

**KİTOSAN-POLİ(AKRİLİK ASİT)-POLİ(AKRİLAMİT) İÇEREN IPN TİPİ  
HİDROJELLERİN ŞİŞME DAVRANIŞLARI VE YARA İYİLEŞMESİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Nur TAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2008  
ANKARA**

Nur TAN tarafından hazırlanan KİTOSAN-POLİ(AKRİLİK ASİT)-POLİ(AKRİLAMİT) İÇEREN IPN TİPİ HİDROJELLERİN ŞİŞME DAVRANIŞLARI VE YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mehlika PULAT

.....

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy çokluğu ile Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil İbrahim Ünal

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üni.

Prof. Dr. Mehlika PULAT

.....

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üni.

Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

.....

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Hacettepe Üni.

Tarih : 16/07/2008

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Nur TAN

**KİTOSAN-POLİ(AKRİLİK ASİT)-POLİ(AKRİLAMİT) İÇEREN IPN TİPİ  
HİDROJELLERİN ŞİŞME DAVRANIŞLARI VE YARA İYİLEŞMESİNE  
ETKİSİNİN İNCELENMESİ  
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Nur TAN**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Temmuz 2008**

**ÖZET**

Sunulan çalışmada, çeşitli bileşimlerde akrilik asit (AA), akrilamit (AAM) ve kitosan (CS) polimerlerini içeren iç içe geçmiş ağ yapıdaki (IPN) hidrojeller hazırlandı. Başlatıcı olarak amonyum persülfat / sodyummetabisülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  /  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) redoks çifti seçildi ve hidrojeller serbest radikal polimerleşmesi ile sentezlendi. Çapraz bağlayıcı olarak sabit miktarlarda etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), tam-IPN hidrojeller için ayrıca değişen miktarlarda glutaraldehit (GA) kullanıldı. Üretilen hidrojellerin şişme davranışları değişen süreye, sıcaklığa ve pH'a karşı incelendi. Tüm hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla arttığı ve yaklaşık 30 saat sonra dengeye ulaştığı gözlemlendi. Yarı-IPN tipi hidrojellere bakıldığında AA içeren hidrojellerin AAM içeren hidrojellerden daha fazla şiştiği saptandı. Ayrıca AA içeren hidrojellerden tam-IPN tipi hidrojellerin yarı-IPN hidrojellere göre daha fazla şiştiği saptandı. CS miktarının değiştirilmesiyle % şişme değerlerinde önemli miktarda değişme görülmedi. 37 °C ve pH=7,4 de en çok şişen hidrojin kitosan-poli(akrilik asit) tam IPN-2 [(CS-PAA)<sub>T-2</sub>] olduğu bulundu.

Çalışmanın ikinci kısmında; Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) yüklü kitosan-poli(akrilik asit) yarı IPN-2 [(CS-PAA)<sub>Y</sub>-2], kitosan-poli(akrilamid) yarı IPN-2 [(CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2] ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerinin yara iyileşmesine etkisi L929 fare fibroblast hücreleri ile incelendi. EGF'nin yüklenmesi emdirme yöntemiyle gerçekleştirildi. Sadece EGF yüklü (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojel için tatminkar sonuçlar sağlandı. Optik mikroskop incelemelerinden zamanla hücrelerin artan bir şekilde fibroblastik morfolojilerini oluşturarak yüzeye yapışıp yayıldıkları gözlemlendi.

Çalışmanın son kısmında ise Piperasilin/Tazobactam (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerine emdirme yöntemiyle yüklendi. Piperasilin/Tazobactam yüklü hidrojellerden salım pH=7,4 ve 37 °C de UV spektrofotometresi ile takip edildi. (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin diğer yüklü hidrojellere nazaran Piperasilin/Tazobactam'ı daha uzun sürede saldığı gözlemlendi. Kinetik verilerden tüm hidrojeller için 0. derece salım gerçekleştiği gözlemlendi. En hızlı salım yapan (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojelinin difüzyon katsayısı (D)  $3,53 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  olarak hesaplandı.

**Bilim Kodu** : 201.1.117

**Anahtar Kelimeler** : Hidrojel, IPN, akrilik asit, akrilamid, kitosan, EGF, Piperasilin/Tazobactam

**Sayfa Adedi** : 105

**Tez Yöneticisi** : Prof. Dr. Mehlika Pulat

**INVESTIGATION OF SWELLING BEHAVIORS AND EFFECT OF WOUND  
HEALING OF IPN TYPE HDROGELS INCLUDING CHITOSAN-  
POLY(ACRYLIC ACID) AND POLY(ACRYLAMIDE)  
(M. Sc. Thesis)**

**Nur TAN**

**GAZI UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY  
July 2008**

**ABSTRACT**

In this study, interpenetrating network (IPN) type hydrogels at various compositions of acrylic acid (AA), acrylamid (AAm) and chitosan (CS) polymers were prepared. Ammonium persulfate / sodium metabisulfide ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  /  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  redox pair was selected as initiator, and the hydrogels were synthesized by free radical polymerization. A certain amount of ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) for semi-IPN, and additionally variable amounts of glutaraldehyde for the full-IPN hydrogels were used as crosslinking agents. Swelling behaviors of the hydrogels were investigated by changing time, temperature and pH. Percentage swelling (S %) of all the hydrogels were increased with time and constant percentage swelling values were reached near 30 hours. For semi-IPN-type hydrogels, it was observed that the hydrogels including AA swollen much more than the hydrogels including AAm. It is also found that the full-IPN hydrogels had more swellable character than the semi-IPN-type hydrogels. No significant change in the percentage swelling values was observed by increasing the amount of CS. Chitosan-poli(acrylic acid) full IPN-2 [(CS-PAA)<sub>T</sub>-2] was determined as the most swollen hydrogel at pH=7.4 and 37 °C.

In the second part of the study, the effect of Epidermal Growth Factor (EGF) loaded chitosan-poli(acrylic acid) semi IPN-2 [(CS-PAA)<sub>Y</sub>-2], Chitosan-poli(acrylamide) semi IPN-2 [(CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2] and (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hydrogels on wound healing was investigated, using L929 mouse fibroblast cells. The loading of EGF was performed by soaking method. The satisfactory results were obtained only just for the EGF loaded (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2. From the optical microscope examinations, it was observed that the cells adhered to the surface and spread by creating fibroblastic morphologies in a manner increasing by time.

