZCAN, Büşra AKSOY, Sevgi BALCIOĞLU, Eray TATLICI ve Samet UÇAR arkadaşlarıma,

2016/152 no'lu proje ile bu araştırmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne:

Son olarak minnettarlığımı kelimelerle anlatamayacağım, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve hayatımın her anında yanımda olan sevgili ANNEM Sevinc'e, BABAM İlyas'a, KARDEŞLERİM Günay ve Murad'a

Sonsuz teşekkürlerimi bildiririm.

ÖZET

Kondroitin Sülfat İçeren Hidrojellerin Hazırlanması ve Biyokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Amaç: Çalışmamızda, doğal bir polimer olan karboksimetil selüloz kullanılarak Kondroitin Sülfat içeren hidrojellerin sentezi hedeflenmiştir. Hidrojeller suda şişebilen üç boyutlu ağ yapısına sahip polimerler olarak tanımlanmaktadır. Buna istinaden birçok doğal polimerler ve polisakkaritler kullanılmıştır. Kondroitin Sülfat *N*-asetil-e bağlı D-glukuronik asit, D-galaktozamid'ten oluşan bir glikozaminoglikandır. Karboksimetil selüloz ise doğal polimer grubuna dahildir ve son yıllardaki birçok alanda geniş olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızın temel hedefi, özgün değerlere sahip biyoyumlu, yüksek şişme kabiliyetine sahip hidrojeller tasarlamaktır.

Materyal ve Metot: Hidrojeller serbest radikalik polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Hidrojellerin yapısal karakterizasyonu, Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FT-IR/ATR) kullanılarak yapılmıştır. Hidrojellerin yüzey gözenekliliği SEM mikrografları ile belirlenmiştir. Hidrojellerin şişme kapasitesini gözlemlenmesi için şişme testleri 37°C'de fosfat tamponunda yapılmıştır. Elde edilen verilerin zamana karşı ağırlık grafikleri çizilmiştir. İlaç salım deneylerinde ise model ilaç olarak KS kullanılmıştır. İlaç salım deneyleri UV-VIS Spektrofotometresi ile 210 nm'de gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Kondroitin sülfat katkılı karboksimetil selüloz bazlı hidrojellerin, akrilamid bazlı hidrojellerle karşılaştırılması yapılmıştır. Kondroitin sülfat katkılı karboksimetil selüloz bazlı hidrojellerin biyoyumlu ve daha yüksek şişme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Tasarlanan hidrojellerin, literatüre göre özgün, sonraki çalışmalar için yol gösterici ve biyomedikal ürünlerde kullanılabilirlik potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akrilamid, karboksimetil selüloz, kondroitin sülfat, hidrojel.

ABSTRACT

Biochemical Properties Investigation and Preparation of Hydrogels Containing Chondroitin Sulphate

Purpose: In our work, the synthesis of Chondroitin Sulfate containing hydrogels using a natural polymer such as carboxymethyl cellulose is aimed. Hydrogels are defined as polymers that have a water-swellaable three-dimensional network structure. For this reason many natural polymers and polysaccharides have been used. Chondroitin Sulfate N-acetyl-linked D-glucuronic acid is a glycosaminoglycan composed of D-galactosamid. Carboxymethyl cellulose belongs to the natural polymer group and is widely used in many areas in recent years. The main aim of the work is to design biocompatible hydrogels with unique values and high swelling capability.

Material and Method: Hydrogels were synthesized by free radical polymerization. Structural characterization of the hydrogels was performed using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR / ATR). The surface porosity of the hydrogels is taken up by SEM micrographs. Swelling tests were performed in phosphate buffer at 25°C to observe the swelling capacity of the hydrogels. Time-against-weight graphs are plotted with the obtained data. Drug release experiments were done with KS as a model drug. Drug release assays were performed at 210 nm with UV-VIS Spectrophotometer.

Results: Chondroitin sulfate addition Carboxymethyl cellulose based hydrogels were compared with acrylamide based hydrogels: Chondroitin sulphate-added Carboxymethyl Cellulose-based hydrogels have been observed to have a biocompatible, higher swelling capacity.

Conclusion: It is thought that the designed hydrogels are unique according to the literature, provide guidance for future studies and have potential for usability in biomedical products.

Keywords: Acrylamide, carboxymethyl cellulose, chondroitin sulfate, hydrogel.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aac	: Akrilik Asit
Aak	: Akrilamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
KS	:Kondroitin Sülfat
GalNAc	: N - asetilgalaktozamin
GlcA	: Glukuronik asit
KSA	: Kondroitin 4 sülfat
KSC	: Kondroitin 6 sülfat
IPN	: İç içe geçmiş ağ yapısı
UV	: Ultraviöle
Ç.B	: Çapraz Bağlayıcı
m₀	: İlk kuru nümunenin ağırlığı
m	: Nemli nümunenin ağırlığıdır
W(%)	: Yüzde şişme derecesi
HEMA	: 2-Hidroksietil metakrilat
MMA	: Metil Metakrilat
NIPA	: N - izopropilakrilamid
KMS	: Karboksimetil selüloz
T⁰	: Başlangıç anı
T^T	: Herhangi bir t anı
KPS	: Potasyum persülfat
PAM	: Poliakrilamid
µL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre

M	: Molarite
GAG	: Glikozaminoglikan
W_t	: Herhangi bir t anındaki şişmiş hidrojelin ağırlığı
W₀	: Başlangıçtaki kuru hidrojelin ağırlığı
SEM	: Taramalı elektron Mikroskobu
FTIR	: Fourier transform infrared spectroscopy
PBS	: Phosphate Buffered Saline
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute (Besiyeri)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1.1. Hidrojel yapısı	1
Şekil 2.1. Kondroitin sülfatın kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2. Farklı birimlerden oluşan KS örnekleri	6
Şekil 2.3. Çapraz bağlı hidrojinin yapısı	8
Şekil 2.4. Su absorblanmış hidrojinin yapısı	9
Şekil 2.5. Hidrojellerin sınıflandırılması şematik olarak gösterilmiştir	10
Şekil 2.6. İyonik hidrojellerde şişme a) anyonik jel, b) katyonik jel	12
Şekil 2.7. İç içe geçmiş hidrojinin görünümü	13
Şekil 2.8. Sıcaklık ve pH'a duyarlı genişletilmiş durumdan çökmüş duruma ve tekrar genişletilmiş duruma değişiklik gösteren hidrojeller	16
Şekil 2.9. Karboksimetil selülozun kimyasal yapısı	18
Şekil 2.10. Hidrojellerin bazı kullanım alanları.....	19
Şekil 2.11. Hidrojellerin ilaç salım sistemlerinde kullanımı.....	20
Şekil 2.12. Difüzyon kontrollü membran sistemlerde ilaç salım mekanizması	22
Şekil 2.13. Difüzyon kontrollü matris sistemlerin ilaç salım mekanizması.....	23
Şekil 2.14. Zincire takılı sistemler	24
Şekil 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan FTIR cihazı.....	26
Şekil 3.2. Çalışma kapsamında kullanılan SEM cihazı.....	26
Şekil 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan UV-Vis spektrofotometre cihazı.	27
Şekil 3.4. Şematize olarak hidrojel oluşumunun gösterimi.....	28
Şekil 3.5. KS ilaç aktif maddesinin kalibrasyon doğrusu	33
Şekil 4.1. PAM KS hidrojinin FTIR spektrumu	35
Şekil 4.2. Farklı oranlarda KS katkılı hidrojellerin görünümü	35
Şekil 4.3. Farklı oranlı PAM KS hidrojellerinin FTIR görünümünün çakıştırılması.....	36
Şekil 4.4. Farklı oranlı PAM hidrojellerinin görünümü.....	37
Şekil 4.5. Farklı oranlı PAM hidrojellerinin FTIR görünümünün çakıştırılması.....	38
Şekil 4.6. Farklı oranlarda Ç.B oranlı hidrojellerin görünümü	39
Şekil 4.7. Farklı oranlarda PAM Ç.B hidrojellerinin FTIR spektrumlarının görünümü	39
Şekil 4.8. Farklı oranlarda KMS katkılı hidrojellerin görünümü	40

Şekil 4.9. Artan KMS miktarına göre elde edilen hidrojellerin FTIRspektrumları...	41
Şekil 4.10. Farklı oranlarda Aak katkılı a) PAM1, b) PAM2, c) PAM3, d) PAM4 hidrojellerin SEM görüntüleri	42
Şekil 4.11. Farklı oranlarda KS katkılı a) PAM KS1, b) PAM KS2, c) PAM KS3 hidrojellerinin SEM görüntüleri	43
Şekil 4.12. Farklı oranlarda a) PAM Ç.B1, b) PAM Ç.B5, PAM hidrojellerinin SEM görüntüleri.....	44
Şekil 4.13. Farklı oranlarda KMS katkılı a) PAM KMS1, b) PAM KMS5 hidrojellerinin SEM görüntüleri	45
Şekil 4.14. Farklı oranlarda Aak katkılı PAM hidrojellerinin zamana karşı (%) şişme grafiği	46
Şekil 4.15. Farklı oranlarda PAM KS hidrojellerinin zamana karşı (%) şişme grafiği	48
Şekil 4.16. Farklı oranlarda PAM KMS hidrojellerinin zamana karşı % şişme grafiği	47
Şekil 4.17. Farklı oranlarda PAM Ç.B hidrojellerinin zamana karşı % şişme grafiği	48
Şekil 4.18. PAM KS3 hidrojellerinin farklı pH'larda salım grafiği.....	49
Şekil 4.19. Trypan blue biyoyuyluluk ölçüm sonuçları	50
Şekil 4.20. PAM hidrojellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü	51
Şekil 4.21. PAM+KMS hidrojellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü	51
Şekil 4.22. PAM+KMS+KS hidrojellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü	52
Şekil 4.23. PAM+KS hidrojellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü.....	52

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

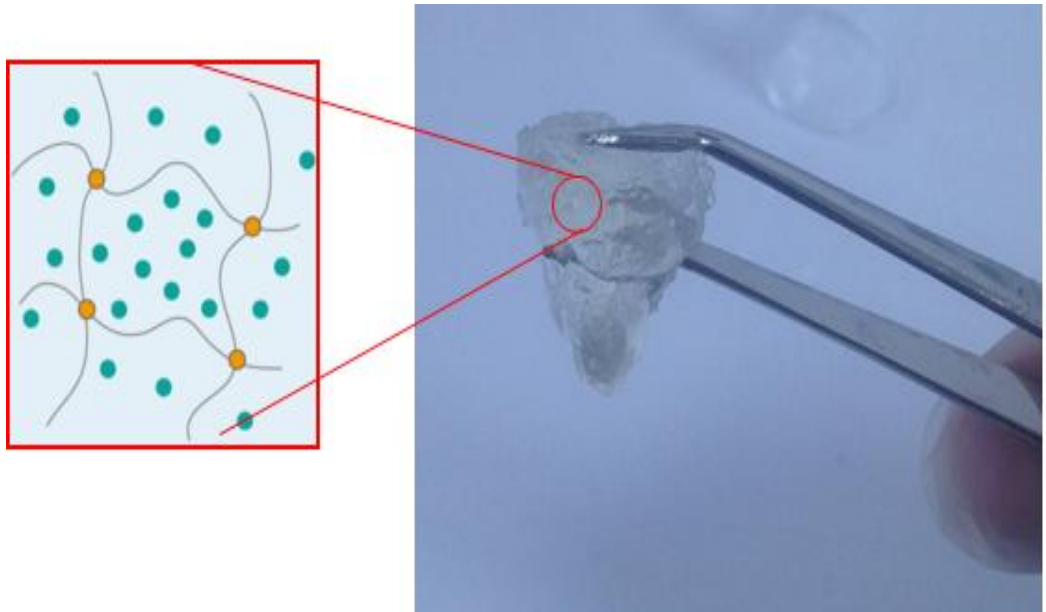
Tablo 2.1. Hidrojel sentezinde kullanılan bazı polimer ve monomerler **17**

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar malzemelerin gösterimi **25**

1. GİRİŞ

Günümüz teknolojisinde modern insanın gerek teknolojik alanda, gerek sağlık alanında ihtiyaçları sürekli olarak değişmektedir. Bu değişim malzeme bilimi, biyomalzemeler ve biyoteknolojik gelişmeleride beraberinde etkilemektedir. Özellikle ortaya çıkan yaşamsal problemler ve strese bağlı hastalıklar yeni teşhis tedavi ve tanı yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu nedenle pek çok işleri aynı anda yürütebilecek çok fonksiyonlu biyomalzemelerin geliştirilmesi oldukça önemli bir konu haline gelmiştir. Biyolojik sistemlere uyumlu, biyokararlı ve toksik özellikleri bulunmayan biyomateryaller temel hedef olarak görülmektedir. Bu hedef doğrultusunda özellikle biyomalzeme alanında hidrojeller önemli bir çözüm potansiyeli taşımaktadır (1).

Hidrojeller, su içerisinde çözünmeyen, şişme özelliği gösteren, su tutma kapasitesi yüksek olan çapraz bağlı, üç boyutlu, biyolojik olarak bozunabilen polimerik malzemelerdir (2,3). Genellikle hidrojeller, doğal veya sentetik polimerlerden sentezlenmektedir. Doğal polimerlerden elde edilen hidrojeller; biyoyumlu biyobozunur, hidrofilik ve çevre dostu olma gibi özelliklerinden dolayı büyük öneme sahiptirler. Hiyalüronik asit, kitosan, selüloz, aljinat gibi polisakkaritler ve doğal hidrofilik polimerler yüksek su tutma kapasitelerinden dolayı hidrojel oluşturma özelliğine sahiptirler. Biyoyumlu olma özellikleri nedeni ile taşıyıcı sistem olarak çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır.



Şekil 1.1. Hidrojel yapısı

Gelişen teknoloji ile birlikte hidrojel konusunda temel gelişme ve uygulama alanlarında artmıştır. Özellikle yapay organ, implantlar, yara ve doku destek materyalleri, doku iskeleleri ve kontrollü salım sistemleri olarak pek çok alanda hidrojel uygulamaları dikkat çekmektedir. Bu uygulama alanlarında hidrojeller, biyouyumluluğu yüksek, biyobozunur özellikleri kabul edilebilir düzeyde ve dokulara benzer davranış gösterdiğinden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır.

Örneğin, uygulanan hidrojeller, hasarlı dokuların yeniden yapılanması ve doku iskeleleri olarak hasarlı dokunun oluşumu sürecinde görev yapmakta ve doku oluşum sürecinden sonra bozularak bulunduğu ortamdan uzaklaşmaktadır (4). Bir diğer örnekte ise hidrojel içerikli doku yapıştırıcıları farklı yumuşak dokuların birbirine tutunmasını sağlamakta ve doku iyileşmesi sonrasında bozularak ortamdan uzaklaşmaktadır. Bu özellik sayesinde yabancı cisim etkisi görülmemekte tedavi sonrasında alerjik ve irritasyon oluşumu engellenmektedir. Hidrojellerin bir diğer önemli uygulaması ise biyouyumlu ilaç taşınım ve salım sistemlerinde kullanılmasıdır. Özellikle hormon ve antibakteriyel ilaçlar gibi pek çok ilaç türünü rahatlıkla uzun süreli sabit düzeyde salımı için uygundur.

Hidrojellerin gözenekli yapısı, ilaçların jel matrisine yüklenmesine izin vermekte daha sonra ilacın jel ağı boyunca moleküllerin difüzyon katsayısına bağlı olarak yavaşça serbest bırakılmasını sağlamaktadır. İlaçların yavaş salımı uzun bir süre boyunca çevre dokularda ilacın yüksek bir konsantrasyonda korunmasını sağlamaktadır (5).

Hidrojellerin avantajlı özelliklerinin yanı sıra düşük mekanik özellikleri, üretim aşamasında meydana gelen bozunmalar, hidrojel yapısının kontrolünde yaşanan sorunlar ve potansiyel immünojenite gibi geliştirilmesi gereken özellikleri de mevcuttur. Bu sorunları çözmek için araştırmacılar, doğal polimerli hidrojellerin sentezlenmesi ve modifiye edilmesi yönündeki çalışmalara yönelmişlerdir (3,6). Özellikle kontrollü ilaç salım sistemleri olarak kullanılan hidrojellerde en temel problem ilacın çok hızlı salınması veya istenilen düzeyde ilaç salımının gerçekleşmemesidir. Bu problemin çözülebilmesi için uygun gözenek yapısına sahip biyouyumluluğu yüksek hidrojel yapılarının tasarlanıp sentezlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda biyoteknolojik yöntemlerle, doğal polimer bazlı, etkin kullanım alanı bulabilecek biyouyumlu, nantoksik, özgün hidrojel tasarımı gerçekleştirilmiş olup ilaç etkinliği olan kondroitin sülfat (KS) salımında uygun sonuçlar elde edilmiştir.

Sentezlenen hidrojel yapıları öncelikle yapısal olarak FTIR ve SEM teknikleri ile analiz edilmiştir. Daha sonra şişme, biyouyumluluk ve KS salım özellikleri detaylı olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Günlük hayatta kullanılan biyomalzemeler yapısal olarak 3 ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar: metaller, polimerler, seramik ve kompozit malzemelerdir. Metalik malzemeler, genellikle sert, sağlam, tok ve dayanıklı malzemeler olmaları nedeni ile bağlantı ekipmanları, kemik sabitleyiciler, dental kök, göğüs kafesi sabitleyicisi gibi implant uygulamalarında tercih edilmektedirler. Ancak yüksek yoğunlukları kolay korozyona uğramaları ve ısı kapasitelerinin dokulardan farklı olması nedeni ile önemli dezavantajları bulunmaktadır. Seramik türü biyomalzemeler yüksek dayanıklılık ve biyouyumluluk avantajlarına sahipken ani yüklemelerde kırılırlar. Kompozit türü biyomalzemeler bu dezavantajları gidermek için geliştirilmiş olup kemik implantları ilaç salım sistemleri gibi biyoygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak bu tip kompozit yapılar, zor şekillenip ve biyobozunurluğu bulunmadığı için tedavi sonrasında yabancı cisim etkisi yapabilir. Bu nedenle polimerik malzemelere olan ilgi giderek artmaktadır. Yapay kan damarları, süturlar, yapay deri, sentetik yumuşak dokular, esnek implantlar, yapay kalp kapakçıkları, kalıcı ve değişen kontakt lensler, ilaç salım sistemleri gibi pek çok uygulamalarda polimerik biyomalzemeler yüksek avantaja sahiptir. Biyomateryal olarak polimerik malzemelerin kullanımında 3 tür yapı dikkat çekmektedir.

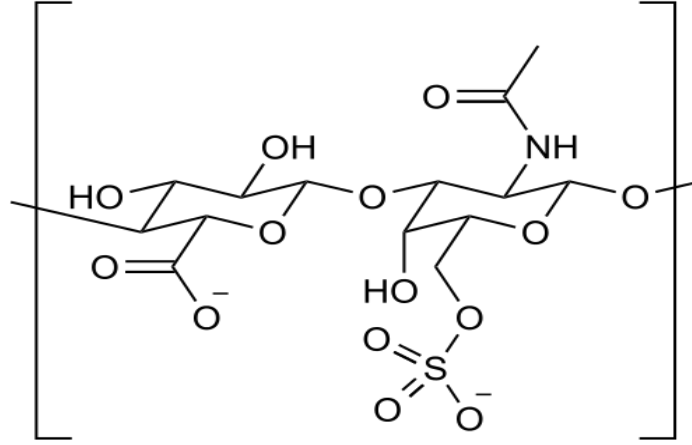
1. Biyouyumlu ve biyokalıcı malzemeler
2. Biyobozunur malzemeler
3. Hidrojeller

Özellikle ameliyat iplikleri, hücre ve doku destek yapıları, doku yapıştırıcıları gibi malzemelerin biyobozunur özellikte olması istenmektedir. Yapay diş, yapay kalp kapakçığı, kemik implantları, kalp pili yüzey kaplamaları gibi uygulamalarda biyokalıcı polimerik malzemeler tercih edilmektedir. Ancak esneklik gerektiren ve vücut sıvıları ile direk temas arz eden ilaç salım sistemleri, yumuşak lensler, doku mühendisliği gibi uygulamalarda hidrojellerin kullanımı kaçınılmazdır.

2.1. Kondroitin Sülfat

Kondroitin sülfat (KS), terapötik etkisinden dolayı kanser de dahil birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan, antiinflamatuvar, antiapoptotik,

antioksidan özellikleri ve hücre sinyalizasyon yollarındaki etkinliği kanıtlanmış, yaygın olarak hayvansal dokulardan elde edilen bir glikozaminoglikandır (7).



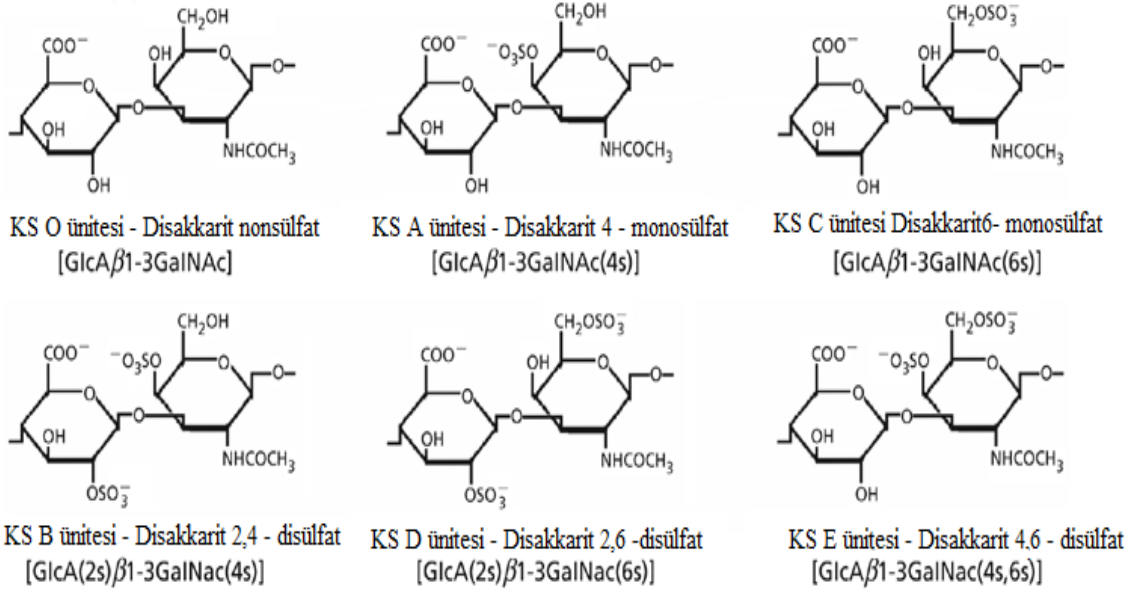
Şekil 2.1. Kondroitin sülfatın kimyasal yapısı

2.1.1. Kondroitin sülfatın yapısal özelliği

KS molekülü, *N*-asetilgalaktozamin ve glukuronik asit zincirinden oluşan sülfatlanmış glikozaminoglikandır. Farklı karbongruplarında sülfatlanmış, kondroitin sülfat yapıları bilinmektedir. Kondroitin-4-sülfat (KSA), GalNAc'in 4. pozisyonunda sülfatlanmış disakkarit içermektedir, kondroitin-6-sülfat (KSC) ise esas olarak GalNAc'nin 6. pozisyonunda sülfatlanmış bir disakkarit biriminden oluşmaktadır. Bununla birlikte, bilinen kondroitin numuneleri çoğunlukla bu iki çeşit disakkarit biriminin çeşitli yüzdelerinden oluşsa da, farklı sayı ve konumdaki sülfat gruplarına sahip disakkaritler, çeşitli yüzdelerde polisakarit zincirleri içinde bulunabilmektedirler (8).