In the final part of the study, Piperacillin/Tazobactam was loaded to (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 and (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hydrogels by the soaking method. The release from the Piperacillin/Tazobactam loaded hydrogels at 37°C and pH=7.4 was monitored with UV spectrophotometer. It was observed that the hydrogel (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 has released Piperacillin/Tazobactam in longer time compared to the other loaded hydrogels. From the kinetic data, zero order release has been determined for all hydrogels. The diffusion coefficient (D) of (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hydrogel which has faster releasing value, was calculated to be  $3.53 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

|              |                                                                                   |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Science Code | : 201.1.117                                                                       |
| Key Words    | : Hydrogel, IPN, acrylic acid, acrylamide, chitosan, EGF, Piperacillin/Tazobactam |
| Page Number  | : 105                                                                             |
| Adviser      | : Prof. Dr. Mehlika Pulat                                                         |

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, yol gösterici değerlendirmeleri ve yakın ilgisiyle beni sürekli destekleyen, tezin yürütülmesi sırasında büyük emeği geçen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehlika PULAT'a, hücre çalışmalarımıdaki yardımlarından dolayı Sayın Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'na "Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü", hücre çalışmalarımı yürüten Anıl Sera KAHRAMAN'a, deneysel çalışmalarım süresince her zaman yanımda olan, desteğini hiç esirgemeyen Özlem EROL'a, Banu ÖCAL'a, Sezen DEMİRCİ'ye, tüm hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                | <b>Sayfa</b> |
|----------------------------------------------------------------|--------------|
| ÖZET .....                                                     | iv           |
| ABSTRACT .....                                                 | vi           |
| TEŞEKKÜR.....                                                  | viii         |
| İÇİNDEKİLER .....                                              | ix           |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....                                      | xiii         |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                       | xiv          |
| RESİMLERİN LİSTESİ.....                                        | xvi          |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                  | xvii         |
| 1.GİRİŞ ve AMAÇ .....                                          | 1            |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                         | 3            |
| 2.1. Hidrojeller .....                                         | 3            |
| 2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması .....                   | 4            |
| 2.1.2. İç içe geçmiş ağ yapılı (IPN) hidrojeller .....         | 6            |
| 2.1.3. İyonik hidrojeller .....                                | 7            |
| 2.1.4. Hidrojellerde suyun konumu .....                        | 9            |
| 2.1.5. Hidrojellerin şişmesi .....                             | 11           |
| 2.1.6. Kimyasal çapraz bağlanma ile hidrojel hazırlanması..... | 17           |
| 2.2. IPN Tipi Hidrojellerin Önemli Kullanım Yerleri .....      | 17           |
| 2.3. Kontrollü İlaç Salımı .....                               | 19           |
| 2.4. Difüzyon davranışları ve Fick yasaları .....              | 20           |
| 2.5. Büyüme Faktörleri ve İşlevleri .....                      | 25           |

**Sayfa**

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6. Epidermal Büyüme Faktörü .....                                              | 29 |
| 2.7. Büyüme Faktörlerinin Kontrollü Salımı .....                                 | 31 |
| 2.8. Hücre Çoğalmasının Takibinde Kullanılan MTT Yöntemi .....                   | 32 |
| 2.9. Çalışmada Kullanılan Bazı Önemli Maddeler .....                             | 34 |
| 2.9.1. Fibroblast Hücre .....                                                    | 34 |
| 2.9.2. Kitosan .....                                                             | 34 |
| 2.9.3. Akrilik Asit (AA).....                                                    | 37 |
| 2.9.4. Akrilamit (AAM) .....                                                     | 38 |
| 2.9.5. Piperasilin/Tazobactam .....                                              | 39 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMA .....                                                        | 42 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar .....                                 | 42 |
| 3.2. Hidrojellerin Hazırlanması .....                                            | 44 |
| 3.3. Hidrojellerin Jelleşme Yüzdelerinin Gravimetrik Olarak Tayini .....         | 45 |
| 3.4. Hidrojellerin Şişme Deneyleri .....                                         | 45 |
| 3.4.1. Hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişiminin incelenmesi .....    | 45 |
| 3.4.2. Hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişiminin incelenmesi ..... | 46 |
| 3.4.3. Hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişiminin incelenmesi .....     | 46 |
| 3.5. Hidrojellerin SEM (Scanning Electron Microscope) İncelemeleri .....         | 46 |
| 3.6. EGF Çalışması .....                                                         | 47 |
| 3.6.1 Hidrojellere EGF yüklenmesi .....                                          | 47 |
| 3.6.2 EGF yüklü hidrojellerin sterilizasyonu.....                                | 47 |

|                                                                                                                                                                                     | <b>Sayfa</b> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.6.3 Hücre kültür çalışmaları.....                                                                                                                                                 | 47           |
| 3.6.4 Hücre sayımı .....                                                                                                                                                            | 48           |
| 3.6.5 MTT Testi .....                                                                                                                                                               | 50           |
| 3.7. Piperasilin/Tazobactam Salımının İncelenmesi .....                                                                                                                             | 50           |
| 3.7.1. Piperasilin/Tazobactam'ın UV-Spektrofotometrik Analizi.....                                                                                                                  | 51           |
| 3.7.2. (CS-PAA) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAA) <sub>T</sub> -2 hidrojellerine<br>Piperasilin/Tazobactam yüklenmesi .....                                      | 52           |
| 3.7.3. (CS-PAA) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAA) <sub>T</sub> -2 hidrojellerinden<br>Piperasilin/Tazobactam salımının UV-Spektrofotometresi ile<br>tayini ..... | 52           |
| 4. DENEYSEL BULGULAR VE YORUM .....                                                                                                                                                 | 54           |
| 4.1. Hidrojel Oluşumu.....                                                                                                                                                          | 54           |
| 4.2. Hidrojellerin Jelleşme Yüzdeleri Sonuçları .....                                                                                                                               | 56           |
| 4.3. Hidrojellerin Şişme Deneyleri Sonuçları .....                                                                                                                                  | 57           |
| 4.3.1. Hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla değişimi.....                                                                                                                     | 57           |
| 4.3.2. Hidrojellerin % şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi .....                                                                                                                 | 59           |
| 4.3.3. Hidrojellerin % şişme değerlerinin pH ile değişimi .....                                                                                                                     | 60           |
| 4.4. Hidrojellerin SEM Görüntülerinin Analizi .....                                                                                                                                 | 62           |
| 4.5. Hücre Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi .....                                                                                                                               | 63           |
| 4.6. (CS-PAA) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAA) <sub>T</sub> -2 Hidrojellerinden<br>Piperasilin/Tazobactam Salımı .....                                          | 71           |
| 5. SONUÇLAR .....                                                                                                                                                                   | 76           |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                                                                                     | 79           |
| EKLER .....                                                                                                                                                                         | 93           |

**Sayfa**

|                                                                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| EK- 1 pH= 2,0; 4,0; 6,0; 7,4; 8,0; 10,0; 12,0; Britton–Robinson Tampon (BRT) çözeltilerinin hazırlanması .....                                      | 94  |
| EK- 2 Hidrojellerin zamana karşı ortalama % Ş değerleri .....                                                                                       | 95  |
| EK- 2 (Devam) Hidrojellerin zamana karşı ortalama % Ş değerleri.....                                                                                | 96  |
| EK- 3 Hidrojelllerin ortalama % Ş değerlerinin sıcaklıkla değişimi sonuçları....                                                                    | 97  |
| EK- 4 Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin pH ile değişim sonuçları .....                                                                        | 98  |
| EK- 5 Hücre Sayımında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması .....                                                                                    | 99  |
| EK- 6 MTT analizi sonuçları .....                                                                                                                   | 100 |
| EK- 7 Piperasilin/Tazobactam yükleme ortamına ait derişim (mg/mL) verileri .....                                                                    | 101 |
| EK- 8 Piperasilinin (1g /100 mL yüklü) zamanla salım verileri .....                                                                                 | 102 |
| EK- 9 Piperasilin/Tazobactam yüklü (CS-PAA) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2, (CS-PAA) <sub>T</sub> -2 hidrojellere ait yüzde salım ..... | 103 |
| EK- 10 (PAA-CS) <sub>Y</sub> -2 hidrojeline yüklenmiş Piperasilinin (1 g/100 mL) zamana karşı salım kinetik değerleri .....                         | 104 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                                                      | 105 |

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge                                                                                                                                                                 | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 2.1. Hidrojellerin sınıflandırılmaları .....                                                                                                                    | 5     |
| Çizelge 2.2. pH-duyarlı hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan monomerler .....                                                                                       | 16    |
| Çizelge 2.3. Difüzyon ile serbestleşme mekanizmasının analizi .....                                                                                                     | 23    |
| Çizelge 2.4. Belli başlı büyüme faktörlerinin kökenleri ve etkileri .....                                                                                               | 26    |
| Çizelge 2.5. Kitosanın özellikleri ve uygulamaları .....                                                                                                                | 36    |
| Çizelge 2.6. AA'in kimyasal yapısı ve bazı özellikleri .....                                                                                                            | 37    |
| Çizelge 2.7. AAm'in kimyasal yapısı ve bazı özellikleri .....                                                                                                           | 38    |
| Çizelge 3.1. Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan bileşenlerin miktarları                                                                                           | 44    |
| Çizelge 4.1 Hidrojellerin jelleşme yüzdeleri.....                                                                                                                       | 57    |
| Çizelge 4.2. Piperasilin/Tazobactam yüklü (PAA-CS) <sub>T</sub> -2, (PAA-CS) <sub>Y</sub> -2 ve (PAAm-CS) <sub>Y</sub> -2 hidrojellerine ait kinetik parametreler ..... | 75    |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 2.1. Hidrojelin şematik olarak gösterilişi .....                                                               | 3     |
| Şekil 2.2. Hidrojeller içindeki dört temel moleküler etkileşimin sistematik olarak gösterilmesi .....                | 4     |
| Şekil 2.3. IPN tipi hidrojellerin türleri .....                                                                      | 7     |
| Şekil 2.4. Tampon içeren şişme ortamındaki ince bir iyonik hidrojel diskin şişme kinetiğinin şematik gösterimi ..... | 8     |
| Şekil 2.5. Şişmiş bir hidrojeldeki suyun bulunma çeşitleri .....                                                     | 10    |
| Şekil 2.6. Sulu ortamda farklı davranış gösteren polimer zincirlerinin jel ve hidrojel oluşturması .....             | 13    |
| Şekil 2.7. pH-duyarlı anyonik ve katyonik hidrojellerin şişmesi .....                                                | 16    |
| Şekil 2.8. Şişme kontrollü sistemden ilaç salımı .....                                                               | 21    |
| Şekil 2.9. Fick ve Fick olmayan difüzyon .....                                                                       | 24    |
| Şekil 2.10. EGF molekülünün aminoasit dizilimi.....                                                                  | 29    |
| Şekil 2.11. Fibroblast hücreler (a) ve Oluşan formazan kristalleri (b).....                                          | 33    |
| Şekil 2.12. Kitinden Kitosan elde ediliş tepkimesi .....                                                             | 35    |
| Şekil 2.13. Piperasilinin kimyasal formülü .....                                                                     | 39    |
| Şekil 3.1. Neubauer laminanın görüntüsü.....                                                                         | 49    |
| Şekil 3.2. Piperasilin/Tazobactam'ın tam spektrumu.....                                                              | 51    |
| Şekil 3.3. Piperasilin/Tazobactam'ın kalibrasyon doğrusu ( $\lambda_{\max} = 209,0 \text{ nm}$ ).....                | 52    |
| Şekil 4.1. Üretilen yarı-IPN tipi hidrojellerdeki moleküler ve moleküller arası bağların şematik gösterimi .....     | 55    |
| Şekil 4.2. GA ile kitosan arasındaki çapraz bağlanmanın şematik gösterimi .....                                      | 56    |
| Şekil 4.3. Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin zamanla değişim grafiği .....                                     | 59    |

| Şekil                                                                                                                                                                                     | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 4.4. Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği .....                                                                                                       | 60    |
| Şekil 4.5. Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin pH ile değişim grafiği .....                                                                                                           | 61    |
| Şekil 4.6. Serbest EGF için MTT grafiği .....                                                                                                                                             | 64    |
| Şekil 4.7. EGF yüklü (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> hidrojeli için MTT grafiği.....                                                                                                             | 67    |
| Şekil 4.8. 1 µg EGF içeren (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> hidrojelinin serbest EGF'ye karşı yapılan MTT grafiği.....                                                                            | 70    |
| Şekil 4.9. 2 µg EGF içeren (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> hidrojelinin serbest EGF'ye karşı yapılan MTT grafiği.....                                                                            | 70    |
| Şekil 4.10. 4 µg EGF içeren (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> hidrojelinin serbest EGF'ye karşı yapılan MTT analizi .....                                                                          | 71    |
| Şekil 4.11. (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAA) <sub>T-2</sub> hidrojellerine oda koşullarında 1 g/100 mL Piperasilin/Tazobactam yüklenmesinin takibi.....      | 72    |
| Şekil 4.12. (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAA) <sub>T-2</sub> hidrojellerinden Piperasilin/Tazobactam'ın salımı.....                                           | 72    |
| Şekil 4.13. (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAA) <sub>T-2</sub> hidrojellerinden Toplam Piperasilin/Tazobactam salımı .....                                      | 74    |
| Şekil 4.14. Piperasilin/Tazobactam yüklü (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> , (CS-PAA) <sub>T-2</sub> hidrojelleri için $M_t/M_\infty$ değerlerinin zamanla değişimi..... | 74    |
| Şekil 4.15. (CS-PAA) <sub>T-2</sub> , (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> ve (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> hidrojellerinden Piperasilin/Tazobactam'ın zamana karşı salım kinetiği .....                    | 75    |

## RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim                                                                                                                                                        | Sayfa |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Resim 4.1. Hidrojellerin SEM fotoğrafları .....                                                                                                              | 62    |
| Resim 4.2. EGF yüklü (a) (CS-PAA) <sub>Y</sub> -2, (b) (CS-PAA) <sub>T</sub> -2 hidrojelleri için optik mikroskop görüntüleri .....                          | 63    |
| Resim 4.3. EGF içermeyen kontrol ortamındaki hücrelerin optik mikroskop görüntüleri .....                                                                    | 65    |
| Resim 4.4. 1 µg lık serbest EGF ortamındaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri.....                                            | 65    |
| Resim 4.5. 2 µg lık serbest EGF ortamındaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri.....                                            | 66    |
| Resim 4.6. 4 µg lık serbest EGF ortamındaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri.....                                            | 66    |
| Resim 4.7. 1 µg EGF içeren (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2 hidrojelinin bulunduğu ortamdaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri ..... | 68    |
| Resim 4.8. 2 µg EGF içeren (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2 hidrojelinin bulunduğu ortamdaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri ..... | 68    |
| Resim 4.9. 4 µg EGF içeren (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2 hidrojelinin bulunduğu ortamdaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri ..... | 69    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler   | Açıklama                                     |
|------------|----------------------------------------------|
| $m_i$      | Ekstakte edilmemiş jel kütlesi               |
| $m_s$      | Ekstrakte edilmiş jel kütlesi                |
| $w_o$      | Şişmemiş jel tabakanın kütlesi               |
| $w$        | Şişmiş jel tabakanın kütlesi                 |
| $M_t$      | t zamanda salınan etken madde miktarı        |
| $M_\infty$ | $\infty$ zamanda salınan etken madde miktarı |
| $k$        | Salım hız sabiti                             |
| $t$        | Serbestleşme zamanı                          |
| $n$        | Salım mekanizmasını belirleyen sabit         |
| $D$        | Difüzyon katsayısı                           |
| $r$        | Yarıçap                                      |

| Kısaltmalar            | Açıklama                                     |
|------------------------|----------------------------------------------|
| AA                     | Akrilik asit                                 |
| AAm                    | Akrilamid                                    |
| APS                    | Amonyum persülfat                            |
| BRT                    | Britton-Robinson Tamponu                     |
| CS                     | Kitosan                                      |
| (CS-PAA) <sub>Y</sub>  | Kitosan-poli(akrilik asit) yarı IPN hidrojel |
| (CS-PAAm) <sub>Y</sub> | Kitosan-poli(akrilamid) yarı IPN hidrojel    |
| (CS-PAA) <sub>T</sub>  | Kitosan-poli(akrilik asit) tam IPN hidrojel  |
| DMEM                   | Dulbecco's modified Eagle's medium           |
| ECM                    | Extra cellüler matrix                        |

**Kısaltmalar****Açıklama****EGDMA**

Etilenglikol dimetakrilat

**EGF**

Epidermal Büyüme Faktörü

**FBS**

Fetal bovine serum

**FGF**

Fibroblast Büyüme Faktörü

**GA**

Glutaraldehit

**IGF**

İnsülin Bezleri Büyüme Faktörü

**IPN**

Interpenetrating network (iç içe geçmiş ağ yapı)

**MTT**

3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoliumbromid

**NGF**

Sinir Büyüme Faktörü

**PDGF**

Platelet Kökenli Büyüme Faktörü

**SEM**

Scanning Electron Microscope

**TCPS**

Tissue culture polistiren

**TGF**

Transforming Büyüme Faktörü

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Hidrojeller, suda çözünmeden şişebilen, üç boyutlu, çapraz bağlı polimerik yapılardır. Doku mühendisliği, yapay organlar, ilaç salımı gibi biyomalzeme ve biyoteknoloji alanlarında ümit verici uygulamaları sayesinde yaygın olarak çalışılmaktadır [1]. Hidrojeller, kimyasal (kovalent veya iyonik) veya fiziksel çapraz bağların (kristalinite) varlığı nedeniyle suda çözünmezdirler. Kopolimerlerden oluşan hidrojellerin en azından bir bileşenlerinin hidrofilik özelliğe sahip olması gereklidir. Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir [2]. Belirli bir düzene sahip olduklarından elastik yapıdadırlar. Uzun süre deforme edilmeye çalışılsa da eski haline geri dönerler [3].

Çapraz bağlı iki ayrı sentetik veya doğal polimerin fiziksel olarak birleşerek iç içe geçmesiyle oluşan ağ yapılı polimerler iç içe geçmiş ağ yapı (IPN) tipi hidrojeller olarak tanımlanırlar. Bu yapılardan en az biri diğ erinin varlığında sentezlenir ve/veya çapraz bağlanır [4]. Yarı-IPN tipi hidrojellerde ise polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğ eri doğrusal yapıdadır [5-7]. Bu tür hidrojellerde misafir polimer zincirleri, ev sahibi ağ yapının içinde kovalent bağlı veya kovalent bağıs ız olarak yer alabilirler.

Kitosan (CS); kitinin kısmi deasetilasyonu ile türetilmiş, biyolojik olarak parçalanabilen bir polisakkarittir. CS genellikle biyobozunurluk, biyoyumluluk, yüksek toksisite, hemostatik, bakterio statik, fungistatik, antikanserojen ve antikolesteremik gibi uygun biyolojik özelliklerinden dolayı farmasötik ve medikal alanlarda kullanılır [8].

Akrilik asit (AA); oda sıcaklığ ında renksiz ve kokulu bir sıvıdır. Su ve birçok organik çözücü ile karışabilme özelliğ ine sahiptir. Akrilamit (AAm) ise oda sıcaklığ ında renksiz, kokusuz ve kristal yapıdadır. Biyoyumlulukları tesbit edilmiş olan AA ve AAm ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır [9].

İlaçların sisteme verilış yolu olarak en dikkat çeken yöntem kontrollü salım sistemleridir. Kontrollü salım sistemlerinde etken maddenin tek bir uygulama ile uzun süre etkin düzeyde kalması sağlanır. Bu sistemlerde hidrojellerin şişme-büzüşme, mekanik, morfolojik, kimyasal vb. gibi pek çok özelliklerinden yararlanılmaktadır. Özellikle ortam pH sının değişimlerine en azından belirli oranlarda cevap verebilen hidrojeller, çeşitli vücut bölgelerinde ilaç serbestleştirmek için önem arz etmektedir. Bu özellikler çok farklı polimerlerin bir araya gelerek hidrojel oluşturması sayesinde gerçekleşmektedir. İyonik hidrojellerin bu konuda özel bir yeri vardır [10].

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF); 53 aminoasitten oluşmuş oligopeptittir. Fare ve insan EGF'si yapısal olarak aynıdır. Benzer biyolojik aktiviteye sahiptirler. EGF epitel hücrelerin bütün tiplerinin üremesini ve göçünü uyarak etkisini gösterir [11].