Ekstraselüler matriksin yapısında bulunan KS'nin uzun zincirleri kıkırdak dokusunda önemli biyomekanik özellikleri belirlemektedir. Son dönemdeki çalışmalar KS miktarının kolajen tip 2 ve proteoglikanların sentezini hızlandırdığını göstermiştir. Ayrıca KS'nin sinoviyal zar hücreleri ile hyaluronik asit sentezini arttırdığı saptanmıştır. Araştırmalar, KS'nin çok geniş biyolojik spektruma ve patogeneze de çok farklı noktada etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bazı incelemeler esnasında KS'nin antienflamatuar özelliğe sahip olduğu, eklem dokularındaki bir çeşit iltihaplı

mediatörlerin konsantrasyonunu azalttığı gözlemlenmiştir. KS'nin protein oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ettiği, lipidlerin peroksidasyonunu baskılayıp serbest radikal oluşumunu önlediği ve böylece antioksidan özellik gösterdiği görülmüştür.



Şekil 2.2. Farklı birimlerden oluşan KS örnekleri (8).

Son zamanlarda cerrahi uygulama sonrası yara yerinde ağrıya yönelik antiinflamatuvar ilaçlar tercih edildiği görülmektedir. Literatürde; glukozamin kondroitin sülfat bileşiğinin sadece kıkırdak hücreleri üzerinde değil tenosit ve bağ dokusu hücreleri üzerinde de uyarıcı etkileri olduğu belirtilmektedir (8).

2.1.1.1. Kondroitin sülfatın biyolojik önemi

KS; kıkırdak bağ dokusunda ve hücre dışı matriksinde bulunan en önemli doğal polisakaritlerden biridir (9). KS proteoglikanlar; kollajen fibril topluluğu, hücre içi sinyal iletimi, hücre tanıma, akson oluşumu sırasında hücre yönlendirme, hücre yüzey glikoprotein yüzeyine hücre dışı matriks bileşenlerinin bağlanması gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir (10). Glikobiyoloji çalışmalarındaki son veriler, proteoglikanların ve onların karmaşık polisakkarit makro moleküllerinin sadece yapısal bileşenler

olmadığını, ayrıca birçok hücreyel olay ve fizyolojik süreçte yer aldıklarını göstermektedir (11, 12).

KS, tek başına, glikozamin veya diğer bileşenler ile kombinasyon halinde, Avrupa ve ABD’de bir nutrasötik olarak kullanılmaktadır (13,14). Terapötik amaçla kullanılan ilaçların vücutta maksimum etki göstereceği bölgede salımının sağlanması farmasötik teknoloji alanının önemli yönlerinden bir tanesidir. Son yıllarda oral yoldan verilen ve belirli bir bölgeye özgü ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik çok sayıda araştırmalar bulunmaktadır (15).

Osteoartrit hastalığının fonksiyonel semptomlarını önemli ölçüde iyileştirebilen bir ilaç olarak oral kondroitin sülfatın klinik etkinliği ile ilgili kanıtlar, yayınlanan bir dizi klinik çalışmada tartışılmıştır (16).

2.1.1.2. Kondroitin sülfatın biyomedikal alandaki kullanımı

KS kullanımının uzun bir geçmişi vardır, ancak şimdiye kadar etkisinin tüm mekanizmaları tam olarak açıklanmış değildir. Son zamanlardaki çalışmalar, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat zincirlerinin, merkezi sinir sistemi gelişmesi, yara onarımı, enfeksiyon, büyüme faktörü sinyalleme, hücre bölünmesi, farklılaşma ve migrasyon, ayrıca osteoartrit ve konvansiyonel tedavilerde önemli işlevlere sahip olduğunu göstermektedir (11, 12). Ağrı azaltıcı, semptomatik ve fonksiyonel performans artırıcı özellikleri KS’ı tıbbi uygulamalarda kullanımı için avantajlı hale getirmiştir. Laboratuvar ve klinik çalışmalar bize, KS’ın yapıyı modifiye etme gibi semptomatik özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. Uzun zaman osteoartrit hastalığı tedavisinde analjezikler ve doğal antiinflatuar preparatlar kullanılmıştır. Fakat çok sayıda yan etkileri bulunan özellikle gastrointestinal sistem ve kardiyovasküler sisteme olan etkisi, bu preparatların kullanımını sınırlamıştır (17).

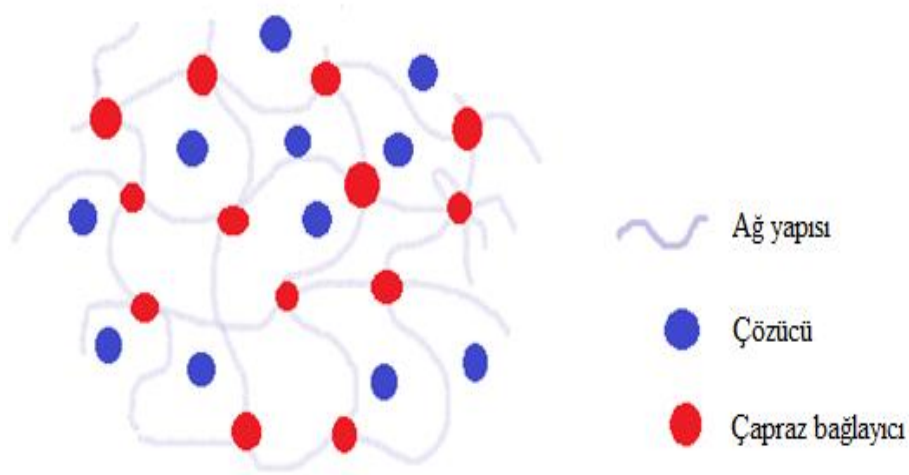
Son dönemlerdeki bir çalışmada KS’ın biyoyumlu immünojenik olmayan, bükülgen bir hidrojel preparatı tasarlanmış ve murin ve domuz epidermisinde yara iyileşmesinde faydalı olduğu gözlemlenmiştir (18).

Yapılan bir diğer çalışmada ise kırıldak dokusunun ekstraselüler matriksini taklit eden jelatin-kondroitin-hiyalüronat kopolimerinin hücreyel yapışmayı, kondrojenik farklılaşmayı ve glikozaminoglikan (GAG) sentezini geliştirebileceğini

göstermiştir (22). Bir diğer çalışmada ise KS'nin doku proteini için yeni bir yapıştırıcı olarak kullanılabilirliği vurgulanmıştır (19).

2.2. Hidrojeller

Hidrojeller üç boyutlu, su ve diğer çözeltiler içerisinde çözünmeyen çapraz bağlı ve hidrofilik polimerik ağ yapılı polimerler olarak adlandırılmaktadır. Yüksek miktarda su tutma kapasitesine sahiptirler. Hidrojel oluşumundaki çapraz bağlanma; kovalent (kimyasal çapraz bağlama), hidrojen, iyonik ya da hidrofobik (fiziksel çapraz bağlanma) bağlardan oluşmaktadır. Suda çözünmeyen hidrojeller stabiliteelerini koruyarak kendi ağırlıklarının %20-100 kadar suyu absorbe ederek yapılarında tutabilme özelliğine sahiptirler. %100'lük şişme kapasitesinin üstüne çıkan hidrojeller ise süperabsorban hidrojeller olarak bilinmektedir (20).

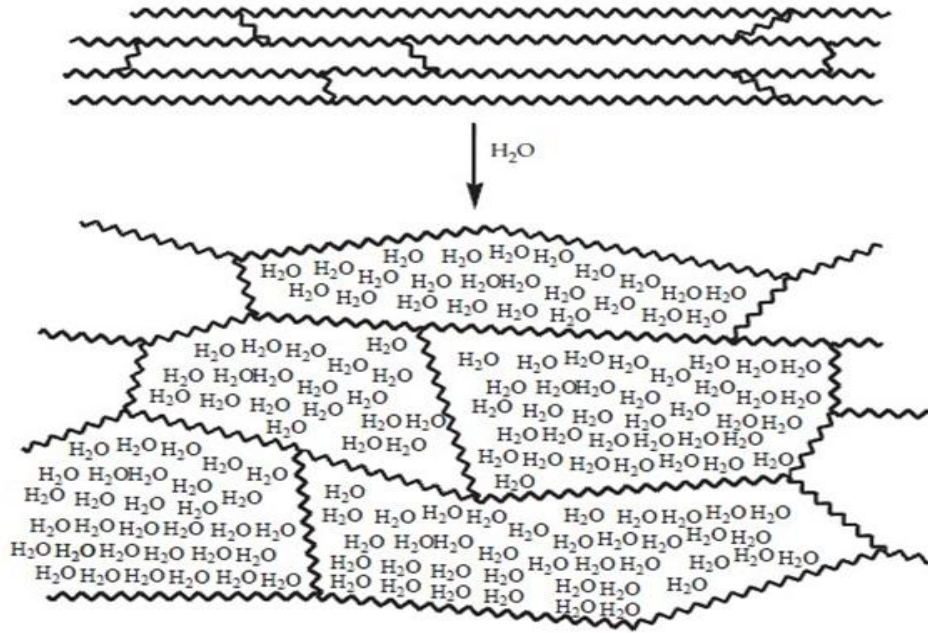


Şekil 2.3. Çapraz bağlı hidrojinin yapısı

Hidrojellerin çözünmezlik özelliği; hidrofil, hidroksil (-OH), karboksil (COOH), amid (-CONH₂) ve sülfonik (-SO₃H) gibi hidrofil grupların üç boyutlu ağ yapısının varlığından kaynaklanmaktadır. Biyomedikal alanlarda çok kullanılır hale gelmesindeki sebep ise bünyelerinde yüksek su miktarı tutabilme özellikleridir (21). Hidrojel yapısındaki katı faza su girişi olduğunda yapısı elastikiyet kazanarak yumuşak bir yapı oluşturmaktadır. Ek olarak hidrojinin şekli ve boyutu, serbest suyun dışarı atılması veya emilmesi gibi harici uyarılara tepki olarak kolayca değişebilmektedir (3). Polimer hidrojeller, ağ zincirlerine bağlı olarak asidik veya bazik gruplar içermektedirler.

Zincirlerdeki asidik gruplar yüksek pH'da deprotonize olurken bazik gruplar, düşük pH'da protonlanırlar (22).

Hidrojellerin en önemli özelliklerinden biri de uyarıya (pH, sıcaklık vb.) duyarlı olmalarıdır (23). Hidrojeller suda belli bir oranda şiştikten sonra denge haline gelmektedirler. Hidrojellerin su tutma kapasitesi hidrofilik grupların artması ile artarken, çapraz bağlanma ağlarının artması ile azalmaktadır (24).



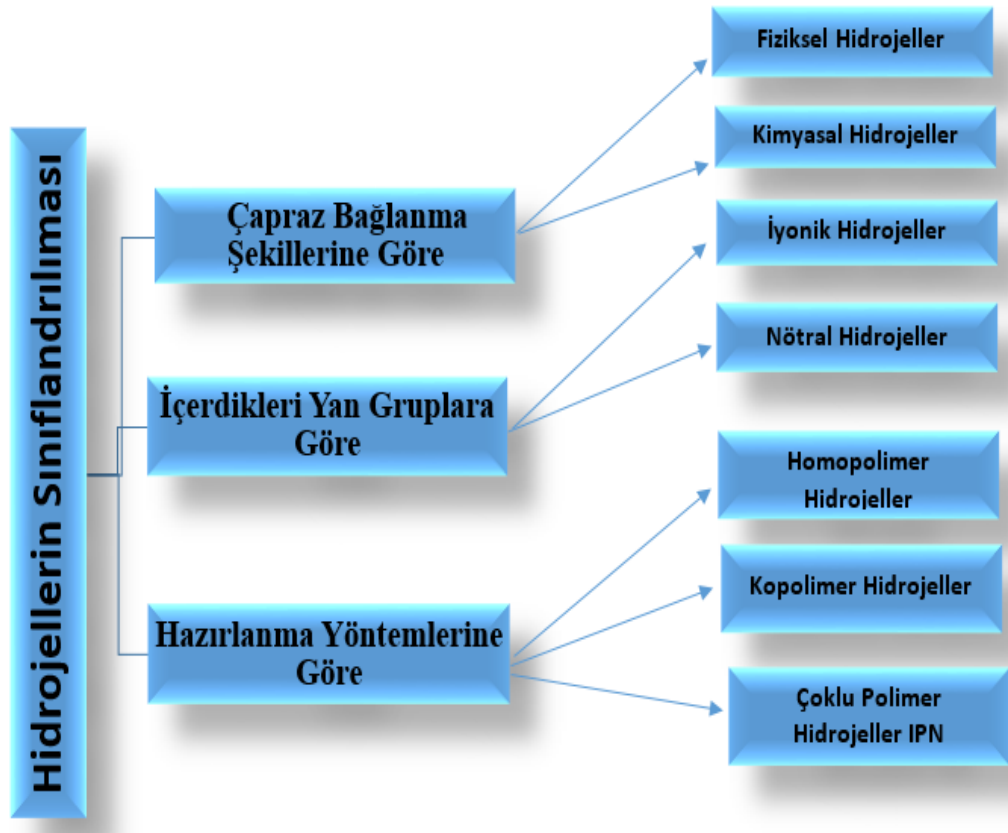
Şekil 2.4. Su absorblamış hidrojinin yapısı (34).

Son zamanlarda hidrojeller, üç boyutlu bir polimer zincir ağı ve makromoleküller arasındaki boşluğu dolduran sudan oluşan iki veya çok bileşenli sistemler olarak tanımlanmıştır. Hem sentetik hem doğal polimerlerden elde edilen hidrojel tanımına uyan materyaller bulunmaktadır. Doğal polimerlerden sentezlenen hidrojeller, genel olarak biyoyumluluk ve biyobozunurluk gibi büyük avantajlara sahiptirler. Ayrıca, yapılarındaki organik bileşenlerden dolayı hücresel aktiviteye olumlu yönde etki etmektedirler (25). Sentetik polimerlerden sentezlenen hidrojeller ise bozunabilirlik ve işlevsellik özelliklerinin olması için modifiye edilmiştir. Hidrojeller, kompleks doku yapılarına uyumluluk gösteren kullanışlı, yenilikçi biyomalzemelerdir. Buna ek olarak, hidrojellerin kimyasal modifikasyonları onların hücre tiplerinin çeşitliliği için instruktif biyomateryal olmasına olanak tanımaktadır (26-27). Hidrojeller

zamana bağlı olarak nisbeten bozulabilir ve yzeye uyumlu olabilirler. Hidrojellerin yapışkan özellikleri onları yatay olmayan yzelerde daha kullanışlı hale getirmektedir. Bir çok avantajlı özelliklerinin yanı sıra onlarında bazı sınırlamaları vardır. Birçok hidrojin düşük gerilme mukavemetinin olması, onların taşıyıcı uygulamalarda kullanımını sınırlayabilmektedir. Bu tip sınırlama bir çok ilaç dağıtım sistemlerinde önemlidir. Hidrojellerin yavaş bozunabilir olması, ilaç salımı, yumuşak doku replasmanı gibi diğer yararlı uygulamalar arasındadır (27). Hidrojeller, çapraz bağlanma tipine, polimerik bileşimine, konfigürasyonuna ve fiziksel görünümüne göre sınıflandırılabilir (28).

2.2.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller, hazırlama yöntemlerine, iyonik yüklerine, fiziksel yapılarına ve çapraz bağlanma durumlarına bağlı olarak sınıflandırılabilir (27).



Şekil 2.5. Hidrojellerin sınıflandırılması şematik olarak gösterilmiştir (27).

2.2.1.1. Fiziksel çapraz bağlı hidrojjeller

İyonik etkileşim, hidrojen bağları, koordinasyon bağları, hidrofobik etkileşimler gibi fiziksel etkileşimlerden oluşan çapraz bağlanmalı hidrojjeller, fiziksel hidrojjeller olarak adlandırılmaktadır (24).

2.2.1.2. Kimyasal çapraz bağlı hidrojjeller

Kimyasal çapraz bağlı hidrojjeller, bir veya daha fazla monomerin çapraz bağlayıcı ile doğrudan çapraz bağlanması ile oluşmaktadır kimyasal çapraz bağlanma yöntemi 4 aşamadan oluşmaktadır.

1. Başlama

2. Zincir Uzaması

3. Çapraz Bağlanma

4. Birleşme veya Bölünme ile Sonlanma

Başta çapraz bağlayıcı varlığında birbirlerine kimyasal olarak bağlanan monomerler daha sonra çapraz bağlayıcı ile yer değiştirerek polimer zincirlerini birbirine bağlayarak yeniden hidrojel oluşturabilmektedirler (29).

2.2.1.3. Nötral hidrojjeller

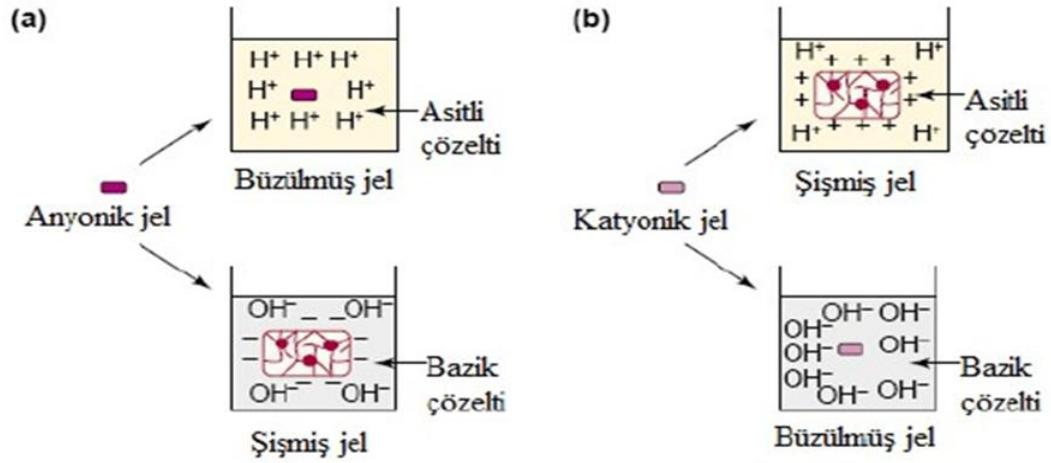
Yapılarında yüklü gruplar bulunmayan homopolimerik veya kopolimerik hidrojjeller olarak bilinmektedirler. Hidrojjellerdeki şişme ve büzülme etkileri çevre sıcaklığındaki değişim ile meydana gelmektedir (24).

2.2.1.4. İyonik hidrojjeller

Bu tür hidrojjeller polielektrolit olarak bilinmektedir ve iyonik yüklü monomerlerden hazırlanmaktadır. Monomer yükünün negatif veya pozitif olmasına göre anyonik veya katyonik olarak isimlendirilmektedir. Hem pozitif hem negatif yük içeren hidrojjeller poliamfolitik olarak adlandırılmaktadır. Uyarılara duyarlı olmaları

yapılarındaki yüklü gruplara bağlıdır. Jeldeki yüklerin itme kuvvetleri sonucunda ağımsı yapı içerisine daha çok çözücü girebilmekte ve sıvı tutma kapasiteleri artabilmektedir (30).

İyonik fonksiyonel gruplar içeren hidrojeller su absorblama işlemlerinde kullanılan hidrojellerdir. Karboksi, sülfonik asit, amonyum tuzu gibi iyonlaşabilen fonksiyonel grupların varlığı hidrofilitiyi arttırdığından su absorblama kapasitesi artmaktadır. Bu durum iyonlar arası oluşan ozmotik basınçla açıklanmaktadır. Asit grupları içeren iyonik hidrojellerde, şişme kapasitesinde bazik ortamda artış gözlemlenirken, bazik gruplar içeren hidrojellerde, asidik ortamda şişme kapasitesinde azalma gözlemlenmektedir. Bu durum Şekil 2.6'da gösterilmiştir (24).



Şekil 2.6. İyonik hidrojellerde şişme a) anyonik jel, b) katyonik jel (24)

2.2.3. Hazırlanma Yöntemlerine Göre Hidrojeller

- Homopolimer Hidrojeller

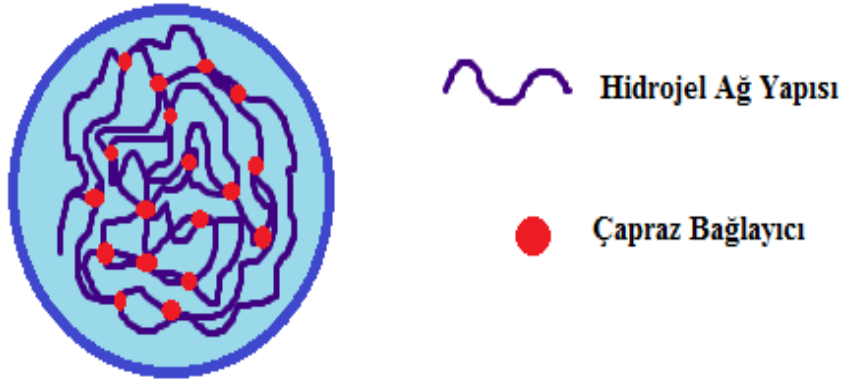
Yapısında tek tür monomer zinciri bulunduran hidrojeller, homopolimer hidrojeller olarak adlandırılmaktadır.

- Kopolimer Hidrojeller

Yapısında birden çok monomer türü içeren hidrojeller, kopolimer hidrojeller olarak adlandırılmaktadır.

- Çoklu polimer hidrojel IPN

Hidrojellerin mekanik özellikleri, şişme ve büzülme davranışları, sıcaklık, pH, iyonik güç, çözücü bileşimi ve elektrik alanları gibi fiziksel veya kimyasal uyarılara göre değişmektedir. Bu özellikler, hidrojelleri akıllı malzemeler haline getirerek ilaç salım potansiyelini arttırmaktadır. Hidrojeller, pH ve sıcaklığa duyarlı olmalarından dolayı pH ve sıcaklığa duyarlı olarak sentezlenmektedirler. Hidrojellerin bir diğer sentez yöntemi de çoklu polimerlerle iç içe geçmiş çapraz bağlı yapıda sentezlenmesidir. Diğer yöntemlere kıyasla, IPN yöntemi: hidrojellerin elastik ve mekanik özelliklerinin daha üstün olmasını sağlamaktadır (31). İç içe geçmiş polimer ağ teknolojisi, hidrojellerin imalatı için basit ve uygulanabilir bir yöntemdir; burada hidrofilik polimer zinciri başka bir çapraz bağlı polimerik ağa herhangi bir kimyasal bağ olmadan nüfuz etmektedir (32).



Şekil 2.7. İç içe geçmiş hidrojel ağ yapısının görünümü

2.2.3.1. Hidrojel sentezinde kullanılan polimerizasyon yöntemleri

- Gama Radyasyon Polimerizasyon Yöntemi
- Radikal Polimerizasyon Yöntemi
- UV-Radyasyon (Foto) Polimerizasyon Yöntemi
- Çözelti Polimerizasyonu
- Süspansiyon Polimerizasyonu

- Emülsiyon Polimerizasyonu

2.2.3.2. Gama radyasyonla polimerizasyon

Son yıllarda kullanılan polimerizasyon yönteminden birisi olan radyasyon polimerizasyon yönteminde γ -ışınları kullanarak sentezlenmektedir. Radyasyon polimerizasyon yönteminin temel özellikler şu şekildedir:

1. Tek basamaklı ve basit olması
2. Her sıcaklıkta radyasyon polimerizasyonunun gerçekleşmesi
3. Işınlama miktarı ile çapraz bağlama derecesinin kontrol edilmesi (33).

2.2.3.3. Radikal polimerizasyon yöntemi

Kimyasal olarak çapraz bağlanmış jeller, çapraz bağlayıcı ajanlar varlığında düşük molekül ağırlıklı monomerlerin radikal polimerizasyonu ile elde edilebilmektedir (34). Radikal polimerizasyon yöntemi polimer bazlı biyomedikal ürünlerin uygulama alanında kullanılması nedeni ile biyoteknoloji alanında büyük rol oynamaktadır (35).