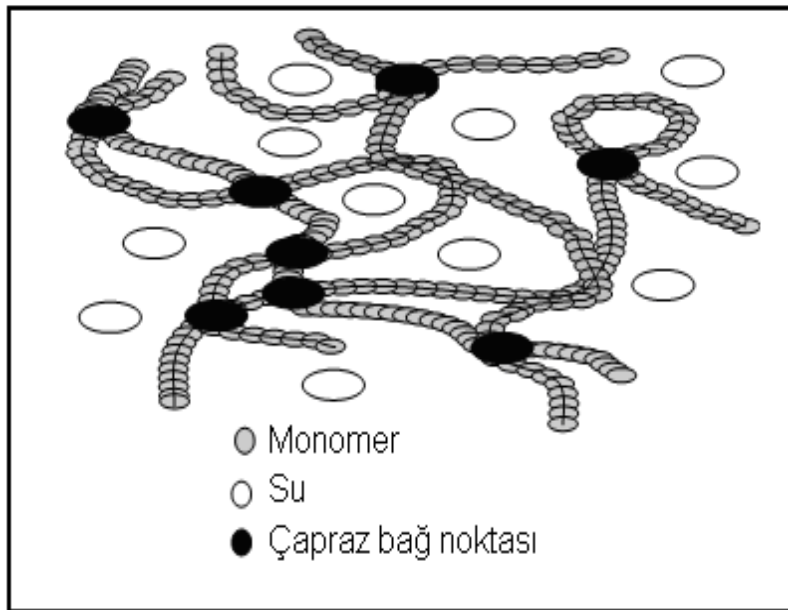
Sunulan çalışmada; CS, AA ve AAm temelli yarı ve tam-IPN tipi hidrojellerden yara iyileşmesinde kullanılabilecek preparat tasarımı hedeflendi. Bu doğrultuda başlatıcı olarak amonyum persülfat / sodyummetabisülfid  $[(NH_4)_2S_2O_8 / Na_2S_2O_5]$  redoks başlatıcı çifti ve hidrojel oluşumu için etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ve glutaraldehit (GA) çapraz bağlayıcıları kullanılarak, serbest radikal polimerleşmesi ile hidrojel sentezlenmesine karar verildi. Sentezlenen bu hidrojellerin şişme davranışlarının ve morfolojilerinin incelenmesi planlandı. Şişme değerlerine ve gözenekliliklerine göre seçilen hidrojellerin yara iyileşmesinde etkin olarak kullanılabilmesi için EGF ve Piperasilin/Tazobactam içermesinin uygun olacağı düşünüldü. Böylece hidrojellere hem EGF hem de Piperasilin/Tazobactam yüklenmesi ve bunların etkinliklerinin incelenmesi çalışmanın diğer hedefleri olarak belirlendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde çalışma konumuzla ilgili genel bilgiler alt başlıklar halinde sunulmuştur.

### 2.1. Hidrojeller

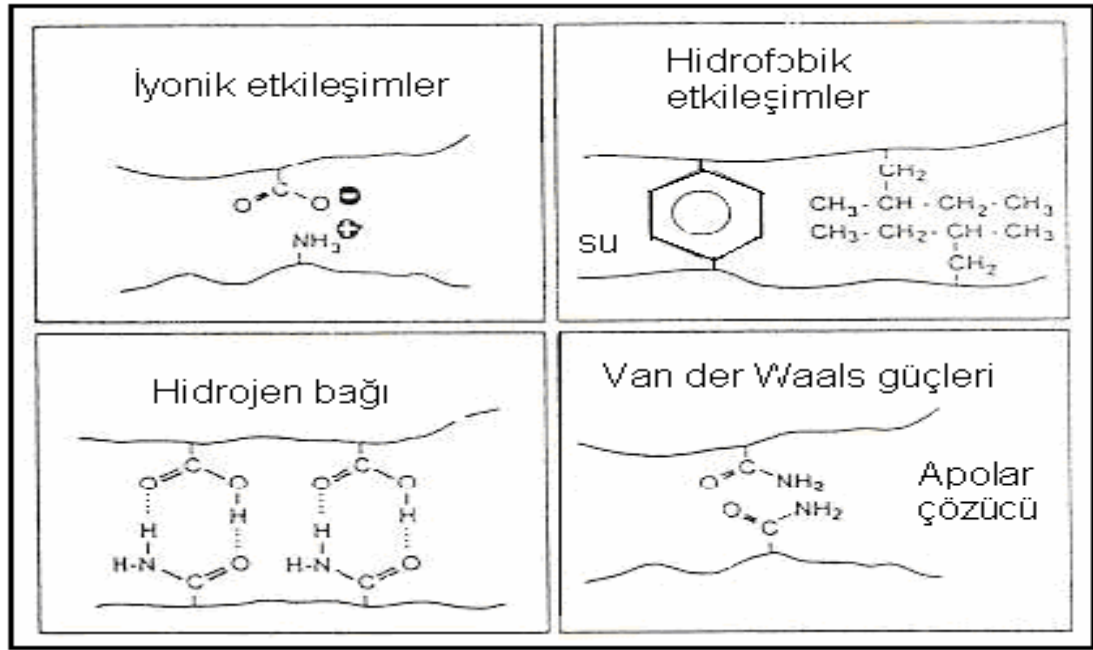
Hidrojeller, su içerisinde çözünmeden şişebilme özelliğine sahip, çapraz bağlı, üç boyutlu ağ yapılı polimerlerdir [12,13]. Su içeriği kendi kütlesinin %100 ünden fazla olan hidrojellere de süper absorbant denilir [14-15]. Su dışındaki çözücülerde en az % 20 ve daha fazla miktarlarda şişebilen jeller ise kserojel olarak adlandırılır [16-17]. Hidrojellere ait genel bir şematik gösterim Şekil 2.1. de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Hidrojin şematik olarak gösterilişi

Hidrojellerin üç boyutlu yapısı kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir. Bu etkileşimler Şekil 2.2. de

sunulmuştur [2]. Hidrofobik etkileşimler, fiziksel çapraz bağ benzeri etkileşimler olduğundan jelin şişme davranışını doğrudan etkilemektedir. Fiziksel çapraz bağlı jellerin dış çevre değişimine fazlaca duyarlı oldukları bilinmektedir [2,18-21].



Şekil 2.2. Hidrojeller içindeki dört temel moleküler etkileşimin sistematik olarak gösterilmesi

Hidrojeller, yapılarında çok fazla miktarda su bulundurmaları, yumuşak ve esnek yapıları gibi taşıdıkları birçok fiziksel özellikler açısından canlı dokularla karşılaştırıldıklarında büyük bir benzerlik göstermektedirler [22-24].

### 2.1.1. Hidrojellerin sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller, hazırlama yöntemlerine, iyonik yüklerine, fiziksel yapılarına ve çapraz bağlanma durumlarına bağlı olarak sınıflandırılabilirler [2,25,26]. Bu sınıflandırma Çizelge 2.1. de şematik olarak gösterilmiş ve önemli hidrojel türlerinden bazıları alt başlıklar halinde açıklanmıştır.

## Çizelge 2.1. Hidrojellerin sınıflandırılmaları

### Hazırlama yöntemine göre :

Homopolimer hidrojeller  
Kopolimer hidrojeller  
Çoklu polimer hidrojeller  
IPN (interpenetrating networks) hidrojeller

### İçerdikleri yan gruplara göre :

Nötral (iyonik olmayan) hidrojeller  
İyonik hidrojeller  
- Anyonik (negatif yüklü) hidrojeller  
- Katyonik (pozitif yüklü) hidrojeller  
- Poliamfolitik hidrojeller

### Fiziksel yapılarına göre :

Amorf hidrojeller  
Yarı - kristalin hidrojeller  
Hidrojen bağlı hidrojeller  
Fiziksel hidrojeller  
Kimyasal hidrojeller

### Kaynaklarına göre

Doğal hidrojeller  
Sentetik hidrojeller

### Su içeriklerine göre

Düşük şişme dereceli (% 20-50)  
Orta şişme dereceli (% 50-90)  
Yüksek şişme dereceli (% 90-99,5)  
Süper-absorbant (>% 99,5)

### Kimyasal kararlılıklarına göre

Biobozunur  
Biobozunmayan

Homopolimer hidrojel­ler tek tür hidrofilik monomerden oluşturulan hidrojel­lerdir. Poli(2-hidroksi etil metakrilat) (PHEMA), poli(glis­eril metakrilat), poli(3-hidroksi propil metakrilat) içeren poli(hidroksi alkil metakrilat)'lar bu tür hidrojel­lere verilebilecek örneklerdendir [26]. Yumuşak kontak lens yapımı ve kontrollü ilaç salım aparatları gibi önemli uygulama alanları vardır [27].