2.2.3.4. Çözelti polimerizasyonu

Bu yöntemle sentezlenen hidrojeller yüksek şişme kapasitesine sahiptirler (36). Bu polimerizasyon yöntemi genel olarak sulu çözeltilerde yapılmaktadır. Hidrofilik polimerlerde, hidroksil gurubu içeren iki veya çok fonksiyonlu çapraz bağlayıcı kullanılmaktadır. Çapraz bağlayıcı maddeler olarak genellikle formaldehit, asetaldehit, ve glutaraldehit gibi aldehitler, maleik ve okzalik asit, etilen glikol dimetakrilat, 1,4-bütandiol dimetakrilat, trimetilol propan triakrilat, *N,N*-metilen-bisakrilamid, triallil amin, divinil sülfat kullanılmaktadır (37).

2.3.3.5. Süspansiyon polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu, suda (sürekli faz) monomer damlacıklarının süspansiyon haline getirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Süspansiyon polimerizasyonu

son zamanlarda birçok ticari polimerin üretiminde kullanılmaktadır. Toz ya da mikro-küre (kürecik) olarak elde edildiği için bu yöntem avantajlı sayılmaktadır. Polimerizasyon işlemi boyunca kuvvetli karıştırma ve süspansiyon stabilizatörlerin varlığı, polimer parçacıklarının bozulmadan üretimini sağlamaktadır (38).

2.3.3.6. Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyon yöntemi: bir biri ile karışmayan iki fazdan oluşmaktadır. Süspansiyon polimerizasyonundan farklı olarak burada başlatıcı dağıtma fazında çözünmektedir. Emülsiyon yapıcı maddeler kullanılarak monomer fazı, dağıtma fazının içinde stabil olarak tutulmaktadır (39).

2.2.4. Hidrojellerde Şişme Potansiyelinin Karakterizasyonu

Dinamik şişme deneyleri genellikle 37°C’de pH 7,4’te gerçekleştirilmektedir. Sürekli çalkalamalı inkübatörde karıştırılan örnekler zaman aralıkları ile çıkartılıp tartıma tabi tutulmaktadır. Farklı zaman aralıkları ile şişme derecesi aşağıdaki 2.1 eşitliğine göre hesaplanmaktadır (40).

$$W(\%) = [(m - m_0) \times 100/m] \quad (2.1).$$

m_0 - ilk kuru numunenin ağırlığı,

m – nemli numunenin ağırlığı,

$W(\%)$ – yüzde şişme derecesi.

2.2.4.1. Hidrojellerde şişmeyi etkileyen faktörler.

Hidrojellerde şişmeyi etkileyen üç faktör vardır (21). Bu faktörler aşağıdaki bölümlerde açıklanmıştır.

- **Çapraz Bağlanma**

Hidrojel in şişmesini en çok etkileyen faktörlerden birisi çapraz bağlanma oranıdır. Kullanılan çapraz bağlanma oranı yüksek miktarda olduğunda, ortaya çıkan hidrojel in

yapısı da daha sık istifli olacaktır. Böyle bir yapı, polimer zincirinin hareketliliğini engellemekte, bununla birlikte şişme oranını düşürmektedir.

- **Kimyasal Yapı**

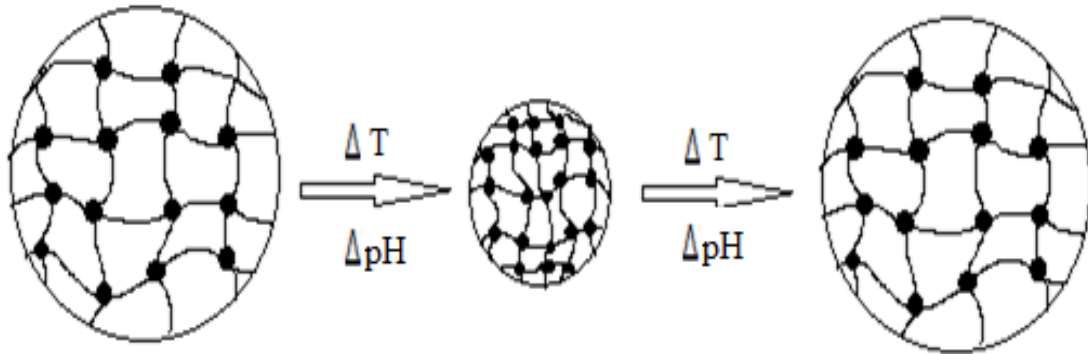
Kimyasal yapı da, hidrojellerin şişme oranını etkileyen faktörlerdendir. Bünyesinde daha fazla hidrofilik gruplar içeren hidrojeller, hidrofobik grup içeren hidrojellere göre daha yüksek şişme derecesine sahiptir.

- **Uyarıcılar**

Çevreye duyarlı olan hidrojellerde ise spesifik bir uyarıcı şişme derecesini etkileyebilir. Örneğin sıcaklık veya pH'a duyarlı hidrojellerin şişme oranı, sıcaklık ve pH'ın değişimlerinden etkilenebilir.

2.2.4.2. pH ve sıcaklığa duyarlı hidrojeller

Bir çok hidrojel yapıları hem pH hem de sıcaklığa duyarlıdır. Bu tür hidrojeller, genelde akrilamid gibi sıcaklığa duyarlı ve metilen bisakrilamid gibi pH'a duyarlı monomerlerin polimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Poliakrilamid türevi hidrojeller hem pH ve hem de sıcaklığa duyarlılık göstermektedir (41). Şekil 2.8'de sıcaklık ve pH'a duyarlı bir hidrojel sisteminin davranışı şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Sıcaklık ve pH'ya duyarlı genişletilmiş durumdan çökmüş duruma ve tekrar genişletilmiş duruma değişiklik gösteren hidrojeller

2.2.5. Hidrojellerde Karboksümetil Selüloz Kullanımı

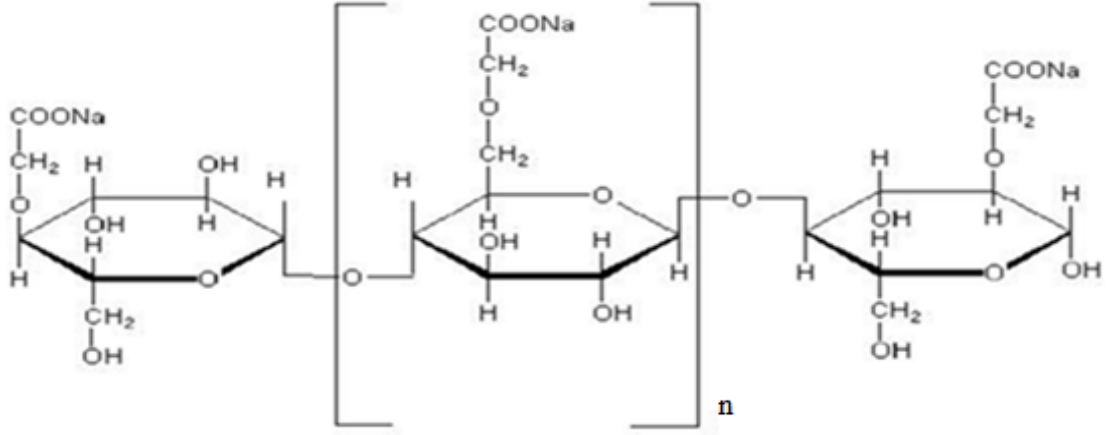
Doğal polimerler, biyouyumluluk, biyobozunurluk, nantoksik olma ve çevresel koşullara uyum sağlaması nedeni ile önemli yapılardır. Son yıllarda, nişasta, kitin, aljinat, karboksümetil selüloz, aljinat dekstran gibi doğal polimerler üzerinde çalışmalar yapılmıştır (42). Çalışmamızda da, doğal bir polimer olan Karboksümetilselülozun, hidrojel üzerindeki karakterizasyonu araştırılmıştır.

Biyouyumluluk, biyomateryallerin işlevselliğinin geliştirilmesi için temel bir gerekliliktir. Herhangi bir biyouyumluluk değerlendirmesi, kullanılan polimerlerin insan hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması esasına dayanır. Hidrojel çalışmalarında, kullanılan materyallerin potansiyel toksisitesinin belirlenmesi, hidrojinin biyolojik uygulamalar için uygunluğu teyit edilmesi için bir gerekliliktir (43). Doğal, sentetik veya yarı sentetik kaynaklardan elde edilen polimerler, hidrojellerin sentezlenmesi için kullanılabilir. Literatürde çeşitli monomerlerin ve çapraz bağlayıcıların ayrıntılı bir listesi bulunmaktadır (44).

Tablo 2.1. Hidrojel sentezinde kullanılan bazı polimer ve monomerler

DOĞAL POLİMERLER	SENTETİK MONOMERLER
Karboksümetil Selüloz	2-Hidroksietil metakrilat (HEMA)
Dekstran	Akrilik Asit (Aac)
Hiyalüronik asit	Akrilamid (Aak)
Kitosan	Metil Metakrilat (MMA)
Fibrin	<i>N</i> -izopropilakrilamid (NIPA)

KMS suda çözünen, sentetik kaynaklı, selüloz ve eter türevli doğal bir polimerdir. Kimyasal formülü ise $C_6H_7O_2(OH)_2OCH_2COO_2$ şeklindedir. Beyaz ile sarımsı arası renge ve lifli bir yapıya sahiptir. KMS, sıcak ve soğuk suda çözünebilir, organik çözücülerde çözünmez. KMS'un fonksiyonel özellikleri selülozun yapısal özelliklerine bağlıdır (örneğin; içerdiği hidroksil gruplarına). KMS, gıda, ilaç ve kozmetik gibi alanlarda viskozite artırıcı, emülsiyon stabilizatörü ve kıvam artırıcı olarak kullanılmaktadır (42).



Şekil 2.9. Karboksimetil selülozun kimyasal yapısı

2.2.6. Hidrojellerin Kullanım Alanları

Hidrojellerin, yaygın olarak eczacılık, biyomühendislik, doku mühendisliği, biyotıp, veterinerlik, gıda endüstrisi gibi alanlarda kullanımına geniş ölçüde rastlanmaktadır. Hidrojeller bu gibi alanlarda taşıyıcı ve aynı zamanda salınım sistemleri olarak kullanılmaktadır. Kontrollü salınım yapan hidrojellerde hapsedilen etken madde (ilaç, tarım ilacı vb.) hedef bölgeye belirli zaman aralıklarında ulaşmaktadır. Tıp ve eczacılık gibi alanlarda bu konu ile ilgili bir çok çalışma bulunmaktadır (45). Hidrojeller özellikle doku mühendisliği alanı ve ilaç imalatında ilgi odağına çevrilmiştir.

Kontrollü salınım yapan hidrojeller kullanılarak kontakt lens, yapay organ, enzim tutuklama ve ilaç sistemleri oluşturulmuştur. Hidrojeller biyotıp alanında da kaplama, dikiş iplikleri elektrot yapımı gibi alanlarda kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda hidrojellerin, önemli hastalık gruplarından biri olan diz kemik hastalıkları tedavisinde biyomateryal olarak, ayrıca sentetik kıkırdak yapımında, yapay kornea, safra kesesi hatta yemek borusu yapımında kullanıldığı bildirilmektedir (46).

İlaç salınımlı polimer sistemler, stentleme, kanser tedavisi ile restenozun önlenmesi ve yara iyileşmesinin artırılması dahil olmak üzere çeşitli klinik ortamlarda yararlı olduklarını kanıtlamıştır. Son zamanlardaki yapılan çalışmalarda lokalize ilaç dağıtan polimerik hidrojeller klinik olarak değerlendirilmiştir (47, 48). Literatürde doku mühendisliğinde, yara iyileşmesi ve ilaç dağıtımı gibi uygulamalarda kullanımı için kendi kendine yenileyenhidrojel tasarımına rastlanmıştır (49, 50).



Doku mühendisliği



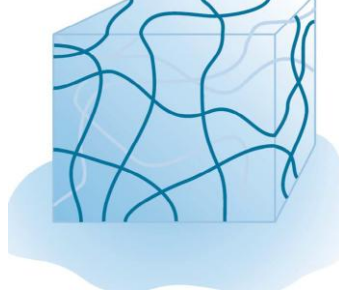
Yanık örtüsü



Yara iyileştirme



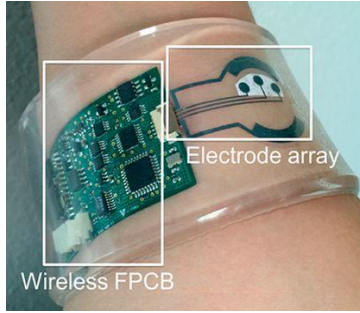
İlaç salımı



Hidrojel



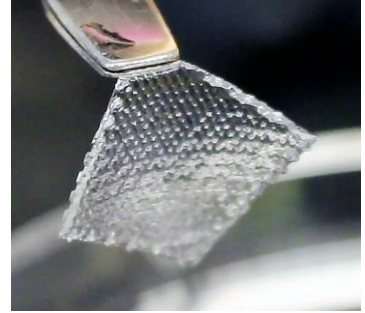
Kontak lens



Sensör



Absorblayıcı



Hücre İskelesi

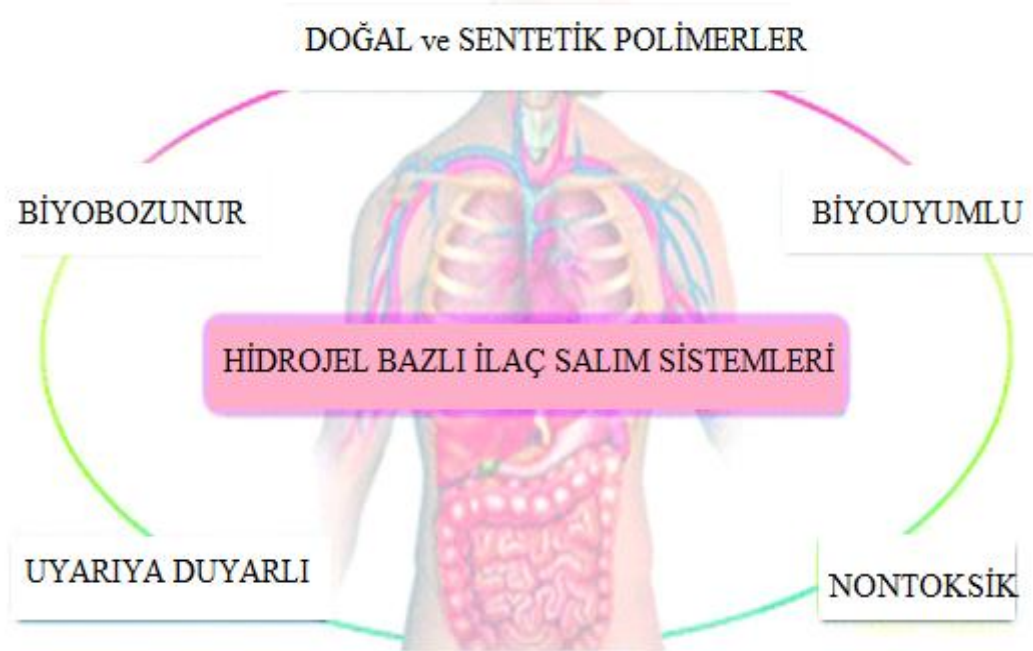
Şekil 2.10. Hidrojellerin bazı kullanım alanları.

Son zamanlarda vücut dışında yara tedavilerinde yara örtü vasıtalarının yerini modern hidrojel örtüler almıştır. Yara örtüsü şeklinde hidrojeller elastik yaprak, amorf jel ya da film olarak uygulanmaktadır. Günümüzde kullanılan yaprak formundaki hidrojeller, ideal yara örtüsü özelliklerinin çoğunu üstlenmektedir. Hidrojel örtüler, yapısında bulundurduğu hidrofil gruplardan dolayı kurumuş olan yara yüzeyine uygulandıklarında, yara bölgesini nemlendirerek yaranın iyileşmesi için gerekli nemli ortamı sağlamaktadır. Hidrojellerin diğer bir avantajı da kolay bir şekilde yara yüzeyinden temizlenmeleridir. Hidrojel örtüsü, yara yüzeyinde lokal ilaç dağıtımını sağlamaktadır. Hidrojeldeki çapraz bağlanma derecesi isteğe bağlı olarak kontrol

edilerek ilacın yara bölgesine difüzyonu sağlanabilmektedir. Hidrojellerin, dokuların nem içeriğini ve kollajenaz üretimini artırması ile hasarlı ve enfekte olmuş dokuların otolitik debridmanını kolaylaştırdığı bilinmektedir (42).

Yapılan bir çalışmada günümüzdeki endüstrileşmesinde atışı ile çevresel kirliliği azaltmak için anyonik hidrojeller kullanılarak atık kurşun, bakır, kadmiyum ve nikel gibi ağır metallerin ve safranin-t gibi boyar maddelerin, bazik hidrojellerle ise indigo carmine gibi asidik boyar maddenin giderilebileceği gösterilmiştir (51-53).

2.2.6.1. Hidrojellerin ilaç salım sistemlerinde kullanımı



Şekil 2.11. Hidrojellerin ilaç salım sistemlerinde kullanımı (54).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hidrojeller, ilaç salım sistemlerinde, yerinde oluşan jellerde (in situ) ve doku iskeleleri gibi biyomedikal uygulamalarda geniş ölçüde kullanılmaktadır. Hidrojeller, biyolojik sistemlerle uyumlu, pH ve sıcaklık gibi çevresel uyarılara karşı duyarlı sistemlerdir. Hidrojellerde, ilaç salım çalışmaları genel olarak iki yöntemle yapılabilmektedir. Birinci yöntem: Polimerizasyon esnasında, çapraz bağlayıcı, monomer, ve ilacın karıştırılması. Bu şekilde ilaç hidrojel matrisine yerleşmiş olur (55). İkinci yöntem: Hidrojel, bir ilaç çözeltisi içerisinde denge haline ulaşana

kadar şişmeye bırakılarak daha sonra kurutulmaktadır. İkinci yöntem birinci yönteme göre daha avantajlı sayılabilmektedir, çünkü polimerizasyon şartları ilaç özelliklerini etkileyebilmektedir (56).

2.2.7. Polimerik Hidrojel İlaç Salım Sistemlerinin Sınıflandırılması

Avantajlı özelliklerinden dolayı hidrojeller ilaç salım uygulamalarında oldukça geniş açıda kullanılmaktadır. Hidrofilite nedeni ile bünyelerine büyük miktarda su çekebilen hidrojeller moleküler salım mekanizmaları hidrofobik polimerlere göre çok farklıdır. Hidrojellerde üç farklı ilaç salım mekanizması (57).

- Difüzyon kontrollü sistemler
 - ✓ **Membran sistemler**
 - ✓ **Matris sistemler**
- Kimyasal kontrollü sistemler
 - ✓ **Biyoparçalanabilir sistemler**
 - ✓ **Zincire takılı polimerler**
- Çözücünün harekete geçirdiği sistemler
 - ✓ **Şişme kontrollü sistemler**
 - ✓ **Ozmotik kontrollü sistemler**

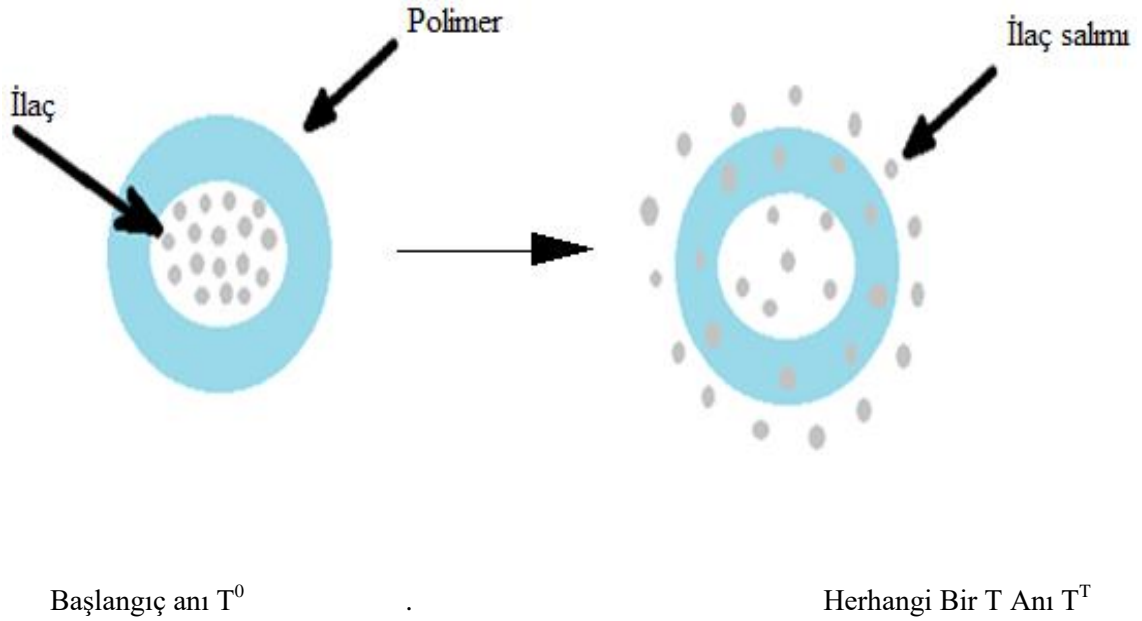
• Difüzyon kontrollü sistemler

Yüksek kimyasal potansiyelli veya yüksek konsantrasyonlu bir bölgeden, düşük konsantrasyonlu yada düşük kimyasal potansiyele sahip bir bölge atom veya partikül taşınımı difüzyon olarak adlandırılmaktadır. Hidrojellerde ilaç salımını açıklamada kullanılan en yaygın mekanizma, difüzyon kontrolü sistemlerdir. İlk önce ilaç, hidrojinin içinden yüzeyine taşınmakta daha sonra sıvıya geçmektedir.

✓ **Membran sistemler**

Bu sistemlerde ilaç, şişen veya şişmeyen polimer içeren ortama konulmaktadır. İlacın polimerik tabakadan difüzyonu bu sistemlerde salım hızını kontrol eden basamaktır. Bu sistemlerde, ilaç bir polimer membran içerisinde çözünmüş ya da dağılmış şekilde bulunmaktadır. Membranın kalınlığı ve geçirgenliği kısmen ilacın

difüzyon hızını kontrol eder Şekil 2.12’de membran sistemlerin gösterimi yer almaktadır.

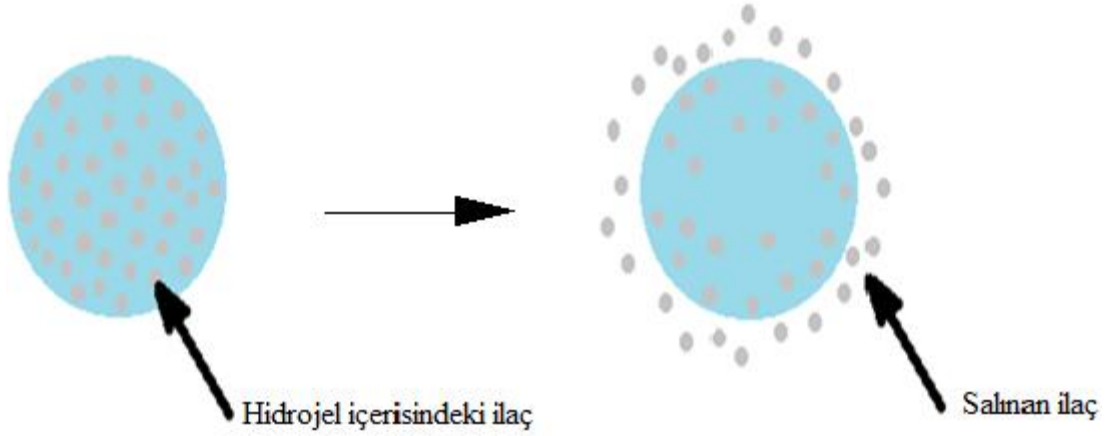


Şekil 2.12. Difüzyon kontrollü membran sistemlerde ilaç salım mekanizması

Bu sistemlerde farmosötik açıdan üstün sayılan özelliği sıfırıncı dereceden salım kinetiğine sahip olmasıdır. Buda sabit salım hızına olumlu yönde etki etmektedir. Membran sistemlerinin dezavantajı ise genellikle vücutta parçalanmamasıdır, bu nedenle cerrahi işlemlerle uzaklaştırılmaları gerekmektedir (57).

✓ **Matris Sistemleri**

Matris sistemlerinde, ilaç polimerizasyon esnasında homojen bir şekilde çözünerek eklenmektedir. İlk önce yüzeye yakın mesafede konumlanmış ilaç daha ise, derinlikteki ilaç salınmaktadır. İlaç matris boyunca daha uzun ve karmaşık bir yoldan geçmek zorunda olduğu için salım daha çok zaman alabilmektedir. Bundan ötürü, bazen bu sistemlerde devamlı azalan salım oranıyla birinci dereceden salım davranışı gözlemlenmektedir (57).



Başlangıç anı T^0

Herhangi Bir T Anı T^T

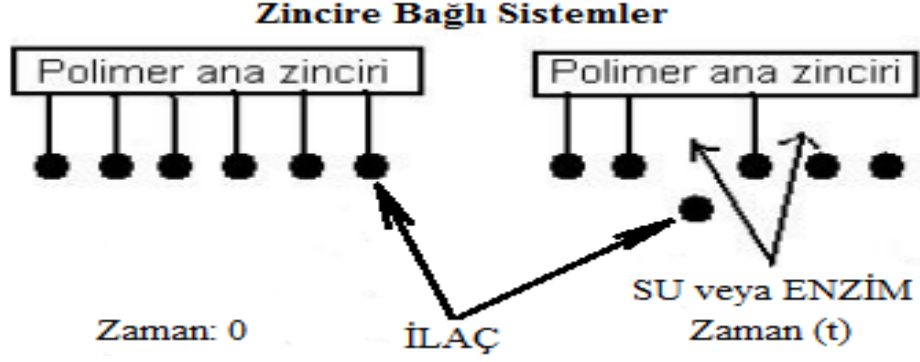
Şekil 2.13. Difüzyon kontrollü matris sistemlerin ilaç salım mekanizması

- **Kimyasal kontrollü sistemler**

Kimyasal kontrollü sistemler vücutta aşınan sistemler ve zincire takılan sistemler olarak iki şekilde hazırlanmaktadır. Vücutta aşınan sistemlerin kullanımı sınırlıdır. Bu uygulamalarda ilaç salımı tamamlandıktan sonra vücuttan çıkarılması için cerrahi işlem gerekmektedir. Bu nedenle vücutta parçalanabilir polimerler tercih edilmektedir. Vücutta aşınan sistemlerde salınım hızı difüzyon veya aşınma ile kontrol edilmektedir. Eğer matrisin aşınması ilaç difüzyonuna göre yavaş ise, salım difüzyonu kontrollüdür. Eğer ilaç matris içinde immobilize edilmişse ve difüzyon aşınmaya göre yavaşsa, ilaç salım hızı aşınma kontrollüdür. Bu özellik aşınmaya uğramayan sistemlere göre üstünlük sağlamaktadır (57).

- ✓ **Zincire bağlı sistemler**

Bu tür sistemlerde ilaç, polimer zincirine kimyasal olarak bağlanmaktadır ve bağın hidrolitik veya enzimatik bir şekilde kopması ile ilaç salımı gerçekleşmektedir. Bu tür polimerik sistemler, tedavi etkinliğini artırmak, belirli hücre veya organlara ilacın gönderilmesi amacı ile kısa süreli (bir kaç saat) uygulamalarda kullanılmaktadır. Şekil 2.14’de zincire takılı sistemlerin gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2.14. Zincire bağlı sistemler

Bu tür kontrollü salım sistemlerinde sistemin ağırlıkça %80'i ilaç olacak şekilde sentezlenmektedir.

- **Çözücü ile harekete geçen sistemler**

Çözücünün etkisi ile harekete geçen sistemler şişme kontrollü sistemler ve ozmotik kontrollü sistemler olarak ikiye ayrılmaktadır.

- ✓ **Şişme kontrollü sistemler**

Bu tür sistemlerde ilaç, polimer sentez aşamasında polimer çözeltisi içine çözülerek dağıtılmaktadır. Bir sonraki aşamada ise çözücü uzaklaştırılarak, çözücüsüz camsı bir şekilde polimer matrisi elde edilmektedir. Bu camsı polimer matrisi çözünme ortamına konulduğunda (kullanılan ortam su veya biyolojik sıvılar), çözücünün polimer matrisi içerisinde geçişi başlayarak, polimerin şişmesi sağlanmaktadır. Şişmiş hidrojel elastiki jel durumuna gelmektedir ve ilaç polimer içerisine difüze olarak dışarı doğru salınmaktadır.

- ✓ **Ozmotik kontrollü sistemler**

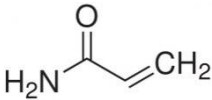
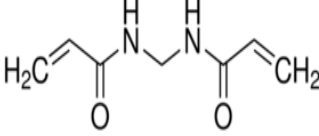
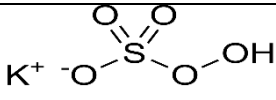
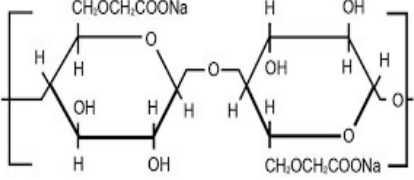
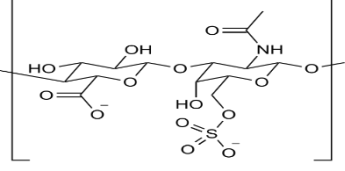
Bu sistemlerde ilaç yarı geçirgen bir membran içine geçmektedir. Genellikle ozmotik işlemi içeren bir tuz içerebilmektedir ve ilaç konantrasyonu doygunluk sınırının üstüne çıkmaktadır. Bu sistemlerde salım genellikle sıfırıncı dereceden olup, yalnızca ozmos olayı ile kontrol edilmektedir (57).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, çapraz bağlı hidrojellerin üretiminde monomer olarak akrilamid (SIGMA ALDRICH), doğal polimer olarak Karboksimetil selüloz (A Aesar), başlatıcı olarak Potasyum Persülfat (Fisher Scientific), Kondroitin sülfat (SIGMA ALDRICH), çapraz bağlayıcı olarak ise *N,N*-metilen bisakrilamid kullanılmıştır. Kullanılan kimyasalların kimyasal formüllerive kısaltmaları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Özellikleri

Tablo 3.1. Kullanılan kimyasallar malzemelerin gösterimi

Adı	Yapısal Formülü	Molekül Ağırlığı
Akrilamid (Aak)		71.079 g/mol
<i>N,N</i> -metilen bisakrilamid (Ç.B)		154,2 g/mol
Potasyum Persülfat (KPS)		270.309 g/mol
Karboksimetil selüloz (KMS)		262.19 g/mol
Kondroitin sülfat (KS)		463.363 g/mol

3.2. Hidrojel Karakterizasyonunda Kullanılan Cihaz ve Aletler

3.2.1. FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) Spektrofotometre

Sentezlenen hidrojellerin kimyasal karakterizasyonu için FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Suda yıkama işleminde sonra iyice kurutulmuş hidrojeller analize gönderilmiştir. FTIR analizleri, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Fizikokimya laboratuvarında, bulunan Perkin Elmer FTIR Cihazı ile yapılmıştır, şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan FTIR cihazı

3.2.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-scanning electron microscope)



Şekil 3.2. Çalışma kapsamında kullanılan SEM cihazı

Hazırlanan hidrojenlerin yüzeysel görünümü için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. LEO Evo 40 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile farklı ölçekte görüntüleme tekniği ile analizi yapılmıştır (Şekil 3.2). SEM analizleri, İnönü Üniversitesinin Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi'nde (İBTAM) gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. (UV - VIS) Spektrofotometre

Hidrojenlerden KS salımında spektrofotometrik analizler için İBTAM Biyoloji Bölümü Genetik ve Mühendislik araştırma laboratuvarında bulunan Agilent Technologies Cary 60 markalı UV-Vis spektrofotometre kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan UV-Vis spektrofotometre cihazı

3.2.4. Kullanılan diğer cihaz ve aletler

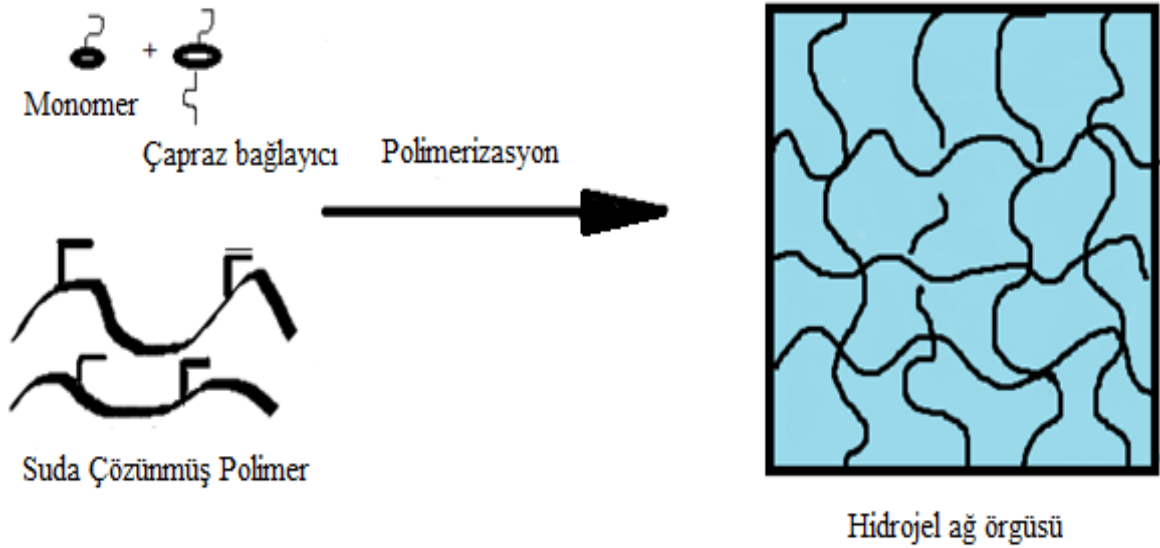
1. Etüv ES 252
2. Hassas Terazı RADVAG AS220. R2
3. pH Metre OHAUS ST 3100
4. Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı Biosan Intelli-Stirrer MSH-300i
5. Otomatik Pipetler

3.3. Deneysel Çalışmalar

Poliakrilamid ağ yapılı hidrojellerin hazırlanması için serbest radikalik polimerizasyon yöntemleri kullanılmıştır.

3.3.1. Poliakrilamid (PAM) bazlı hidrojellerin sentezi

Aak esaslı hidrojellerin sentezinde çapraz bağlayıcı olarak *N,N*-metilen bisakrilamid kullanılmıştır. Doğal polimer olan karboksimetil selüloz hidrojel sentezinde ilave edilmesi üzere %2'lik sulu çözeltisi kullanılmıştır. Sentez oda sıcaklığında başlatılmıştır, başlatıcı olarak %5 Potasyum Persülfat kullanılmıştır, hazırlanan numuneler etiketlenip, çapı 0,7 cm ve yüksekliği 0,3 cm olan özel petri kalıplarına doldurulmuştur, 60°C'lik etüvde bir saat karıştırılarak jelleşmesi sağlanmıştır. Hazırlanan hidrojel PAM olarak etiketlenip 10 gün boyunca distile suda yıkanarak tekrar kurutulmuştur.



Şekil 3.4. Şematize olarak hidrojel oluşumunun gösterimi

3.3.2. Farklı oranlarda Aak katkılı PAM hidrojellerinin sentezi

Farklı oranlarda eklenen Aak monomeri 5'li grup şeklinde sınıflandırılmıştır. PAM 1, PAM 2, PAM 3, PAM 4, PAM 5, şeklinde etiketlenmiştir. Sırası ile Aam: 0,5; 0,9; 0,13; 0,17; ve 1,3 gr olarak 1 mL saf suda çözülmüştür. Ağırlıkça %5, %10, %20, %30, %40 monomer çözeltiye eklenmiştir. Başlatıcı olarak % 5'lik 500 µL potasyum persülfat, çapraz bağlayıcı olarak %1'lik 600 µL *N,N*-metilen bisakrilamid eklenmiştir.

Hazırlanan çözeltiler 60°C etüvde petri kaplarına alınarak 1 saat jelleşmesi sağlanmıştır. Hazırlanan hidrojel bir hafta boyunca iyice kuruması için bekletilmiştir. Kuruyan hidrojel 10 gün boyunca distile suda yıkanarak tekrar kurutulmuştur.

3.3.3. Farklı oranlarda çapraz bağlayıcı katkıli hidrojel sentezi

Bu grupta Çapraz bağlayıcı *N,N*-metilen bisakrilamid (Ç.B), farklı oranlarda kullanılmıştır. Burada da 5'li grup şeklinde çözeltiler hazırlanmıştır. Diğer kimyasallar sabit tutulmuştur. 1gr Aak monomeri 1 mL suda çözülmüştür. %1'lik çapraz bağlayıcı sırası ile 200 µL, 400 µL, 600 µL, 800 µL, 1000 µL olarak kullanılmıştır. Başlatıcı olarak %5'lik 500 µl Amonyum Persülfat eklenmiştir. Hazırlanan çözeltiler PAM Ç.B1, PAM Ç.B2, PAM Ç.B3, PAM Ç.B4, PAM Ç.B5, şeklinde etiketlenerek petri kalıplarına eklenmiştir. 60°C'de 1 saat petri kaplarına alınan çözeltiler jelleşmesi için 100 rpm çalkalamalı etüvde bekletilmiştir. Hazırlanan hidrojel bir hafta boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan hidrojel 10 gün boyunca distile suda yıkanarak tekrar kurutulmuştur.

3.3.4. Farklı konsantrasyonlarda (KMS) katkıli hidrojel sentezi

Farklı oranlarda KMS kullanılarak hazırlanan hidrojelde diğer kimyasallar sabit tutulmuştur. 1 gr Aak monomeri 1 mL suda çözülmüştür. Başlatıcı olarak %5'lik 500 µL Potasyum Persülfat kullanılmıştır. %2'lik KMS çözeltisi farklı oranlarda çözeltilere eklenmiştir. Hazırlanan çözeltiler PAM KMS1, PAM KMS2, PAM KMS3, PAM KMS4, PAM KMS5 olarak etiketlenerek ayrılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak ise %1'lik 250 µL (Ç.B) eklenmiştir. Çözeltiler petri kaplarına döküldükten sonra 60°C 1 saat jelleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra jeller çıkartılarak 1 hafta boyunca kurutulmuştur. Kuruyan hidrojel, 10 gün boyunca distile suda yıkanarak tekrar kurutulmuştur.

3.3.5. Kondroitin sülfat katkıli hidrojel sentezi

Bu grupta çözelti hazırlanırken eklenen saf su yerine 1 mL çözücüye 0,1 gr KS eklenmiştir. 1 gr Aak 1 mL suda çözülmüştür. Sırası ile %5'lik başlatıcı 400 µL KPS, ve %1'lik 500 µL çapraz bağlayıcı Ç.B eklenmiştir. Hazırlanan çözeltiler petri kaplarına

aktarılmıştır. (PAM+ KS) şeklinde etiketlenerek jelleşmesi için 60 °C etüvde 1 saat bekletilmiştir. Jelleşen hidrojeller daha sonra bir hafta boyunca kurutulmuştur. Kuruyan hidrojeller, 10 gün boyunca distile suda yıkanarak tekrar kurutulmuştur.

3.3.6. Kondroitin sülfat ve karboksimetil selüloz katkılı hidrojellerin sentezi

1gr Aak monomeri 1 mL saf suda çözünmüştür. 1 mL saf suda 100 mg KS çözölmüştür. Aak çözeltisi ikinci çözeltiye eklenmiştir. Sırasıyla 400 µL KMS, 300 µL KPS, 250 µL Ç.B eklenmiştir. Hazırlanan çözelti PAM+KS+KMS şeklinde etiketlenerek petri kaplarına aktararak 60°C 100 rpm'de çalkalamalı etüvde 1 saat jelleşmesi için bekletilmiştir. Daha sonra hidrojellere bir hafta boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan hidrojeller 10 gün boyunca distile suda yıkanarak terar kurutulmuştur.

3.3.7. Farklı oranlarda kondroitin sülfat katkılı hidrojellerin hazırlanması

1 gr Aak monomeri 1 mL saf suda çözünmüştür. 1mL saf suda sırası ile 10 mg, 30 mg, 50 mg, 70 mg, 100 mg KS katkılı çözelti hazırlanmıştır. Aak çözeltisi hazırlanan her bir çözeltiye eklenmiştir. Karışıma sırası ile %5'lik 200 µL KPS başlatıcı, %2'lik 600 µL KMS, %1'lik 300 µL çapraz bağlayıcı eklenmiştir. Hazırlanan çözelti PAM KS1, PAM KS2, PAM KS3 şeklinde etiketlenerek, 60°C etüvde jelleşmeye bırakılmıştır. Daha sonra hidrojeller bir hafta boyunca iyice kuruması için bekletilmiştir. Kuruyan hidrojeller 0,1M pH 7.4 fosfat tamponunda ve 37°C sabit sıcaklıktaki, çalkalamalı inkübatörde (NÜVE ES-252 (K)) bekletilmiştir. Belirli aralıklarla çıkartılarak şişme dereceleri Denklem 2.1'e göre hesaplanmıştır. şişme derecesine olan etkisi gözlemlenmiştir.

3.3.8. Hidrojellerde şişme testlerinin uygulanması

Şişme testleri aldığımız referans (58)'e göre uygulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda monomer, çapraz bağlayıcı, ve kondroitin sülfat katkılı hidrojellerin dinamik şişme davranışları incelenmiştir. Bu amaçla ağırlığı bilinen kuru polimer hidrojel diskler 100 mL, 0.1 M NaCl ile ayarlanmış pH 7.4 fosfat tamponunda ve 37°C sabit sıcaklıktaki, çalkalamalı inkübatörde (NÜVE ES-252 (K)) bekletilmiştir. Belirli zaman aralıklarında çıkartılarak denge haline ulaşınca kadar hassas terazide

tartılmıştır. Tarttığımız bu hidrojel disklerin şişme dereceleri aşağıdaki denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır W_t değeri; hidrojin şişme derecesi olarak tanımlanmıştır.

$$W_t = [(W_t - W_0) / W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

- W_t herhangi bir t anındaki şişmiş hidrojin ağırlığı,

- W_0 ise başlangıçtaki kuru hidrojin ağırlığı.

Hesaplamalar sonucu her bir hidrojel örneği için hidrojin şişme derecesi olarak tanımlanan W_t değerinin zamana bağlı olarak değişim grafiği elde edilmiştir. Birinci grupta hidrojinler için çapraz bağlayıcı ve başlatıcı miktarı sabit tutularak 5'li grup şeklinde Aak miktarının artması ile şişme derecesine olan etkisi gözlemlenmiştir. İkinci grupta ise çapraz bağlayıcı başlatıcı ve monomer miktarı sabit tutularak 5'li grup şeklinde KMS'un şişme derecesine olan etkisi gözlemlenmiştir. Üçüncü grupta çapraz bağlayıcının şişme derecesine olan etkisi incelenmiştir. Dördüncü grupta ise değişen KS miktarının şişmeye olan etkisi gözlemlenmiştir.

3.3.9. Hidrojellerde Biyouyumluluk Deneyleri

3.3.9.1. Uygulaması yapılacak polimerlerin hazırlanması

Hazırlanan polimerlerden parçalar alınarak üzerine hücre kültürü için kullanılan besiyerinden (RPMI) 0,1 gr için 1 mL olacak şekilde eklenmiştir ve 72 saat boyunca %5 CO_2 , 37 °C inkübatörde inkübe edilmiştir.

3.3.9.2. Uygulaması yapılacak hücrelerin hazırlanması

Flask içinde %5 CO_2 , 37°C inkübatörde çoğaltılan hücreler tripsin yardımıyla kaldırılıp toplanmıştır ve hemostometre ile sayımı yapılmıştır. Sayımı yapılan hücreler her bir kuyucuk için 5000 hücre ve 100 µL besiyeri olacak şekilde 96'lık well plate'e ekilmiştir, 24 saat inkübe edilmiştir.

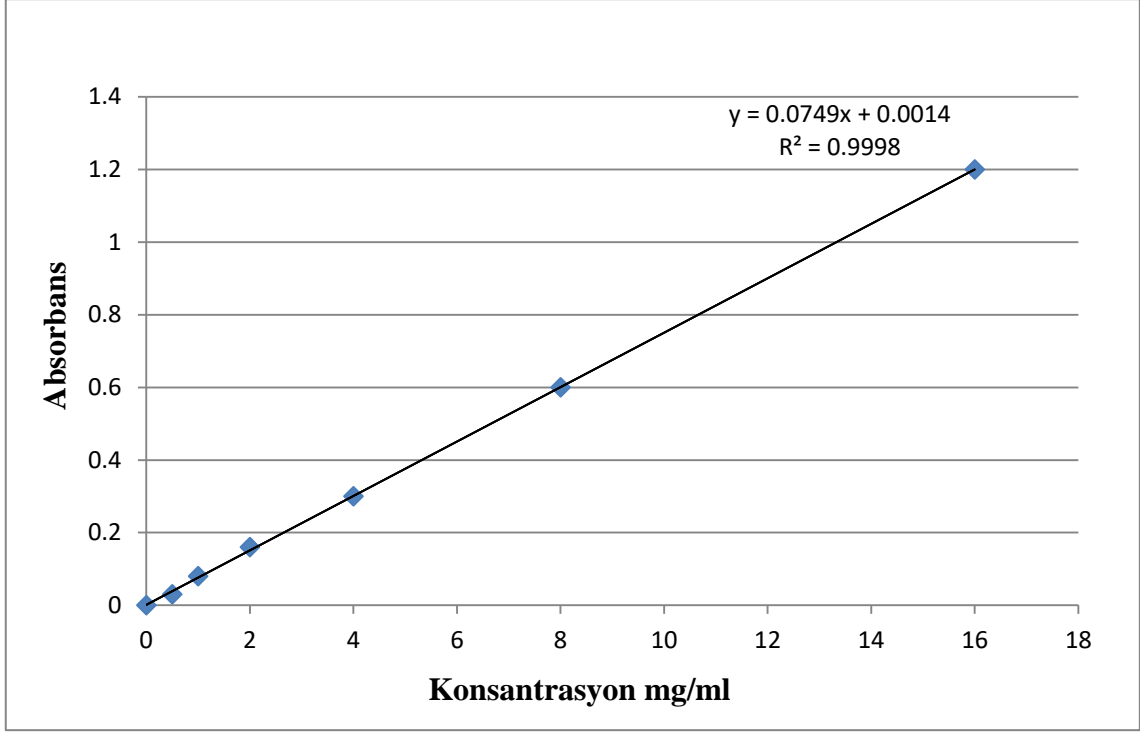
3.3.9.3. Trypan blue testleri

Flask içinde, %5'lik CO₂'li, 37°C'de nemli inkübatörde çoğaltılan hücrelerin kullandığı besiyeri pipet yardımıyla atılmıştır. Besiyeri kalıntısını temizlemek için flasklar PBS (Phosphate-Buffered Saline) tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra üzerine 75 cm²'lik flask için 5 mL tripsin ilave edilmiştir. 3 ile 5 dk arası inkübatörde bekletilmiştir. Flask zeminine yapışık halde olan hücreler yüzer hale geldiğinde, tripsin enzimini inhibe etmek için üzerine eklenen tripsin kadar besiyeri ilave edilmiştir (tripsin:besiyeri(1:1)). Ardından solüsyon 1500 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılmıştır. Pellet üzerine 10 mL besiyeri ilave edilerek thoma lamında canlı hücre sayımı trypan blue boyası ile yapılmıştır. 10000/ Hücre sayısı formülü ile elde edilen miktar µl cinsinden hazırlanan 10 mL'lik hücre solüsyonundan alınarak, her kuyucukta 2500 µL total hacim olacak şekilde 6 kuyucuklu plate ekimi yapılmıştır. 24 saat %5'lik CO₂ li, 37°C'de nemli inkübatörde bekletilmiştir. Ardından her kuyucuktan 1 ml besiyeri atılmış ve üzerine hazırlanan besiyeri-polimer solüsyonundan 1 ml ilave edilmiştir. 24 saat %5'lik CO₂'li, 37°C'de nemli inkübatörde bekletilmiştir. Bu işlemden sonra her kuyucuktaki solüsyon ve zemine yapışık halde olan hücreler tripsin yardımıyla zeminden kaldırılarak ayrı tüplere alınmıştır. 4000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılıp üzerine 100 µL PBS eklenmiştir. Her bir tüpe 5 µL trypan blue boyası ilave edilip 5 dk bekletilir, ardından thoma lamında canlı ve ölü hücre sayımı yapılmıştır.