Kopolimer hidrojel­ler iki monomerin çapraz bağlanması ile hazırlanırlar; ancak monomerlerden en az bir tanesi hidrofilik yapıda olmalıdır. Kopolimerik hidrojel­lerde çapraz bağlanma kovalent ya da iyonik olarak gerçekleşebilir [5]. En çok araştırılan kopolimerik hidrojel­lere poli(HEMA-ko-AA) ve poli(2-hidroksi etil metakrilat-ko-metilmetakrilat) [poli(HEMA-ko-MMA)] örnek olarak verilebilir [28,29].

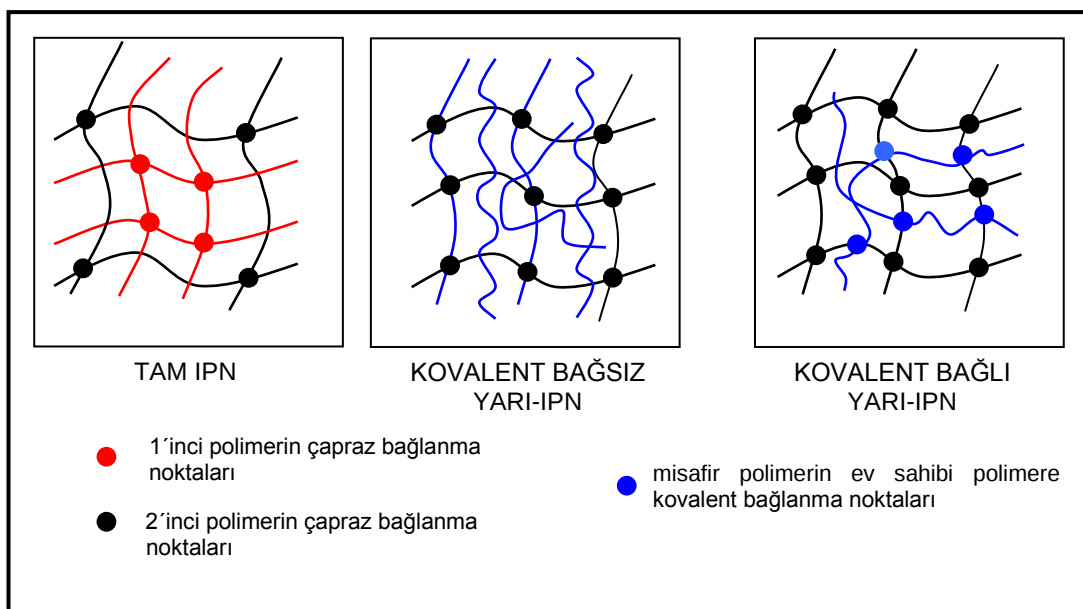
Çoklu polimer hidrojel­ler üç veya daha fazla monomerden oluşan yapılardır [30]. Bu tür hidrojel­lere, hem pH ya hem de sıcaklığa duyarlı olan poli(N-izo-propilakrilamit-ko-AA-ko-HEMA) [poli(NIPA-ko-AA-ko-HEMA)] ve poli(sodyum akrilat-ko-NIPA-ko-AAm) hidrojel­leri örnek olarak verilebilir [31,32].

Çalışmamızda ayrı bir öneme sahip olan IPN tipi hidrojel­ler ile iyonik olan hidrojel­ler alt başlıklar halinde ele alınacaktır.

### **2.1.2. İç içe geçmiş ağ yapılı (IPN) hidrojel­ler**

IPN tipi hidrojel­ler çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak birleşmesi ile oluşur. Bu yapılardan en az biri diğerinin varlığında sentezlenir ve/veya çapraz bağlanır [4]. Örneğin polioksietilen ve poli(akrilik asit) PAA den hazırlanan IPN yapılar mevcuttur. Öncelikle çapraz bağlı polioksietilen hazırlanır, daha sonra bu örgü AA, başlatıcı ve çapraz bağlayıcı içeren karışımda şişirilirken polimerizasyon da gerçekleşir [30]. IPN'yi oluşturan iki polimerik örgünün birbiriyle uyumlu olması IPN oluşumunu artırır, faz ayrımını engeller.

Ayrıca IPN yi oluşturan polimerler arasında kimyasal bağ bulunmadığından her iki bileşen de kendi özelliklerini korur ve aranan şartlara sahip bir yapı oluşumunu sağlayabilir [5,26]. IPN yapısında hidrofobik ikinci bir polimerin kullanımı hidrojin mekanik dayanıklılığını artırır [5]. Yarı-IPN tipi hidrojellerde polimerlerden biri çapraz bağ içerirken diğeri içermez [5,7]. Bu tür hidrojellerde misafir polimer zincirleri, ev sahibi ağ yapının içinde kovalent bağlı veya kovalent bağırsız olarak yer alabilirler. CS ve türevleri gibi polisakkaritler, PVA, poli(etilen oksit) (PEO), poli(metakrilik asit) (PMAA), PNIPA gibi polimerlerden IPN ve yarı-IPN hidrojelleri elde edilebilir [33]. Şematik bir gösterim Şekil 2.3. te sunulmuştur.