3.3.10. İlaç salım deneyleri

3.3.10.1. KS ilaç aktif maddesinin kalibrasyon doğrusunun çizilmesi

KS ilaç aktif maddesinin kantitati analizini yapmak için Agilent Technologies Cary 60 marka UV-Vis spektrofotometre cihazı kullanılarak 210 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır. KS ilaç aktif maddesinin kalibrasyon grafiği Şekil 3.4'te, doğru denklemi ise $y = 0,0749x + 0,0014$ olarak bulunmuştur. Bu grafiğe ait R² değeri, 0.9998 olarak elde edilmiştir.



Şekil 3.5. KS ilaç aktif maddesinin kalibrasyon doğrusu

3.3.10.2. Hidrojellerden KS salımı

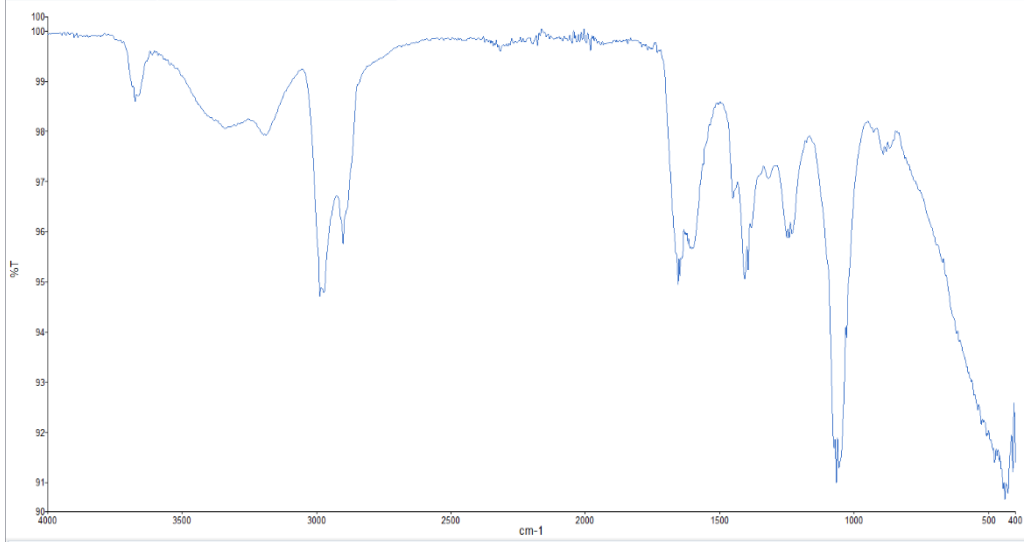
KS ile yüklü hidrojeller 50 mL pH 7,4'de tampon çözeltileri içerisine konulmuştur. Salım deneyleri için şişme değerinin en yüksek olduğu PAM KS3 hidrojelleri kullanılmıştır. 37°C'ye ayarlanmış etüv içerisine konulan bu çözeltilerden belirli zaman aralıklarında 3'er mL alınarak AgilentTechnologies Cary 60 marka UV-Vis-Spektrofotometre ile 24 saat boyunca ölçüm alınmıştır. Çözeltiden salınan KS miktarı, salınan KS miktarı / Yüklenen KS miktarı şeklinde hesaplanmıştır (59).

4. BULGULAR

İlgili tez kapsamında kondroitin sülfatsalımı sistemleri olarak kullanılabilen in situ olarak hazırlanmış yapı sentetik hidrojel sentezlenmiştir. Sentezlenen hidrojel yapılarında düzenli ve uygun salım düzeyinin elde edilebilmesi için kondroitin sülfat, akrilamid, çapraz bağlayıcı gibi temel bileşenlerin oranları değiştirilerek hidrojel yapısının gözenekliliği ve por dağılımı ayarlanmıştır. Ayrıca akrilamid'ten kaynaklı hızlı salım özelliğinin düzenlenmesi ve hidrojinin biyouyumluluk düzeyinin artırılması için bir parametre olarak karboksimetil selüloz farklı oranlarda hidrojel sentezinde kullanılmıştır. Elde edilen tüm hidrojinlerin FTIR, optik görüntüleri ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen polimerik yapıların yapısal çeşitliliğine bağlı olarak 4 temel grupta 18 farklı hidrojel yapı sentezlenmiş olup bu yapıların şişme özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. En yüksek şişme dercesine sahip hidrojinlerde salım özellikleri pH 7.4, 37°C'de gerçekleştirilmiştir.

4.1. PAM KS Hidrojinlerinin Yapısal Karakterizasyonu

Tez kapsamında sentezi gerçekleştirilen KS ve ağ yapılı poliakrilamid yapısının karakterizasyonu öncelikle FTIR spektrumu ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'deki spektrum yapısal olarak hem KS'an hemde poliakrilamid ana zincir yapısından kaynaklı pikleri net bir şekilde görmekteyiz. 3300-3650 cm^{-1} 'de KS yapısındaki serbest hidroksil gruplarına ait OH grubu H bağı gerilme titreşimlerini görmekteyiz. Yine KS yapısından kaynaklı C-O-C eterik gerilme titreşimi 1140 cm^{-1} ve 1075 cm^{-1} 'de eterik karbonil gerilme titreşimi eterik karbonil grubu 1820 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Ayrıca glikoz halkasından kaynaklı olarak 1026-1092 cm^{-1} 'de C-H gerilme titreşimlerini net bir şekilde görmekteyiz. Bu pikler yapılarındaki KS varlığını bize ıspatlamaktadır. Yine KS varlığının diğer ıspatı ise 1250 cm^{-1} 'deki S=O pikinin sülfat gruplarından kaynaklı olarak görülmesidir. Yapıdaki Aak kaynaklı gruplar ise 1285-1300 cm^{-1} civarındaki alifatik CH_2 gruplarından kaynaklı C-H titreşimi 1640 cm^{-1} 'deki amid grubu C=O gerilme titreşimi 1440 cm^{-1} 'deki alifatik C-C gerilme titreşimi bulunmaktadır (60).



Şekil 4.1. PAM KS hidrojelinin FTIR spektrumu

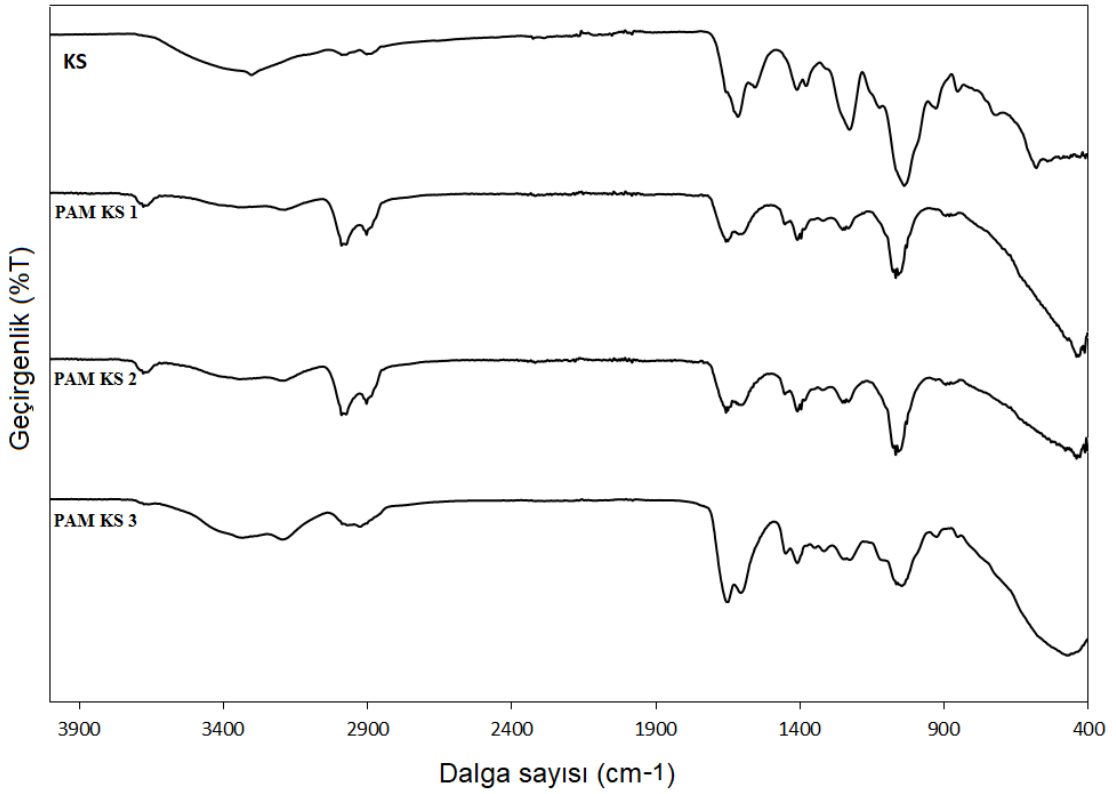
4.2. Farklı KS Oranlarında Hazırlanmış PAM KS Hidrojellerinin Yapısal Karakterizasyonu

PAM KS yapılarında KS etkinin hidrojel özelliklerinin üzerine etkisinin incelenmesi için KS oranı değiştirilerek %10 (PAM KS1), %20 (PAM KS2), %30 (PAM KS3), 3 farklı KS katkılı hidrojeller sentezlenmiştir. Bu hidrojellere ait genel fotoğraf, Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı oranlarda KS katkılı hidrojellerin görünümü

Bu şekilde KS oranı arttıkça hidrojellerin optik geçirgenliğinde ve yapısal özelliklerinde belirgin bir değişim görülmektedir. Ancak tüm hidrojeller parlak homojen ve optik geçirgenliği çok yüksek olacak şekilde elde edilmiştir. Bu fotoğraf istenilen polimerik yapının farklı KS oranlarında da arz edildiği şekilde elde edilebileceğini bize göstermiştir. Bu yapılara ait FTIR spektrumları Şekil 4.3’de görülmektedir. Bu şekilde oranı arttıkça KS kaynaklı olan S=O piki esterik karbonil piki ve C-O-C gerilme piki şiddetlerinin arttığı tespit edilmiştir. 1250 cm^{-1} ’de S=O piki sadece KS yapısında bulunduğu için oldukça belirleyici özellik göstermektedir 1820 cm^{-1} ’deki esterik karbonil piki ile beraber artan konsantrasyonda KS’in hidrojel yapısına dahil olduğunu bize ıspatlamaktadır.



Şekil 4.3. Farklı oranlı PAM KS hidrojellerinin FTIR görünümünün karşılaştırılması

4.3. Farklı Oranda Akrilamid İçeren Hidrojellerin Yapısal Karakterizasyonu

Hidrojel yapımızda Aak grubu zincir uzatıcı olarak görev yapmakta olup hidrojellerin por açıklıklarının genişlemesine sebep olmaktadır. Çalışma kapsamında farklı gözenek yapısında hidrojeller elde etmek için Aak oranı ağırlıkça değiştirilerek

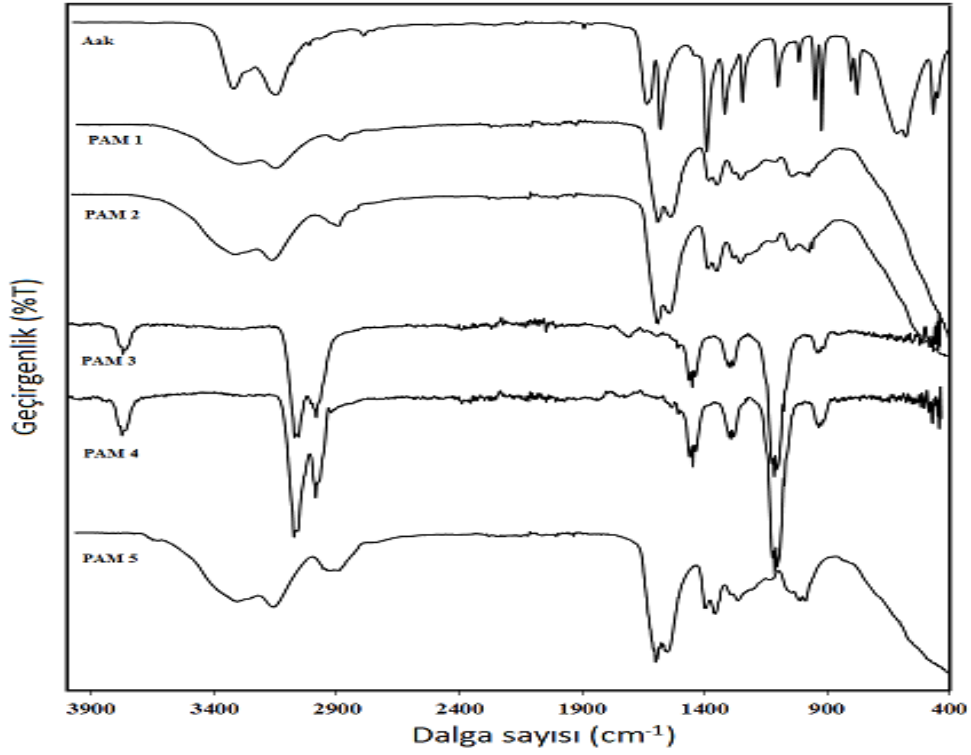
%5 (PAM1), %10 (PAM2), %20 (PAM3), %30 (PAM4), %40 (PAM5), 5 farklı Aak katkılı hidrojeller çalışılmıştır ve elde edilen hidrojel yapılarının fotoğrafları Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı oranlı PAM hidrojellerinin görünümü

Aak oranı arttıkça hidrojel yapısının sertliği artmakta ancak optik geçirgenlik ve yapısal bütünlük özellikleri aynı kalmaktadır. Sadece hidrojellerin daha sert ve daha sık yapılanmasına neden olmuştur. Bu hidrojel yapılarına ait FTIR spektrumları saf Aak monomer spektrumu ile birlikte kıyaslamalı olarak verilmiştir.

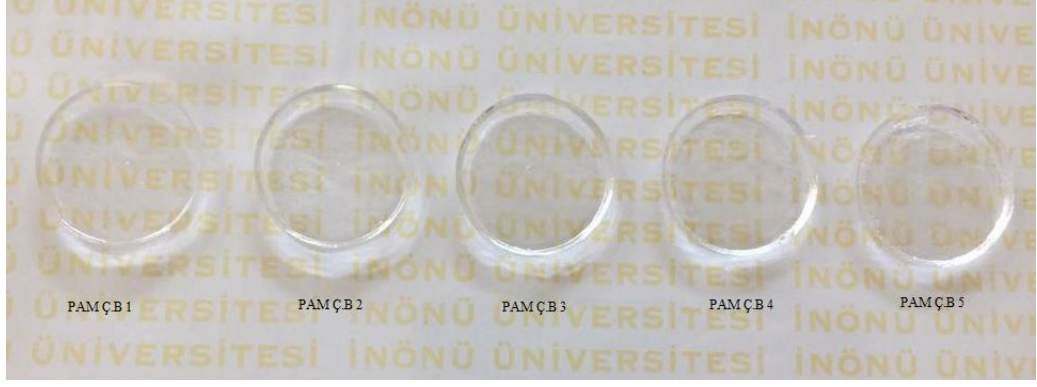
Bu spektrumlarda Aak oranı arttıkça akrilamid yapısından kaynaklı 1650 cm^{-1} deki amid karbonil ve 1140 cm^{-1} 'deki C-C gerilme titreşimleri artmıştır, ayrıca lineer polimer yapısındaki CH_2 gruplarına ait C-H gerilme titreşimlerinde $1850\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ 'de belirginleşmiştir. Bu bulgular yapıda planlandığı şekilde Aak oranlarının giderek arttığını göstermektedir.



Şekil 4.5. Farklı oranlı PAMhidrojellerinin FTIR görünümünün karşılaştırılması

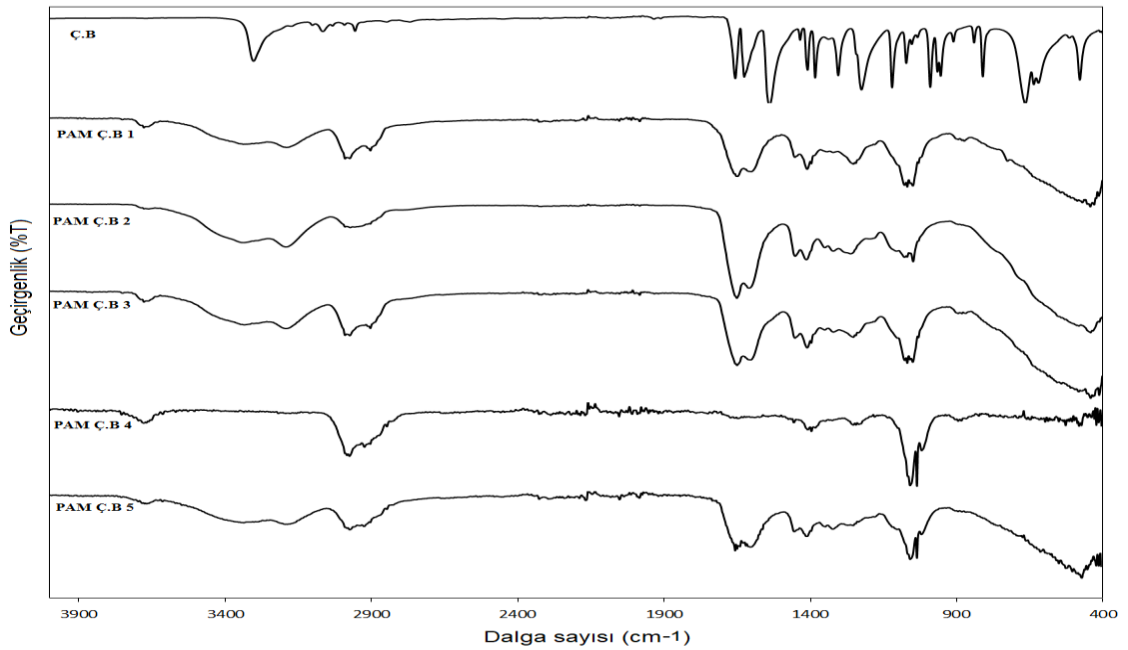
4.4. Farklı Oranlarda Ç.B Katkılı Hidrojellerin Yapısal Karakterizasyonu

Tez kapsamında KS salım özeliğinin yavaşlatılabilmesi ve daha uzun süreli bir salım periodu elde edilmesi için beş farklı Ç.B oranında %5 (PAM ÇB.1), %10 (PAM ÇB.2), %20 (PAM ÇB.3), %30 (PAM ÇB.4), %40 (PAM ÇB.5), şeklinde hidrojeller sentezlenmiştir. Bu hidrojellere ait fotoğraf görüntüleri Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı oranlarda Ç.B oranlı hidrojenlerin görünümü

Şekil 4.6'ya göre Ç.B oranı arttıkça hidrojenlerin yapısal sertliği ve yoğunluğu artmaktadır. Buna bağlı olarak optik geçirgenliği çok küçük bir oranda azalmakta ancak yüzey parlaklığı ve temel polimerik görünümü değişmektedir. Bu hidrojenlere ait FTIR spektrumları çapraz bağlayıcı olarak kullanılan *N,N*-metilen bisakrilamid'e ait FTIR spektrumu ile birlikte kıyaslamalı olarak Şek 4.7'de verilmiştir. Bu spektrumlarda artan metilen bis akrilamid oranına bağlı olarak 1650 cm^{-1} 'deki amid karbonil gerilme titreşimi ve 1440 cm^{-1} 'de amid 2 gerilme titreşimi artmaktadır. Artan yapısal sertlikle birlikte FTIR spektrumlarındaki bu değişim istenilen yapıların elde edildiğini bize ispatlamıştır.



Şekil 4.7. Farklı oranlarda PAM Ç.B hidrojenlerinin FTIR spektrumlarının görünümü

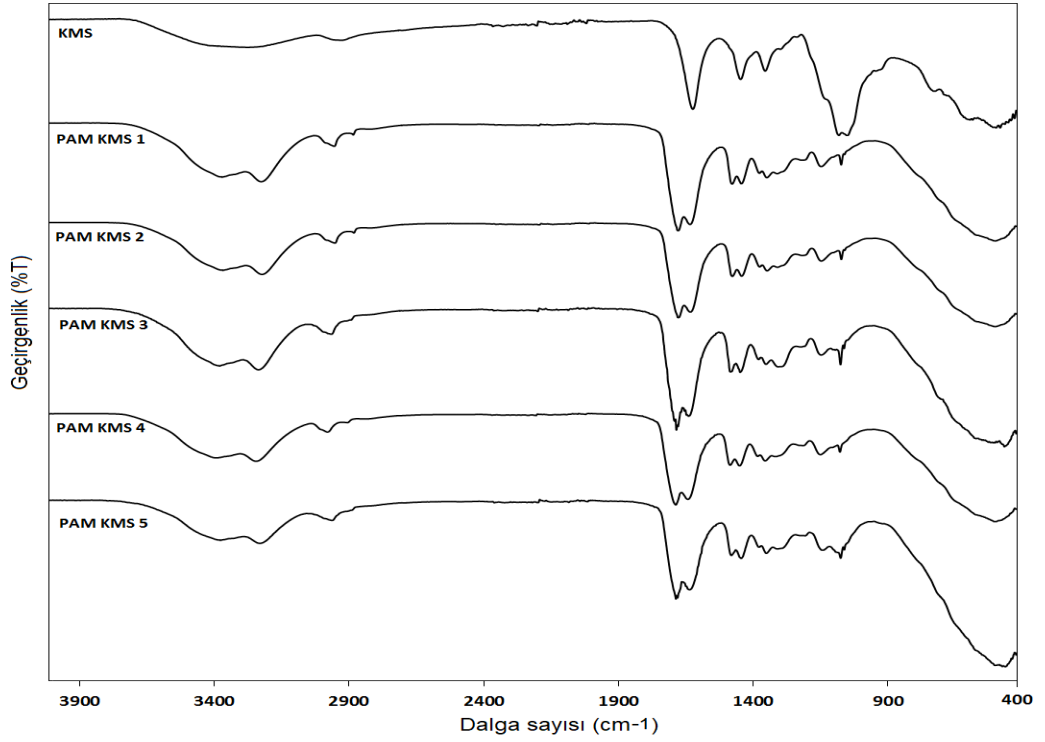
4.5. Farklı Oranlarda Sentezlenen PAM KMS Hidrojellerinin Yapısal Karakterizasyonu

Çalışma kapsamında elde edilen hidrojel yapıların biyouyumlulukla arttırılması temel amacı ile beş farklı oranda %10 (PAM KMS1), %20 (PAM KMS2), %30 (PAM KMS3), %40 (PAM KMS4), %50 (PAM KMS5), şeklinde KMS katkılı hidrojel yapıları elde edilmiştir. Bu katkı miktarı aynı zamanda hidrojel gözenek dağılımına ve yapısal özelliklerinede etki etmektedir. KMS miktarı arttıkça elde edilen hidrojellerin por miktarı artmakta aynı zamanda hidrofilik özelliğide büyümektedir. Bu yapılara ait fotoğraf görüntüleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Şekil 4.8’e göre KMS miktarı arttıkça elde edilen hidrojellerin optik geçirgenliklerinde çok az bir azalma meydana gelmiştir ancak yüzey özellikleri parlaklığı ve polimer bütünlüğü değişmiştir. KMS miktarının artması yapısal özelliklerinin ve yapısal kararlılığının artmasına neden olmuştur. Buda KMS’un bağlayıcı olarak rol aldığını bize ıspatlamaktadır.



Şekil 4.8. Farklı oranlarda KMS katkılı hidrojellerin görünümü

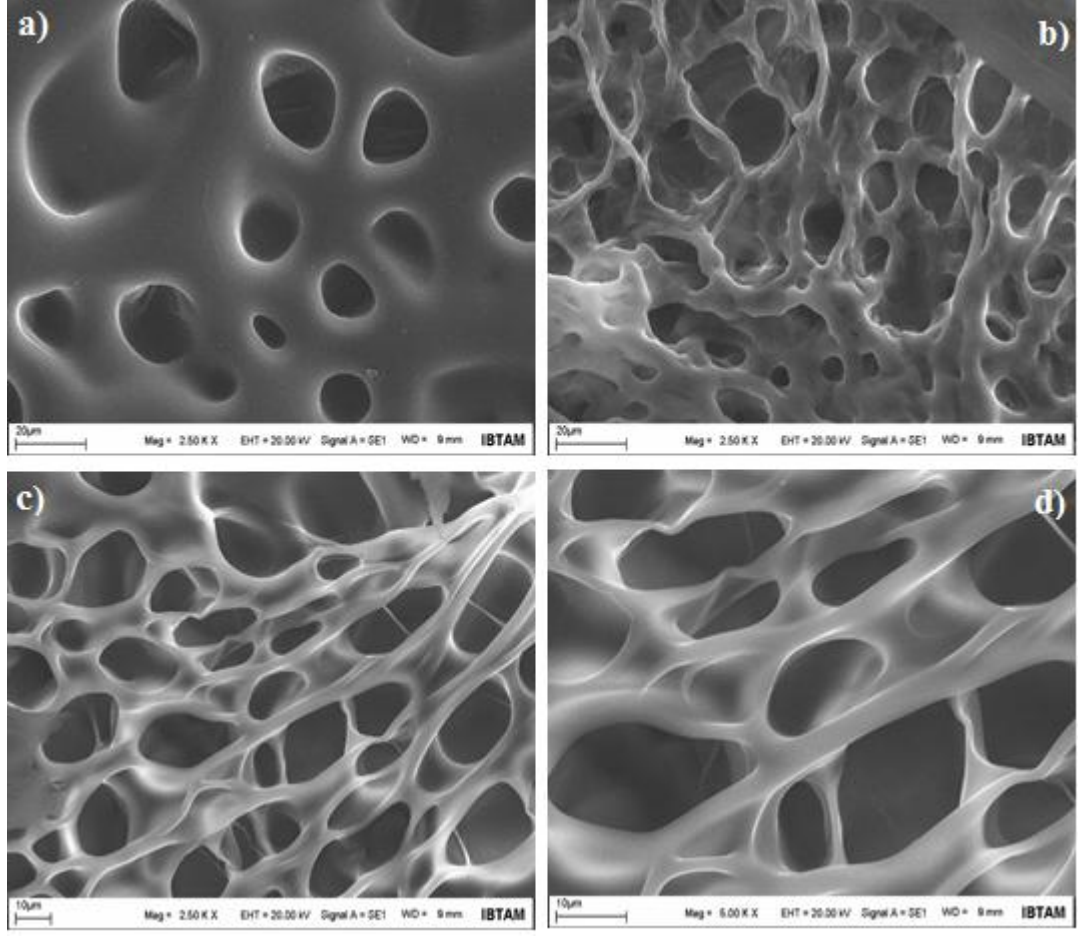
Bu özelliklerin ıspatında diğer bir önemli parametre ise FTIR spektrumdur. Artan KMS miktarına göre elde edilen hidrojellerin FTIR spektrumları Şekil 4.9’da verilmiştir. Bu spektrumda KMS miktarındaki artışa bağlı olarak C-O-C eterik gerilme titreşiminde bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca alifatik C-H gerilme titreşimleride bu yapıdan kaynaklı olarak artmaktadır.



Şekil 4.9. Artan KMS miktarına göre elde edilen hidrojenlerin FTIR spektrumları

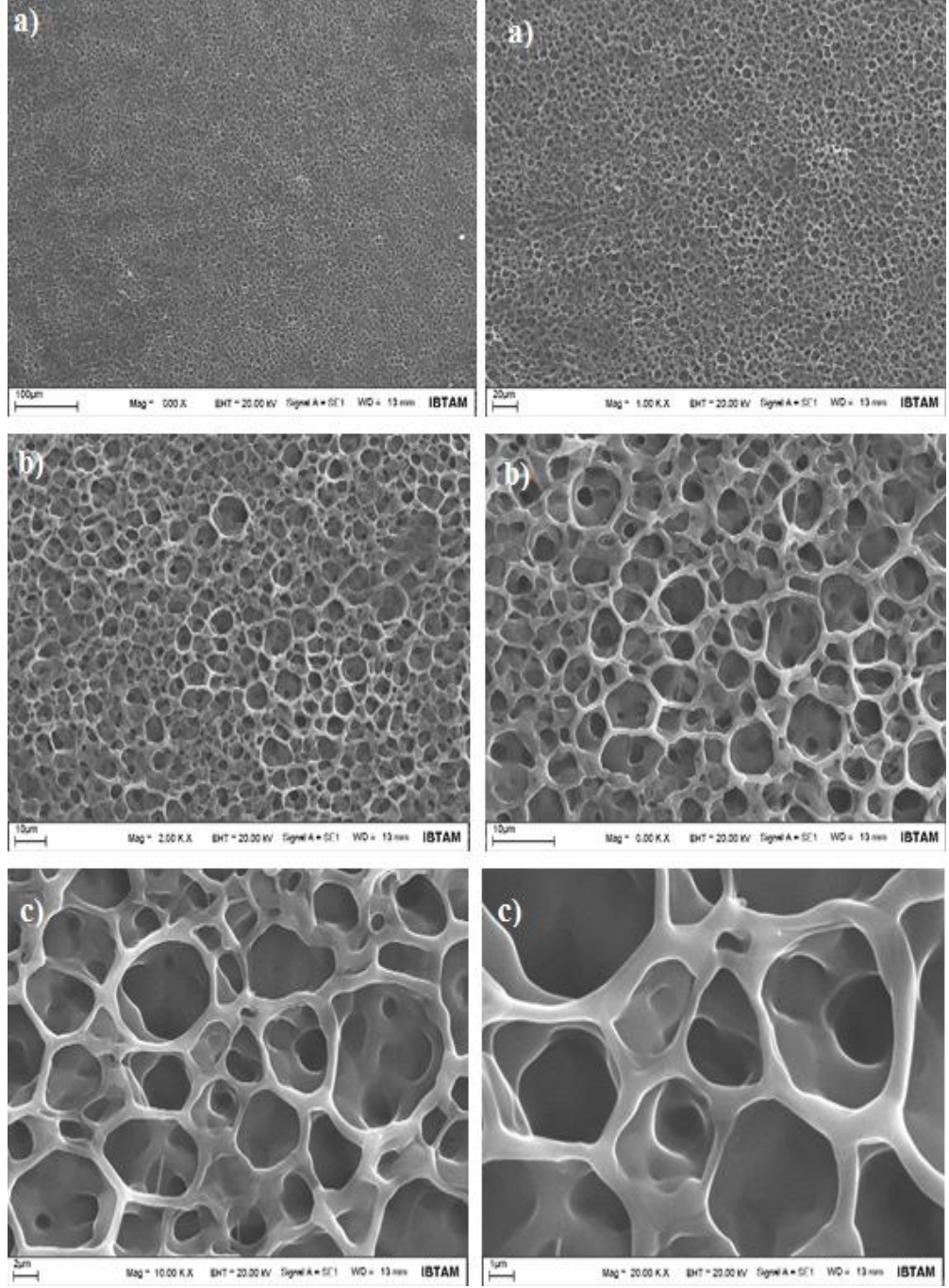
4.6. SEM Karakterizasyonları

Çalışma kapsamında elde edilen hidrojenlerin temel hidrojel görünümleri ve yüzey yapıları SEM analizi yapılarak belirlenmiştir. Bu analizlerde hidrojel yapısına ait Aak miktarı Ç.B, KS ve KMS etkileri genel olarak değerlendirilmiştir. Yapısal olarak yüzey görüntüleri Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de verilmiştir. Şekil 4.10’da Aak yapısı içeren hidrojenlerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir. Bu görüntülerde hidrojel yapısının çok büyük makro boşluklar içerdiği genel olarak hidrojel yapıları ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Yapısal olarak hidrojel yapısındaki poliakrilamid miktarı arttırıldıkça por yapısının genişlediği ve bu sonucun hidrojenlerin şişebilirliğini arttırdığı görülmüştür. Şekil 4.10’da Aak yapıları hidrojenlerin farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir.



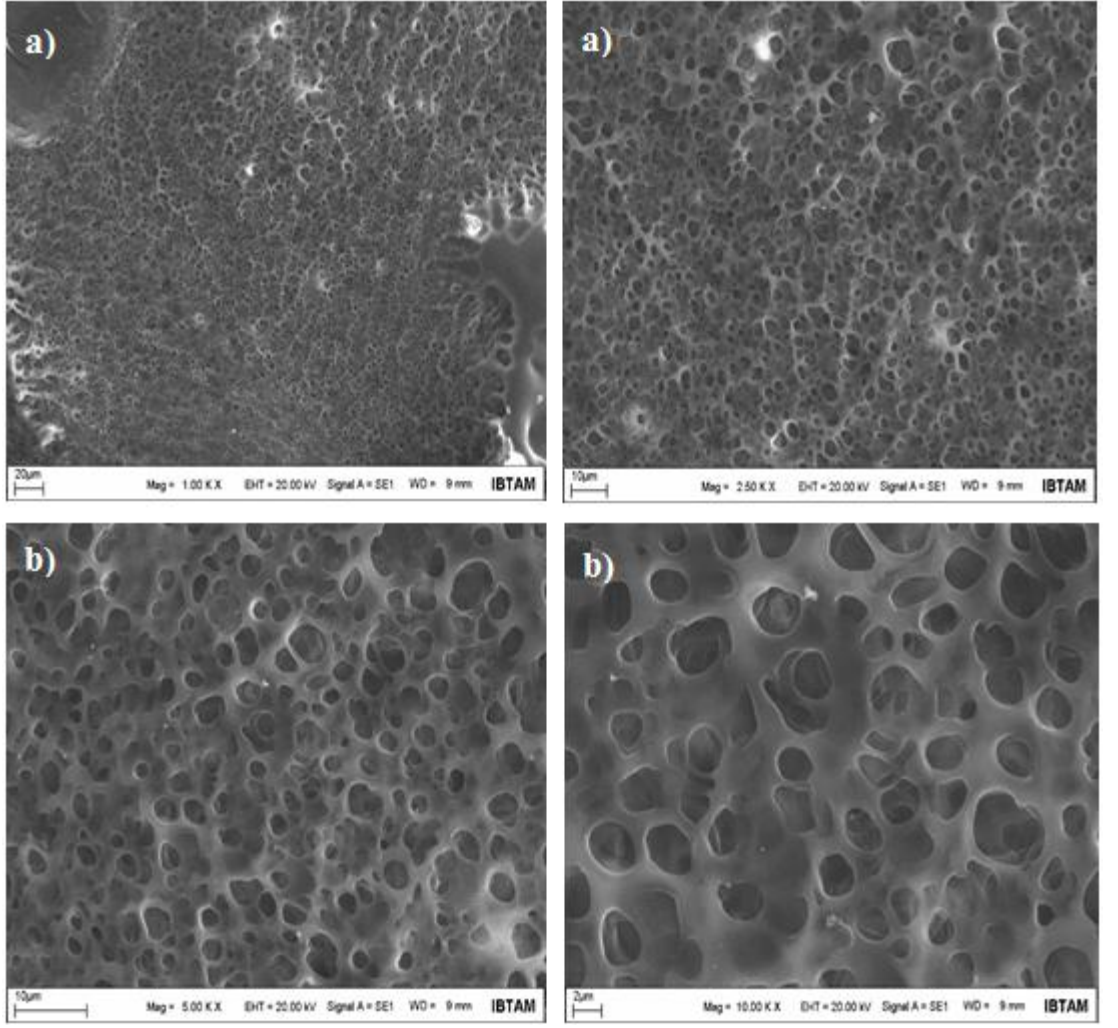
Şekil 4.10. Farklı oranlarda Aak katkılı a) PAM1, b) PAM2, c) PAM3, d) PAM4 hidrojenlerin SEM görüntüleri

Şekil 4.11’de KS miktarı artırılmış hidrojenlere ait SEM görüntülerini görmekteyiz. Bu görüntülerde KS miktarı arttıkça por yapısı ve por çeşitliliği değişmiştir. Özellikle daha fraktal bir por yapısı elde edilmiş olup porlar arasındaki mesafeler kısalmış daha elastik bir yapı elde edilmiştir



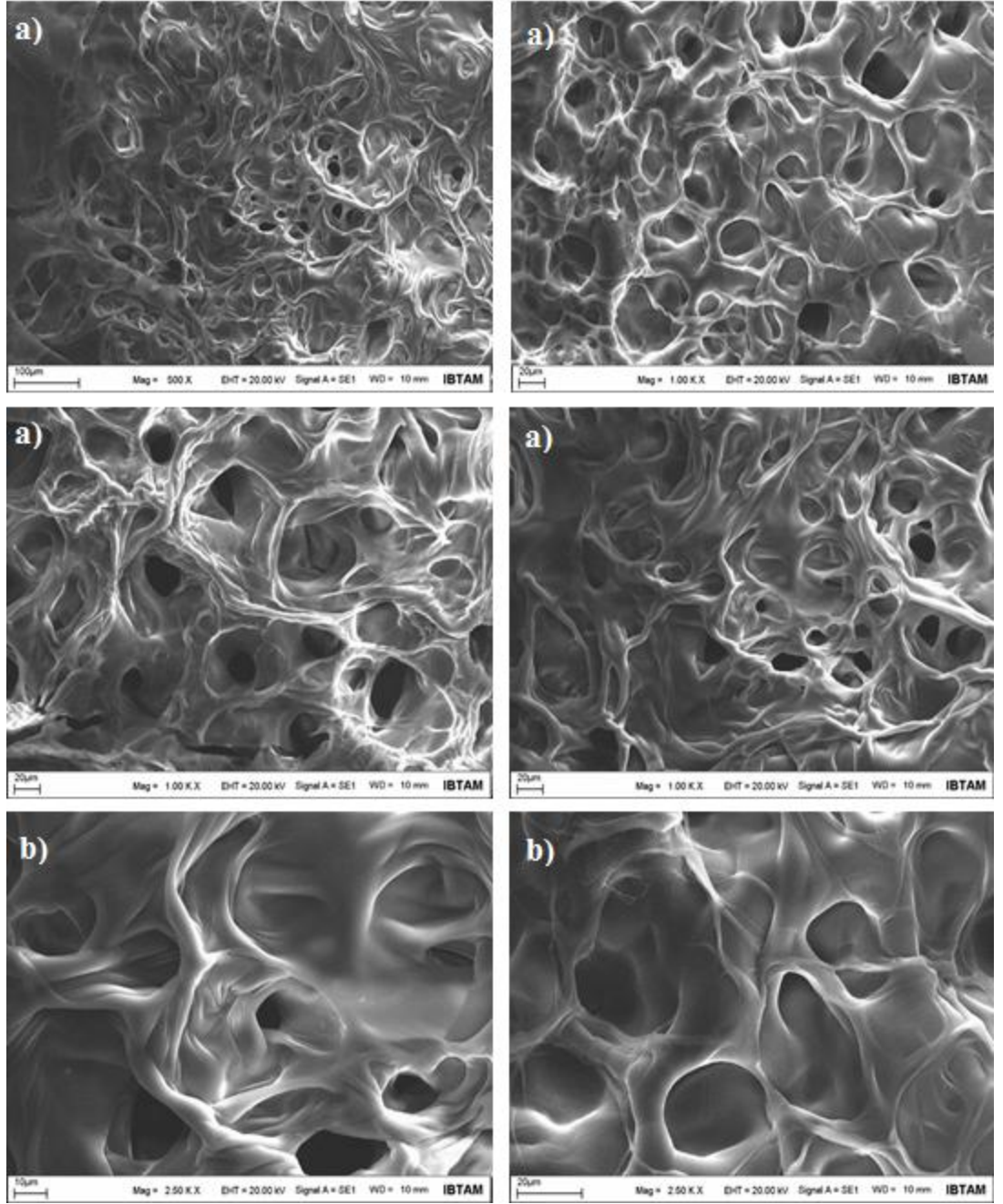
Şekil 4.11. Farklı oranlarda KS katkılı a) PAM KS1, b) PAM KS2, c) PAM KS3 hidrojenlerinin SEM görüntüleri

Şekil 4.12’de Ç.B oranı artırıldıkça elde edilen hidrojenlere ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir. Bu büyütmelelerde, por çapının küçüldüğü ancak por yapısının değişmediği görülmüştür. Hidrojel genel yapı ve özelliklerinin korunmuş olarak tespit edilmiştir, hatta çapraz bağlayıcı oranlarının en yüksek seviyede kullanıldığında por yapısındaki daralma oldukça artmıştır. Buna bağlı olarak hidrojenlerin şişme kapasitesi düşmektedir.



Şekil 4.12. Farklı oranlarda a) PAM Ç.B1, b) PAM Ç.B5 hidrojenlerinin SEM görüntüleri

Şekil 4.13’de KMS miktarı değiştirilerek elde edilen hidrojelere ait SEM görüntüleri verilmiştir. Bu görüntülerde por yapısının daraldığı ve yer yer por morfolojisininde değiştiği görülmüştür. Bu değişim KMS’un yapıya girdiğini ispatlamakta olup hidrojin şişme özelliklerindeki etkilemiştir. Hidrojellerin şişme özellikleri ise ayrıca şişme testleri ile belirlenmiş olup SEM görüntüleri ile uyumlu sonuç göstermiştir.

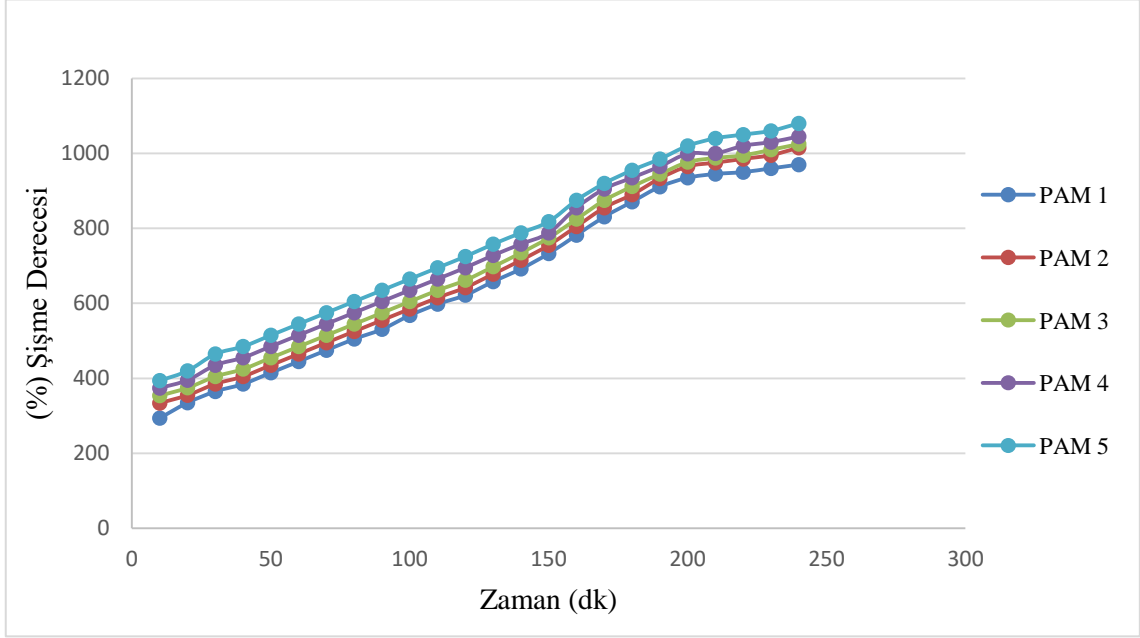


Şekil 4.13. Farklı oranlarda KMS katkılı a) PAM KMS1, b) PAM KMS5 hidrojenlerinin SEM görüntüleri

4.7. Hidrojellerin Şişme Test Sonuçları

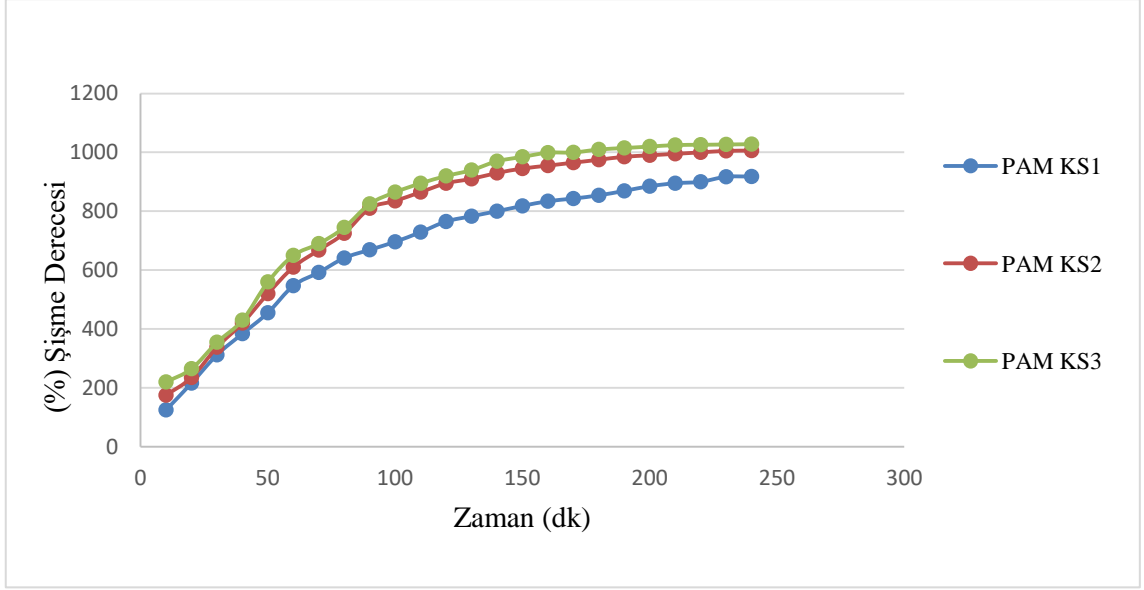
Çalışma kapsamında elde edilen tüm hidrojenlerin 37°C’de pH 7.4’deki şişme grafikleri alınarak şişme özellikleri tespit edilmiştir. Aak miktarı arttıkça elde edilen hidrojenlere ait şişme grafikleri Şekil 4.14’de verilmiş olup zamana bağlı % şişme dereceleri tüm hidrojenler için artan bir etki göstermiştir. En düşük Aak oranında 250

dakika içerisinde %975 olarak tespit edilmiş olmasına rağmen bu değer en yüksek Aak oranında %1300 değerine kadar çıkmıştır, buda Aak oranı arttıkça % şişme değerinin arttığını bize gösteren bir parametre olmuştur.