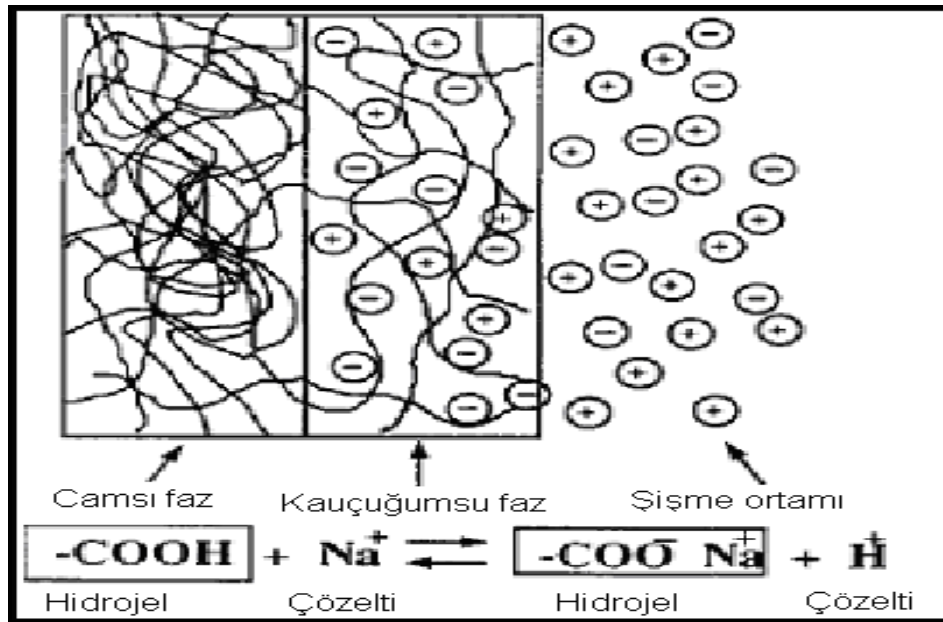
Şekil 2.3. IPN tipi hidrojel türleri

### 2.1.3. İyonik hidrojeller

İyonik olmayan hidrojeller yapılarında yüklü gruplar bulundurmamayan homopolimerik veya kopolimerik nötr hidrojellerdir. Çözücünün ozmotik basıncı yan zincirin gerilme enerjisi ile dengelendiği zaman denge değerine kadar şişerler. Bu hidrojellerin şişme ve büzüşme durumları genellikle çevre sıcaklığındaki değişimin bir sonucu olarak meydana gelir [26,34].

Polielektrolitler olarak da bilinen iyonik hidrojeller, iyonik yüklü monomerlerden hazırlanırlar. Bu hidrojeller monomer yüklerinin pozitif ya da negatif olmasına göre katyonik ve anyonik hidrojeller olarak adlandırılırlar. Ayrıca pozitif ve negatif yüklerin her ikisinin de bir arada bulunduğu poliamfolitik hidrojeller mevcuttur [35-36].

İyonik hidrojellerin ana zincirinde yüklü grupların bulunması uyarılara duyarlılıklarını artırır [37]. Bu iyonik ağ yapılar hem asidik hem de bazik gruplar içerirler. Uygun pH ve iyonik şiddetteki sulu ortamda bu gruplar iyonize olur ve jelde sabit yükler oluşur. Bu yüklerin elektrostatik itme kuvvetlerinin sonucunda ağ yapı içerisine daha çok çözücü girebilir ve şişme dereceleri artar. Bu durum Şekil 2.4. te gösterilmiştir [38].



Şekil 2.4. Tampon içeren şişme ortamındaki ince bir iyonik hidrojel diskin şişme kinetiğinin şematik gösterimi

#### Anyonik hidrojeller

Anyonik hidrojeller, genellikle negatif yüklü asidik veya anyonik monomerlerin homopolimerlerinden ya da bir anyonik monomerle bir nötr monomerin

kopolimerinden oluşur. Bunlar dış ortam pH sına bağlı olarak denge şişme davranışlarında ani değişimler gösterirler [37,38].

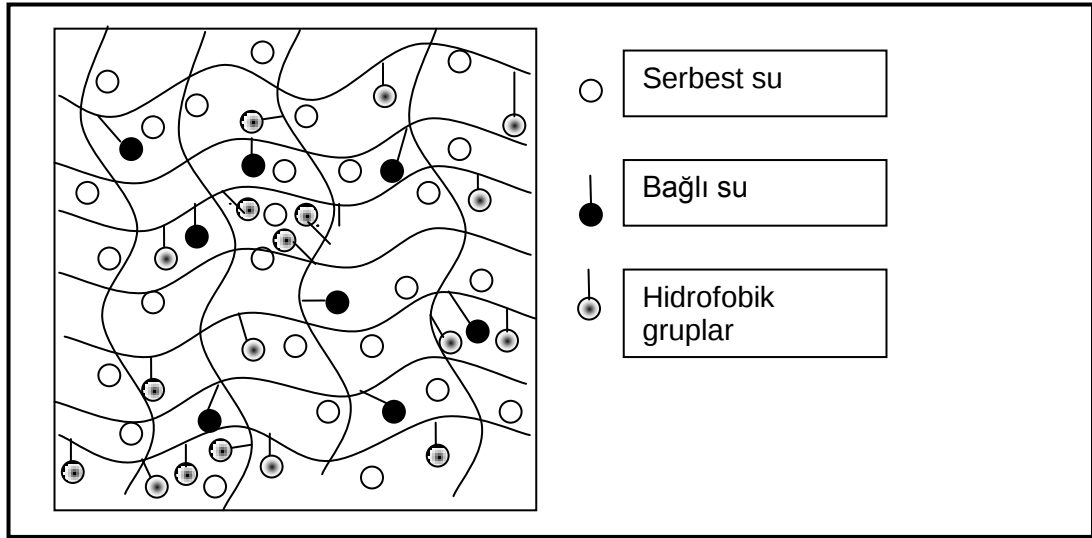
Ortam pH sı iyonlaşacak grubun  $pK_a$  değerinin üzerinde olduğu zaman, polimer üstündeki yüklü grupların sayısı artar ve buna bağlı olarak zincirler arasındaki elektrostatik itme kuvvetleri güçlenir. Bu da ağ yapının hidrofilik özelliğini arttırarak yüksek şişme değerlerine ulaşılmasını sağlar [25]. Anyonik hidrojellerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan monomerlere AA, krotonik asit, itakonik asit örnek olarak verilebilir [26].

#### Katyonik hidrojeller

Katyonik hidrojeller, pozitif yüklü bazik veya katyonik monomerlerin homopolimerlerinden yada bir katyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimerinden oluşurlar. Katyonik hidrojellerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan monomerlerden bazıları aminoetil metakrilat ve türevleri, 4-vinil piridindir [26]. Bu hidrojellerde ortamın pH sı iyonlaşacak grubun  $pK_b$  değerinin altında olduğu zaman iyonlaşırlar ve zincirler arasındaki elektrostatik itme kuvveti artar. Bu da ağ yapının artan hidrofilik özelliğe sahip olmasına ve yüksek şişme değerlerine neden olur [25].

#### **2.1.4. Hidrojellerde suyun konumu**

Bir jelin hidrojel olabilmesi için yapısında  $-OH$ ,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ ,  $-COOR$ , vb. gibi polar ve su sever fonksiyonel grupları içermesi gerekir [38,39]. Bu gruplar su ile etkileşerek hidrojen bağlarını oluştururlar. Bağlı durumuna geçen su ile çevrilen hidrofilik gruplardan jelin hacmi ve kütlesi artar ve jel şişmeye başlar. Bir jeldeki su sever grupların fazlalığı şişmeyi daha da artırır [40]. Şişmiş bir hidrojelde Şekil 2.5 de gösterildiği gibi üç tür su bulunmaktadır [41].



Şekil 2.5. Şişmiş bir hidrojeldeki suyun bulunma çeşitleri

- ❖ *Bağlı su*: Polimerin polar grupları ile hidrojen bağları yapan sudur.
- ❖ *Ara yüzey suyu*: Polimerin hidrofobik grubu çevresinde toplanan sudur. Bağlı su gibi sıkıca bağlı değildir.
- ❖ *Serbest ya da kütle suyu*: Polimerin gözeneklerini dolduran bu su normal su gibi davranır ve polimerle etkileşmez.