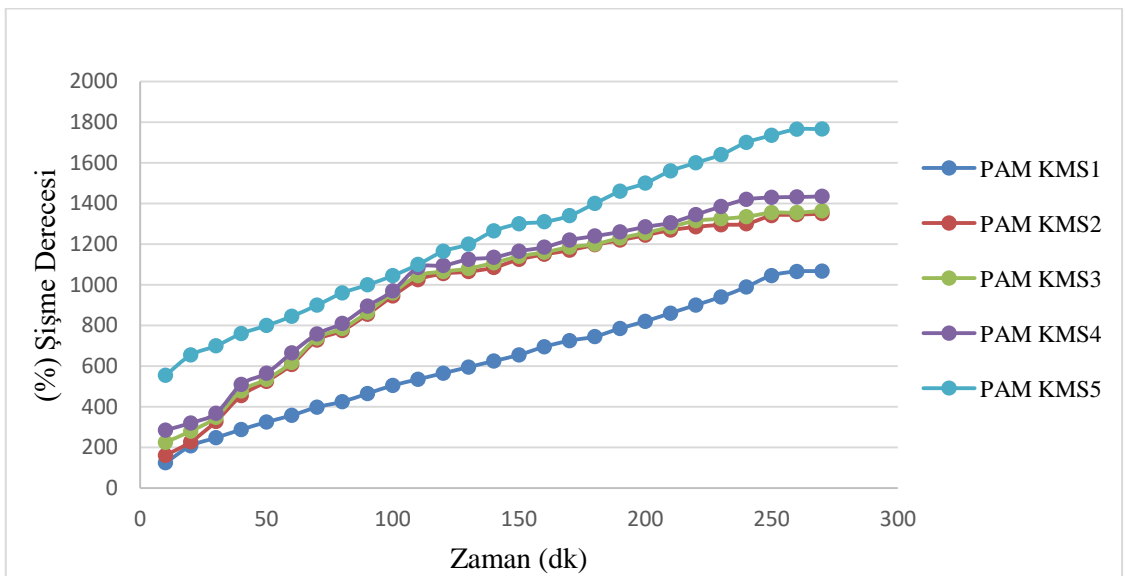
Şekil 4.14. Farklı oranlard Aak katkılı PAM hidrojenlerinin zamana karşı (%) Şişme Derecesi grafiği

Farklı oranda KS eklenerek sentezlenen hidrojenlerin yapısal şişme özellikleri Şekil 4.15’de verilmiştir. Bu şekilde KS miktarını arttırdıkça şişme değerinin belli bir değere doğru çıktığını görmekteyiz 250 dakika sonra en yüksek KS içeren hidrojenin şişme değeri %1000 kat olarak tespit edilmiştir.



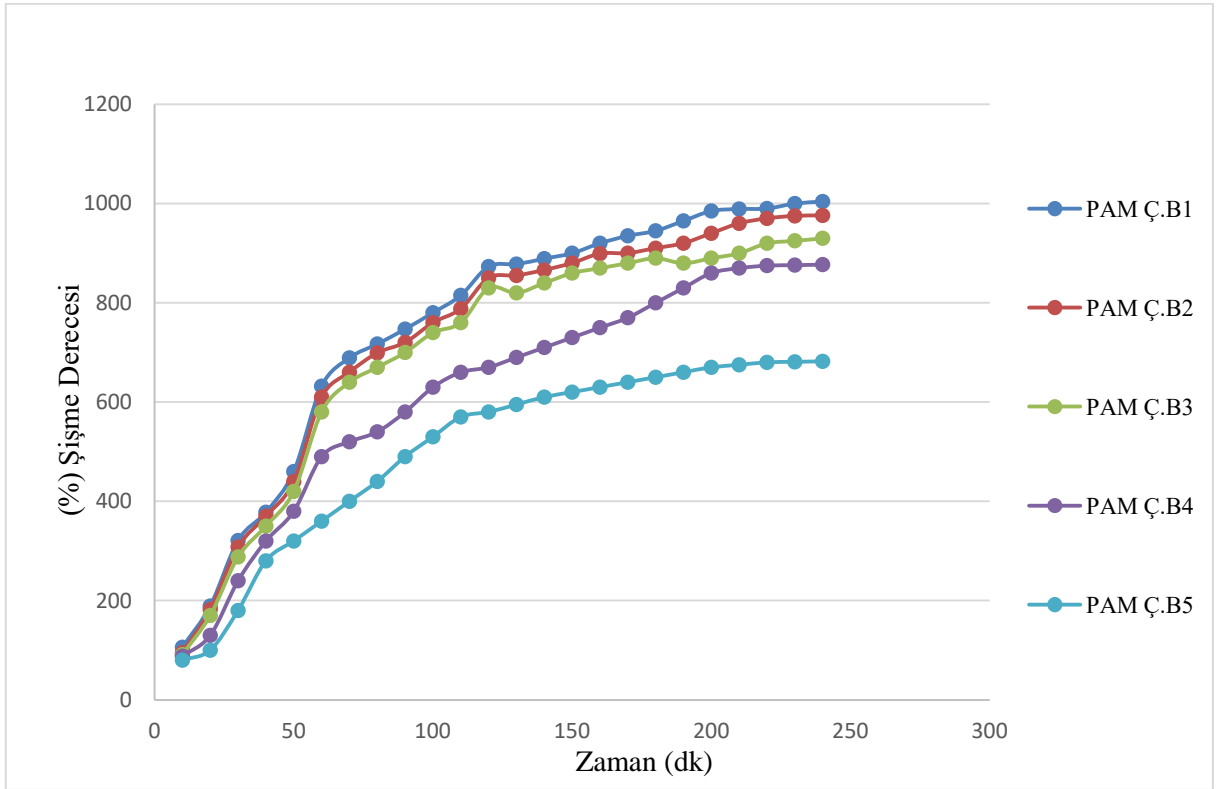
Şekil 4.15. Farklı oranlarda PAM KS hidrojenlerinin zamana karşı (%) Şişme Derecesi grafiği

Farklı oranda KMS katkıli hidrojenlerinin zamana karşı % şişme grafiğinde, KMS miktarı arttıkça şişme miktarının arttığı görülmektedir. Özellikle en yüksek oranlı KMS içeren hidrojenin şişme değeri %1780 civarında tespit edilmiştir, bu değeri elde edilmiş en yüksek şişme değeri. SEM görüntüleri ile birlikte incelendiğinde bu gözenekliliğin arttığı ve bu değeri makul olarak elde edildiği tespit edilmiştir.



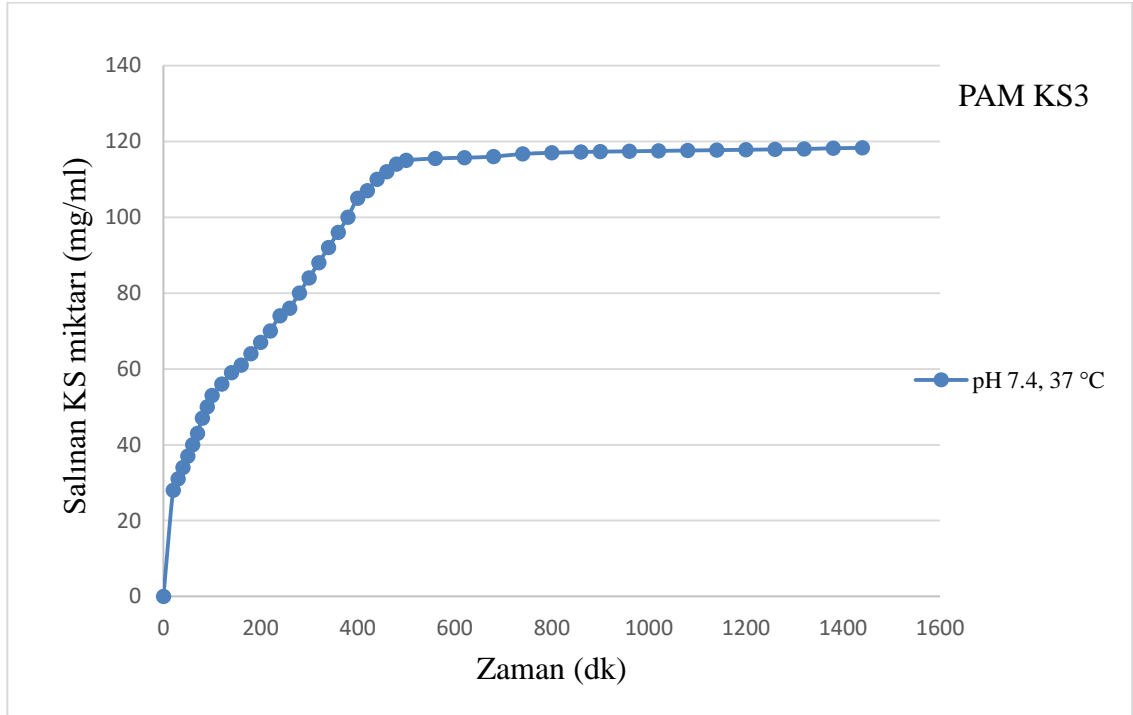
Şekil 4.16. Farklı oranlarda PAM KMS hidrojenlerinin zamana karşı (%) Şişme Derecesi grafiği

Çapraz bağlayıcının şişme değerleri üzerine olan etkisini incelemek için beş farklı Ç.B oranlı PAM Ç.B hidrojelleri hazırlanmıştır. Hazırlanan jellerin şişme değerleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Burada Ç.B oranı arttıkça hidrojellerin şişme değerinde dramatik bir düşüş tespit edilmiştir. Özellikle en yüksek Ç.B oranında şişme değeri yaklaşık 630 kata kadar düşmüştür.



Şekil 4.17. Farklı oranlarda PAM Ç.B hidrojellerinin zamana karşı (%) Şişme Derecesi grafiği

Salım çalışmalarından yola çıkarak en yüksek şişme verimliliği gösteren PAM KS grubundaki PAM KS3 hidrojelinin 37°C’de pH 7.4’deki salımı özelliği incelenmiştir.

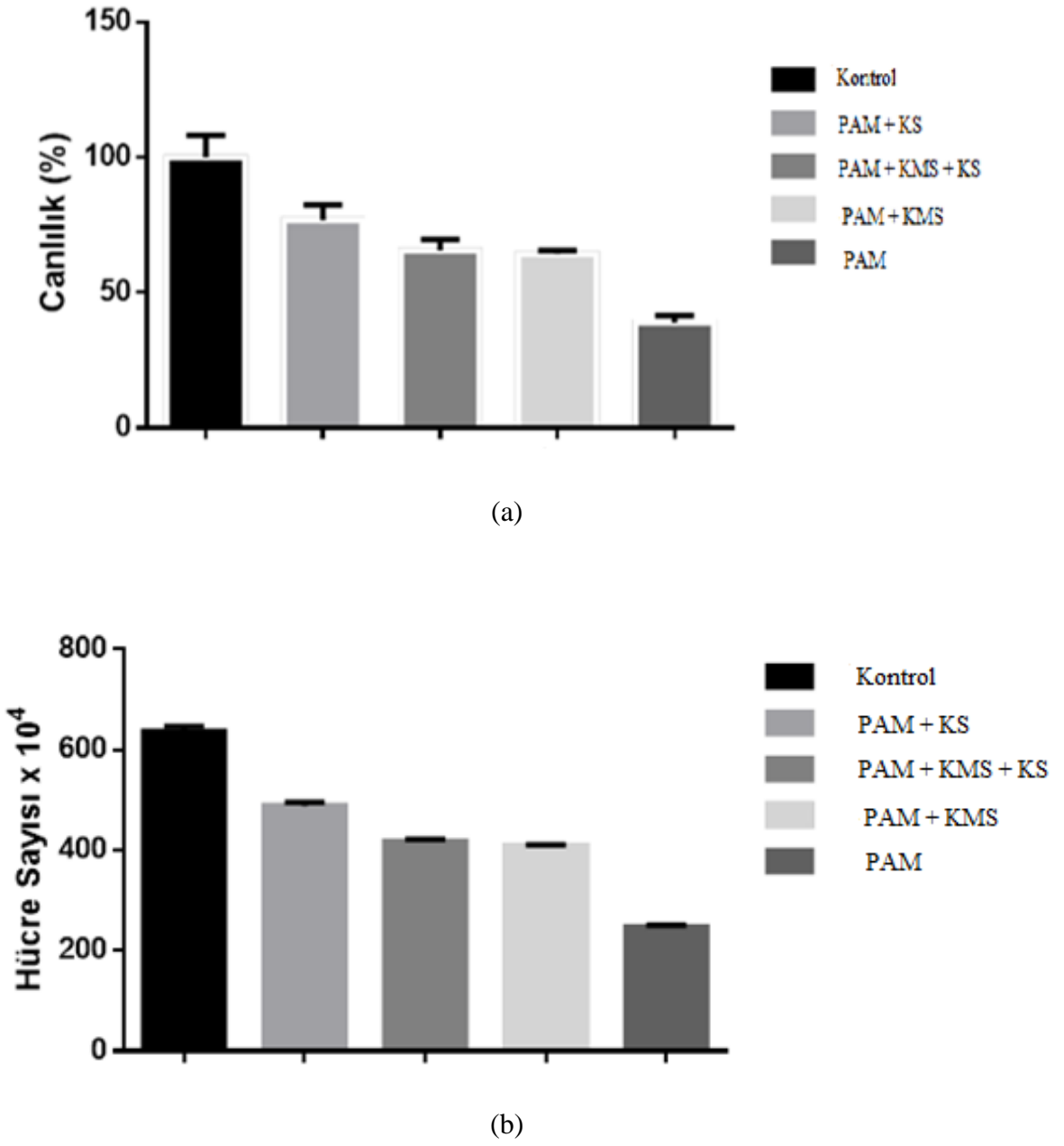


Şekil 4.18. PAM KS3 hidrojellerinin pH 7.4’de salım grafiği

Salım eğrileri incelediğinde asidik ve bazik ortamlarda başlangıçta salımların hızlı bir şekilde arttığı sonrasında ise salım hızında azalma olduğu gözlemlenmiştir.

4.8. Biyoyumluluk Testleri

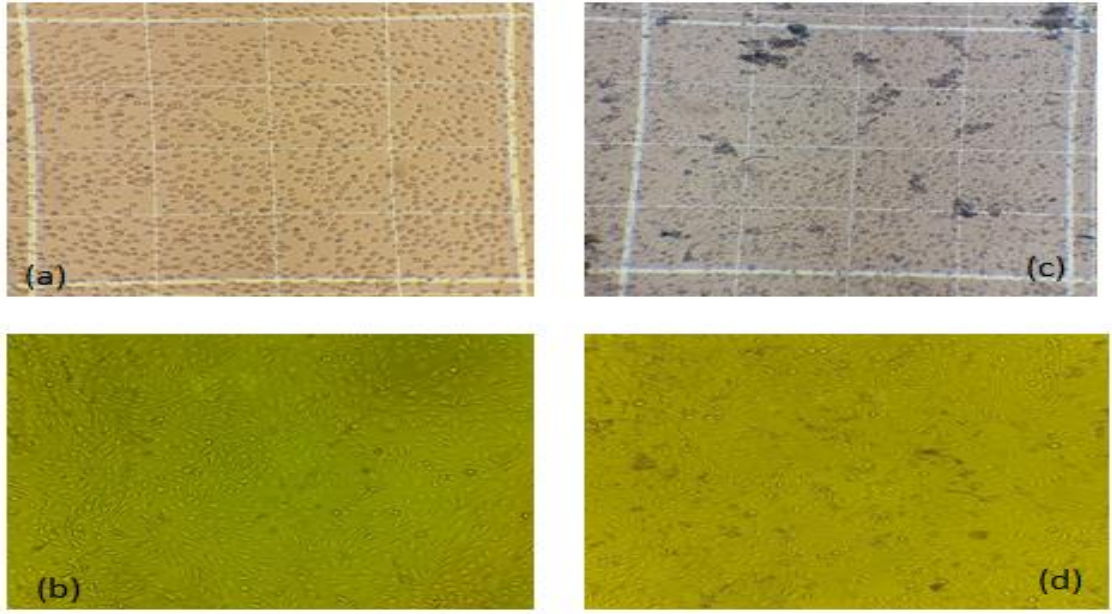
KS temelli hidrojellerin biyoyumluluk sonuçları, hazırlanan hidrojellerin morfolojik görünümleri, şişme kapasiteleri ve yapısal analizlerinden yola çıkarak her grup içerisinde en yüksek şişme değerinin elde edildiği konsantrasyonlarda biyoyumluluk testleri gerçekleştirilmiştir. Biyoyumluluk testleri ISO 10993-5 standartlarına göre in vitro olarak yapılmıştır. Trypan blue mikroskop görüntüleri sonuçları Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22’de, verilmiştir.



Şekil 4.19. Trypan blue sonuçları

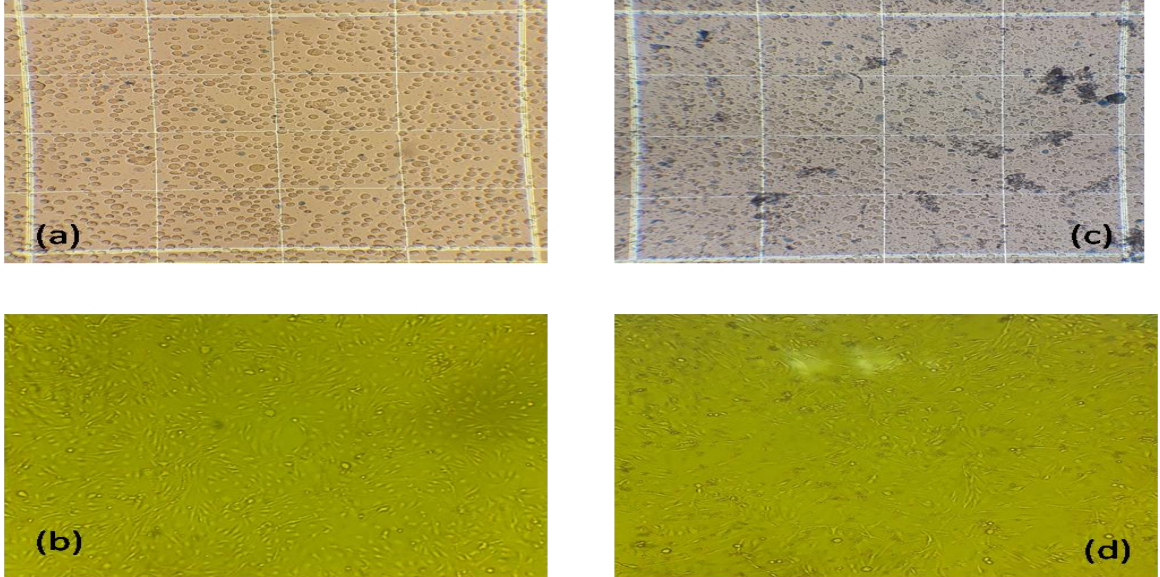
(a) canlılık %, (b) hücre sayısı

Kontrol grubuna kıyasla PAM KS hidrojelleri için %75, PAM + KMS+KS için %68, PAM KMS için %67, PAM hidrojeli için ise %42 olarak hücre canlılığı tespit edilmiştir.



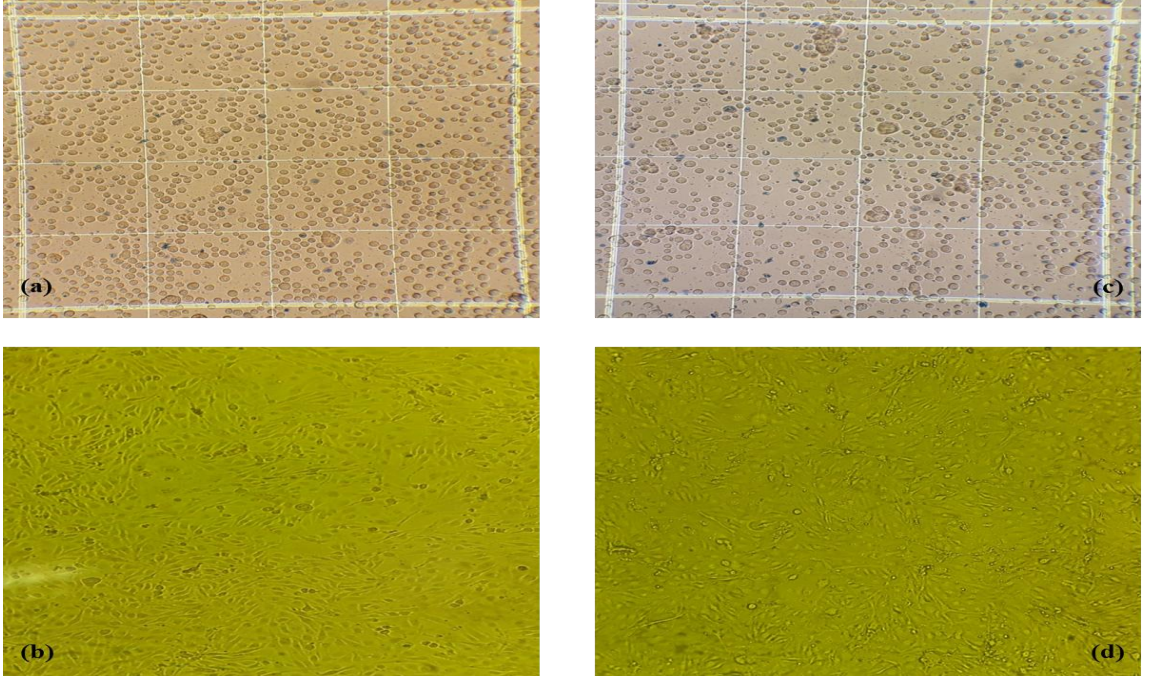
Şekil 4.20. PAM hidrojellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü

(a) Boyanmış kontrol, (b) boyanmamış kontrol,(c) boyandıktan sonraki görünümü, (d) boyanmadan önceki görünümü



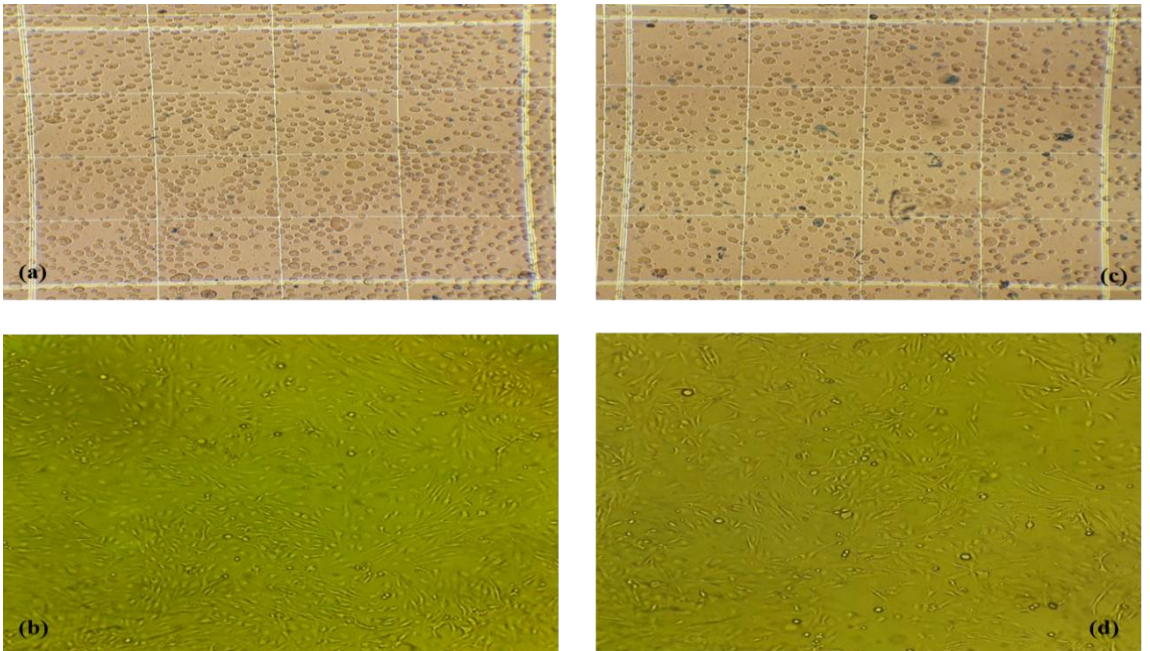
Şekil 4.21.PAM+KMS hidrojellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü

(a) Boyanmış kontrol, (b) boyanmamış kontrol, (c) boyandıktan sonraki görünümü, (d) boyanmadan önceki görünümü



Şekil 4.22.PAM+KMS + KS hidrojjellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü

(a) Boyanmış kontrol, (b) boyanmamış kontrol, (c) boyandıktan sonraki görünümü, (d) boyanmadan önceki görünümü



Şekil 4.23.PAM+KS hidrojjellerinin trypan blue ile boyanmadan ve boyandıktan sonraki mikroskop görünümü

(a) Boyanmış kontrol, (b) boyanmamış kontrol, (c) boyandıktan sonraki görünümü, (d) boyanmadan önceki görünümü

5. TARTIŞMA

Hidrojeller esnek yapıları ve değiştirilebilir özellikleri ile biyomedikal alanda oldukça önemli konuma sahiptirler. Özellikle doku destek malzemesi, ilaç salım sistemleri, biyomedikal sıvıların absorpsiyonu, yumuşak doku implantasyonu, yara örtüsü malzemeleri, biyosensör ve hücre destek sistemleri gibi pek çok güncel alanda kullanıma sahiptirler. Özellikle günümüzde önemi gittikçe artan doku mühendisliği alanında, vazgeçilmez malzemelerden biri konumuna gelmişlerdir. Doku mühendisliği alanında, yapay doku ve organların büyütülebilmesi için gözenekli doku iskeleleri olarak kullanılmaktadırlar. Ayrıca hidrojeller yumuşak lens veya doku kayıplarında ilgili boşlukların doldurulması maksadı ile yumuşak implantlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Cerrahi operasyonlar sırasında operasyon bölgesinin temizlenmesi ve vücut sıvılarının uzaklaştırılması için kullanılan hidrojeller bulunduğu gibi ani yaralanmalarda kan durdurucu hidrojellerin geliştirilmeside günümüzün popüler konuları arasındadır. Yine hidrojeller konusunda yara ve yanık örtüleri, geliştirilmeye açık bir konu olarak görülmektedir. Hidrojel temelli sensör ve biyosensörlerin geliştirilmesi ve ilaç salım sistemlerinin tasarlanması oldukça önemli ve güncel konular arasındadır. Bu maksatla yola çıkarak ilgili tez kapsamında yarı sentetik özelliklere sahip bir dizi hidrojel sentezlenmiştir. Temel uygulama noktası olarak KS salımı yapabilecek biyoyumlu hidrojellerin geliştirilmesi tezin odak noktasını oluşturmaktadır. Bu kapsam dahilinde dört grup şeklinde toplamda 18 farklı hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezi gerçekleştirilen hidrojellerin temel yapıları PAM, bis-akrilamid ve KS'an oluşmaktadır. Bu dört grup dahilindeki birinci grup olarak Aak miktarı değiştirilmiş ve artan Aak miktarına bağlı hidrojel özellikleri ile ilaç salım performansları değerlendirilmiştir. Buna göre özellikle şişme dereceleri dikkate alındığında artan PAM miktarına bağlı olarak polimerlerin 150 dakikadan sonra gözenek yapılarının genişlemesine bağlı olarak daha hızlı bir şişme trendi oluşturduğu görülmüştür. Şekil 4.14'de verilen bu şişme sonuçlarında akrilamid yapıları arttıkça şişme değerinin dahada yüksek elde edildiği görülmektedir. En düşük akrilamid miktarına oranla yaklaşık %200 miktarında bağlı olarak yaklaşık olarak %200 kat daha fazla şiştiği görülmektedir. İlaç salım çalışmaları bu verilerin doğru nitelik gösterirken bu sonucun en temel gerekçesi Şekil 4.12'deki SEM görüntülerinde hidrojellerin çok düşük büyütmelede bile homojen derin ve yaygın bir gözenekliliğe sahip olduğu açıkça görülebilmektedir.

Literatür açısından değerlendirildiği zaman sentezlenen PAM hidrojellerinin benzer gözenek yapısına sahip olduğu görülebilmektedir (61, 62, 63).

Bu sonuçlar göstermektedirki istenilen yapı ve sonuçlar literatür ile uyumludur. Tez kapsamında gerçekleştirilen ikinci grup hidrojellerde ise hidrojin gözenek yapısı açısından oldukça önem arz eden bir diğer önemli konu olan çapraz bağlayıcı oranı çalışılmıştır. Bu bağlamda beş farklı çapraz bağlayıcı oranı kullanılarak hidrojeller sentezlenmiştir. Ç.B oranı kullanılarak hidrojellerin öncelikle genel gözenek yapısı ve karakteristiği değişmekte ve bu nedenle hidrojin şişme değerleri ile salım özellikleri örtüşmektedir. Şekil 4.17’de görülen şişme sonuçları bu yorumu doğrulayacak şekilde elde edilmiştir. Özellikle Ç.B oranı en fazla olan hidrojelde en düşük şişme değeri elde edilmiştir. Bunun nedeni Ç.B ile birlikte gözenekler arasındaki boşlukların azalması ve azalan poroziteye bağlı olarak şişme özelliğinin düşmesidir. İlaç salım çalışmalarında da bu hidrojellerde daha düşük sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızın temel odak noktası KS salımını düzenli ve uzun süre sağlayabilen yapıları elde etmektir. Bu nedenle tez kapsamında KS salımını düzenlemek adına farklı KS oranları ile çalışarak hidrojel yapıları elde edilmiştir. Bu hidrojel yapıları göstermektedirki KS miktarı arttıkça hidrojellerin şişme değerlerinin yaklaşık 150 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle artan KS miktarına bağlı olarak hidrojellerin hidrofilitikliğinin artması ve bu artışta hidrojel yapısının su emme kapasitesinin artmasını sağlamasıdır. Şekil 4.15’de bu şişme değerleri grafiksel olarak verilmiştir. İlgili şekilde 100 dakikaya kadar düz ve lineer şekilde bir şişme, daha ileri sürelerde ise hidrojellerin şişme doygunluğuna ulaştığı görülmektedir. Bu teknolojik kullanım açısından uygun bir şişme davranışıdır.

Salım özellikleri açısından değerlendirildiğinde ise KS salımı iki kısımda değerlendirilmektedir. Birincisi hızlı salım: sentezlenen hidrojeller uygulandıkları dokuda hızlıca ihtiyaç duyulan KS salmalıdır. İkinci süreç ise zamanla uzun süreli salım sağlamalıdır. Elde edilen ilaç salım sonuçları bu bağlamda literatüre uyumlu ve düzenli salım göstermiştir (21). İlgili hidrojellerin SEM görüntüleri değerlendirildiğinde por yapıları ve por dağılımları bunların tüm yüzeye yayılmış olması istenilen uygun hidrojellerin sentezlendiğini bize ıspatlamaktadır. Dördüncü grup içerisinde ise hidrojellerin biyoyuyumluluğunun artırılması için KMS ve IPN formunda hidrojeller elde edilmiştir. Bu hidrojel yapılarında KS miktarı artırıldıkça hidrojin hidrofilitik

değeri de paralel olarak artmaktadır. Buna bağılı olarak hidrojel yapısının şişme değerleri diğeri hidrojellere bağılı olarak yüksek şişme oranları göstermektedir. En yüksek KS miktarında yaklaşık %1800 değerinde şişme elde edilmiş olup bu değer oldukça yüksek bir değer olarak görülmektedir. Ayrıca şişme hızında diğeri hidrojel yapılarında farklı olarak çok yüksek gözlenmiş ve doğrusal bir şişme eğrisi elde edilmiştir. Bu tip yapıların SEM görüntüleri incelendiğinde diğeri hidrojel yapılarından farklı olarak daha elastiki bir görüntü ortaya koymuştur. Buna rağmen biyouyumluluk değerlerinde beklenenin tersine PAM + KS ikili sistemine göre hücre canlılığı değerinde yaklaşık %10'luk bir düşüş görülmüştür, yinede PAM+ KS sistemi literatür açısından kabuledilebilir biyouyumluluğa sahiptir. Bu sonuç trypanblue sitotoksisite testleri ile doğrulanmış olup, kabuledilebilir yenilikçi bir hidrojel tasarımı olarak önerilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İlgili tez kapsamında tez öneri formun uygun olarak PAM, KS ve KMS kullanılarak farklı oranlarda 18 değişik yapıda hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu sentezler sonucunda elde edilen hidrojel yapıları gözenekli, hızlı şişebilen, hidrofilik ve biyouyumlu sistemlerdir. Yapısal olarak incelendiğinde literatüre orjinal yapı ve dizaynlar sunmaktadır, uygulama açısından ise KS ilaç salım sistemi olarak incelenmiş ve ilaç salım açısından uygun sonuçlar elde edilmiştir. Bu bağlamda elde edilen hidrojeller, gerek biyomedikal uygulamalarda KS salım yapabilecek gerek ilaç etkenlerini taşıyabilecek yapı ve uyuma sahiptir. Özellikle antibiyotik, analjezik, antipretik, antihelmetik ya da hormon benzeri ilaçları rahatlıkla salabileceği düşünülmektedir. Bu tip uygulamalarda da kullanılabilir. Tüm bu bulgular göstermektedir ki sentezi gerçekleştirilen hidrojel yapıları, biyouyumlu ve kararlı yapıları ile uygun gözenek boyut dağılımları açısından tez önerisinde ortaya sunulmuş olan hedeflere net olarak ulaşılmıştır ve pek çok biyomedikal uygulamalarda alternatif olarak değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. L. Doug et al., Controlled release of amylase from a thermal and pH- sensitive, macroporous hydrogel. *J. Control. Release*1992, 19: 171–8.
2. KASIM Z.D. Bentonit ve Sodyum Aljinat İçeren Yeni Akrilamid/Potasyum 3-Sülfopropil Metakrilat Hibrit Hidrojellerin Eldesi, Karakterizasyonu ve Biyopotansiyel Kullanım Kapasitelerinin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2016.
3. Zhijun Shi, Xing Gao, Muhammad Wajid Ullah, Sixiang Li, Qun Wang, Guang Yang. Electroconductive natural polymer-based hydrogels. *Biomaterials* 2016, 111: 40-54.
4. Xiaohong Hu, Dan Li, Feng Zhou, Changyou Gao. Biological hydrogel synthesized from hyaluronic acid, gelatin and chondroitin sulfate by click chemistry. *Acta Biomaterialia* 2011, 7: 1618–26.
5. Zhao Y, Xu Y, Zhang B, Wu X, Xu F, Liang W, Du X, Li R. In vivo generation of thick, vascularized hepatic tissue from collagen hydrogel-based hepatic units. *Tissue Eng., Part C* 2010, 16: 653 – 9.
6. SÖZMEN N N. Biyomedikal Uygulamalarında Akıllı Polimer Kullanılması ve Karakterizasyon Yönteminin Kuartz Kristal Mikro Dengeleyici Sistemler ile Geliştirilmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim dallı Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2008.
7. Wenqin He , Li Fu , Guoyun Li , J. Andrew Jones , Robert. Linhardt , Mattheos Koffas. Production of chondroitin in metabolically engineered E. Coli. *Metabolic Engineering*2015, 27: 92–100.
8. Volpi N, ed Quality of different chondroitin sulfate preparations in relation to their therapeutic activity. *Pharmacy and Pharmacology* 2009, 61: 1271–1280
9. Ozaltin K. LehockyM , Kucekova Z, Humpolicek P, Saha P. A novel multistep method for chondroitin sulphate immobilization and its interaction with fibroblast cells. *Materials Science and Engineering C* 2017, 70: 94–100.

10. M. Erik Gilbert, MD; Kelly R. Kirker, PhD; Steven D. Gray, MD; P. Daniel Ward, MD; Juliana G. Szakacs, MD; Glenn D. Prestwich, PhD; Richard R. Orlandi, MD. Chondroitin Sulfate Hydrogel and Wound Healing in Rabbit Maxillary Sinus Mucosa. *The Laryngoscope Lippincott Williams & Wilkins, Inc.* 2004, 114: 1406–09.
11. Sugahara K et al. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 13: 612–620.
12. Yamada S, Sugahara K. Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Curr Drug Discov Technol* 2008; 5: 289–301.
13. McAlindon TE et al. Glucosamine and chondroitin for treatment of osteoarthritis: a systematic quality assessment and meta-analysis. *Jama* 2000, 283: 1469–1475.
14. Volpi N, Maccari F. Two analytical approaches to the evaluation of chondroitin sulfate in European food supplements. *Separation Sci* 2009, 1: 22–28.
15. Todd R. Hoare, Daniel S. Kohane. Hydrogels in drug delivery: *Progress and Challenges. Polymer* 2008, 49: 1993-2007.
16. Uebelhart D. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16: S19–S21.
17. Özer H, Taşkesen A, Kul O, Selek HY, Turanlı S, Köse K. Glukozamin Kondroitin Sülfatın Onarılmış Tenotomize Sıçan Aşıl Tendonları Üzerine Etkisi. *Eklem Hastalık Cerrahisi* 2011, 22(2): 100-6.
18. Arti Vashist, Atul Vashist, Y. K. Gupta and Sharif Ahmad. Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. *J. Mater. Chem. B*, 2014, 2: 147-166.
19. Gilbert ME, Kirker KR, Gray SD, Ward PD, Szakacs JG, Prestwich GD, Orlandi RR. Chondroitin Sulfate Hydrogel and Wound Healing in Rabbit Maxillary Sinus Mucosa. *Laryngoscope* 2004, 114:1406–1409.
20. SÖZMEN N N. Biyomedikal Uygulamalarında Akıllı Polimer Kullanılması ve Karakterizasyon Yönteminin Kuartz Kristal Mikro Dengeleyici Sistemler ile

Geliştirilmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Anabilim dallı Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Başkent Üniversitesi, 2008

21. BRAHIMA S. pH ve Sıcaklığa Duyarlı Hidrojellerin Sentezlenmesi ve İlaç Salım Davranışlarının modellenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2016.
22. Sudipto K. De, N. R. Aluru, Member, IEEE, B. Johnson, W. C. Crone, David J. Beebe, Member, IEEE, and J. Moore. Equilibrium Swelling and Kinetics of pH-Responsive Hydrogels: Models, Experiments, and Simulations. *Journal of Microelectromechanical Systems* 2002, VOL. 11, NO. 5.
23. Hu X, Li D, Zhou F, Gao C. Biological hydrogel synthesized from hyaluronic acid, gelatin and chondroitin sulfate by click chemistry. *Acta Biomaterialia* 2010, 7(4): 1618-26.
24. SOP. E. S. Doku Genişletme Amaçlı Hidrojel Sentezi, Karakterizasyonu ve Şişme Kinetiği. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2013.
25. C. C. Lin, and A. T. Metters. Hydrogels in controlled release formulation: network design and mathematical modeling. *Advanced drug delivery reviews* 2006, 58 (12-13): 1379–408.
26. Akira Watarai, Lucas Schirmer, Stephan Thönes, Uwe Freudenberg, Carsten Werner, Jan C. Simon , Ulf Anderegg. TGFb functionalized starPEG-heparin hydrogels modulate human dermal fibroblast growth and differentiation. *Acta Biomaterialia* 2015, 25: 65–75.
27. Ryan A. McBath and Devon A. Shipp. Swelling and Degradation of Hydrogels Synthesized with Degradable Poly(b-amino ester) Crosslinkers. *Polymer Chemistry* 2010, 1: 860-5.
28. Maziyar M. Khansari , Lioudmila V. Sorokina, Prithviraj Mukherjee, Farrukh Mukhtar, Mostafa Rezazadeh Shirdar, Mahnaz Shahidi, and Tolou Shokuhfar. Classification of Hydrogels Based on Their Source: *A Review and Application in Stem Cell Regulation. JOM* 2017, 69: 1340–1347.

29. KART. Y.S. Hidrojeller ve Uygulama Alanları. *İnovatif Kimya Dergisi* 2015, 26: 7-15.
30. KASIM Z.D. Bentonit ve Sodyum Aljinat İçeren Yeni Akrilamid/Potasyum 3-Sülfopropil Metakrilat Hibrit Hidrojellerin Eldesi, Karakterizasyonu ve Biyopotansiyel Kullanım Kapasitelerinin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2016.
31. Brahimas, Boztepe C, Kunkul A, Yuceer M. Modeling of drug release behavior of pH and temperature sensitive poly(NIPAAm-co-AAc) IPN hydrogels using response surface methodology and artificial neural networks. *Materials Science and Engineering* 2017, C 75: 425–432.
32. Li Cui , Junfang Jia, Yi Guo, Yun Liu, Ping Zhu. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. *Carbohydrate Polymers* 2014, 99: 31–38
33. TAŞDELEN B, KORUYUCU A. Biyomedikal Alanda Kullanılmak Üzere Sıcaklık ve pH'a Duyarlı Akıllı Kompozit Hidrojellerin Sentezi, Karakterizasyonu, ve İlaç Salım Davranışlarının İncelenmesi. NKUBAP.00.17.AR.14.14. <http://hdl.handle.net/20.500.11776/23>
34. W.EHennink, CFvan Nostrum. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54: 13–36.
35. F. J. Xu, Q. J. Cai, E. T. Kang, and K. G. Neoh. Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization from Halogen-Terminated Si(111) (Si-X, X = Cl, Br) Surfaces for the Preparation of Well-Defined Polymer-Si Hybrids. *Langmuir* 2005, 21: 3221-3225
36. DURMAZ SEZGİNGİL S, OKAY O. Çözelti içinde çapraz bağlanabilen poli(izobutilen) esaslı jeller. *İtüdergisi/c fen bilimleri* 2005, Cilt:3, Sayı:1, 51-58
37. DURUKAN HB. Kimyasal Çapraz Bağlı Akrilamid/Sitrakonik Asit/Sodyum Akrilat Terpolimerlerinin Hazırlanışı, Karakterizasyonu ve Soğurum Özelliklerinin Araştırılması. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2007.

38. W. Musial, J. Pluta and J. Michalek. Thermosensitive microgels of poly-N-isopropylacrylamide for drug carriers-practical approach to synthesis. *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug research* 2015, 72: 409-22.
39. Ayhan H, Ayhan F. Photocrosslinked poly(ethylen glycol) hydrogels for controlled drug delivery. *Turkish Journal of Biochemistry* 2014; 39(4):403–15.
40. Issa Katime, Eduardo Mendizábal. Swelling Properties of New Hydrogels Based on the Dimethyl Amino Ethyl Acrylate Methyl Chloride Quaternary Salt with Acrylic Acid and 2-Methylene Butane-1,4-Dioic Acid Monomers in Aqueous Solutions. *Materials Sciences and Applications* 2010, 1: 162-7.
41. M.E. Byrne, K. Park, N.A. Peppas, Molecular imprinting within hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, 54: 149-161.
42. D. J. McClements. Recent progress in hydrogel delivery systems for improving nutraceutical bioavailability. *Journal of Food Science* 2015, 80: 1602-10.
43. Monalisha Boruah, Pronob Gogoi, Ajay Kumar Manhar, Momina Khannam, Manabendra Mandal and Swapan Kumar Dolui. Biocompatible carboxymethylcellulose-gpoly(acrylic acid)/OMMT nanocomposite hydrogel for in vitro release of vitamin B₁₂. *RSC Adv* 2014, 4: 43865–43873.
44. Piyush Gupta, Kavita Vermani and Sanjay Garg. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today* 2002, 7: 569-79.
45. Fan H. B., Hu Y. Y. & Li X. S. Experimental study on gelatin-chondroitin sulfate-sodium hyaluronate tri-copolymer as novel scaffolds for cartilage tissue engineering. *Chinese* 2016,30(4):499-503.
46. Xiaohong Hu, Dan Li, Feng Zhou, Changyou Gao. Biological hydrogel synthesized from hyaluronic acid, gelatin and chondroitin sulfate by click chemistry. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7: 1618–1626.
47. Y. Brudno, E. A. Silva, C. J. Kearney, S. A. Lewin, A. Miller, K. D. Martinick, M. Aizenberg, D. J. Mooney. Refilling drug delivery depots through the blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, 111(35):12722-7
48. Jasmine P. J. Wu, Bill Cheng, Steve R. Roffler, David J. Lundy, Christopher Y. T. Yen, Peilin Chen, James J. Lai, Suzie H. Pun, Patrick S. Stayton, Patrick C.

- H. Hsieh. Reloadable multidrug capturing delivery system for targeted ischemic disease treatment. *Science Translational Medicine* 2016, 365, 160.
49. Masaki Nakahata , Yoshinori Takashima, Hiroyasu Yamaguchi1 & Akira Harada. Redox-responsive self-healing materials formed from host–guest polymers. *Nature Communications* 2011, | DOI: 10.1038/ncomms1521.
50. Z. Wei , JH Yang , ZQ Liu , F. Xu , JX Zhou , M. Zrínyi , Y. Osada , YM Chen . Novel Biocompatible Polysaccharide-Based Self-Healing Hydrogel. *Adv. Funct. Mater* 2015, 25: 1352–1359.
51. Pan G, Kurumada KI, Yamada Y. Application of hydrogel for the removal of pollutant phenol in water. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 2008, 39: 361-366
52. Can HK, Kirci B, Kavlak S, Guner A. Removal of some textile dyes from aqueous solutions by poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/K₂S₂O₈ hydrogels. *Radiation Physics and Chemistry* 2003, 68: 811
53. Dadhaniya PV, Patel MP, Patel RG. Removal of anionic dyes from aqueous solution using poly [N-vinyl pyrrolidone/2-(methacryloyloxyethyl) trimethyl ammonium chloride] superswelling hydrogels. *Polym. Bull.* 2007, 58: 359–369.
54. L. Doug et al., Controlled release of amylase from a thermal and pH- sensitive, macroporous hydrogel. *J. Control. Release* 1992, 19: 171–178.
55. S. Z. Song, S. H. Kim, J. R. Cardinal & S. W. Kim. Progestin permeation through polymer membranes, V. Progesterone release from monolithic hydrogel devices. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1981, 70:216-219.
56. S. W. Kim, Y. H. Bae, & T. Okano. Hydrogels: swelling, Drug Loading and Release, *Pharmaceutical Research* 1992, 9: 283-290.
57. N. Zuhail (2008). Invers-Süspansiyon Polimerizasyon Yöntemiyle Hazırlanan Mikrokürelerin Karakterizasyonu ve İlaç Salınımı Çalışmaları. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye, 2008
58. Uebelhart D. Clinical review of chondroitin sulfate in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008,16: S19–S21.

59. Ayhan H, Ayhan F. Photocrosslinked poly(ethylen glycol) hydrogels for controlled drug delivery. *Turkish Journal of Biochemistry* 2014; 39(4):403–415.
60. ERDİK E. *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, 5. Baskı. İstanbul, Gazi Kitabevi, 2009: 118.
61. Erdener Karadaş, Dursun Saraydın, Salih Cetinkayat and Olgun Güven. In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels. *Biomaterials* 1996, 17: 67-70.
62. A.KBajpaiAnjaliGiri. Water sorption behaviour of highly swelling (carboxy methylcellulose-g-polyacrylamide) hydrogels and release of potassium nitrate as agrochemical. *Carbohydrate Polymers* 2003, 53 (3): 271-9.
63. A. Martinez-Ruvalcaba, J. C. Sanchez-Diaz, F. Becerra, L. E. Cruz-Barba, A. Gonzalez-Alvarez. Swelling characterization and drug delivery kinetics of polyacrylamide-co-itaconic acid/chitosan hydrogels. *eXPRESS Polymer Letters* 3 (1): 2009 25–32.