Bir şişmiş hidrojin yüzeyi çok farklı davranış gösterir. Bu yüzey bölgesi; yüksek zincir hareketliliği, derişim gradienti, heterojen zincir uzunlukları, dipolar özellik ve değışik su yapısı ile karakterize edilir. Bu özellikler hidrojel yüzeylerinin analizini ve karakterizasyonunu zorlaştırır.

Bir hidrojel yüzeyinde yürüyebilecek karmaşık olaylar hakkında şunlar söylenebilir:

- ❖ Suyun konumu ve sistemdeki kimyasal bileşenlerin etkileri gibi çevresel etkilere karşı yanıt veren polimer zincirleri hareketlenir.
- ❖ İyonlar, küçük mol kütleli organik bileşikler ve proteinler, jel içindeki çözeltide bir derişim gradienti oluştururlar.

- ❖ Serbest su, polimer zincirine, polimer moleküllerine bağlanır ve buz benzeri bir yapı oluşturur. Suyun yapısı sistemdeki polimer zincirleri ya da diğer moleküllerin etkisiyle değişebilir [16,42,43].

### 2.1.5. Hidrojellerin şişmesi

Şişme, polimer yapısındaki belirli bir hacmin ani değişimidir. Şişme, gözenekli absorbanlar tarafından sıvı veya buharların tutulmasında olduğu gibi, yalnızca küçük çözücü moleküllerinin polimerin gözenek ve boşluklarına dolarak polimer fazına girmesi olayı değildir.

Şişme küçük moleküllü bir sıvının polimer yapısında bir değişim ile birlikte bir polimer tarafından soğurulması prosesidir. Çözücü molekülleri yapısal boşluklara girerken polimerin süper moleküler yapılarının arasını zorla açar. Buna yapılar arası şişme denir. Eğer çözücü molekülleri yapıların içine girerse, makromoleküller zorla açılır. Buna da yapı içi şişme denir. Çözücü içeriği artarken, polimer yapısı yavaş yavaş birbirinden ayrılır ve çözeltide içinde çözücü bulunan oynak bir polimerik ağ yapı meydana gelir [40].

Şişme, polimer moleküllerinin çok büyük olmasından dolayı tek yönlü karışmadır. Küçük moleküllü bir sıvının polimerdeki bir çözeltisi olan şişmiş polimer, saf haldeki küçük moleküllü sıvı tabakası ile belli bir süre için birlikte bulunur. Bir süre sonra, polimer zincirleri yeterli miktarda birbirlerinden uzaklaştıkları zaman, çözücü molekülleri polimer içine yavaş yavaş difüzlennmeye başlarlar. Burada daha derişik bir çözelti tabakası ile daha seyreltik bir çözelti tabakası bir arada bulunur. Bir süre daha geçtikten sonra, bu iki tabakanın derişimleri birbirine eşit olur ve tek fazlı homojen bir sistem ortaya çıkar.

Şişme sınırlı veya sınırsız olabilir. Sınırsız şişme kendiliğinden çözeltiye dönüşen şişmedir. Böyle bir olaya çözünme denir. Bir polimerin çözünmesinde gözlenen temel özellik, polimer ve çözücü moleküllerinin

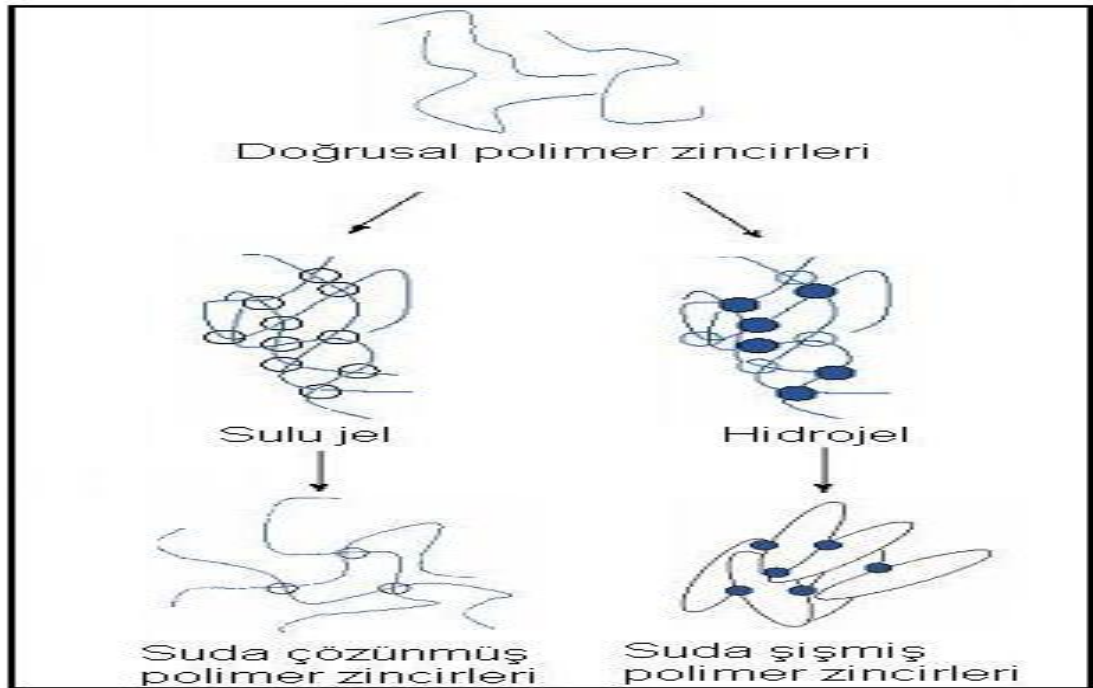
büyüklik bakımından birbirlerinden binlerce kez farklı olmaları ve bu nedenle farklı hareketliliğe sahip olmalarıdır. Küçük moleküllü bir sıvının hareketliliği çok yüksek, makromoleküllerin hareketliliği ise tersine çok düşüktür. Bu yüzden büyük moleküller bir çözücü fazına geçmekte zorlanırlar ve bir polimer çözünmeden önce içine çok miktarda sıvı alarak şişer.

Sınırlı şişme küçük moleküllü sıvılar ile polimerlerin etkileşmesidir. Sıvıların polimer tarafından tutulma aşaması sınırlandığı zaman, polimerin kendiliğinden çözünmesi mümkün olmaz yani polimer zincirleri tam olarak ayrılamazlar. Sonuçta birisi küçük moleküllü sıvının polimerdeki çözeltisi ve diğeri saf haldeki küçük moleküllü sıvı olmak üzere iki faz bir arada bulunur. Bu fazlar açıkça gözle görülebilir bir ara yüzey ile ayrılmıştır ve dengededir.

Eğer polimer kimyasal bağlardan meydana gelen bir ağ yapıya sahipse, polimerin ısısal bozunma sıcaklığının altındaki herhangi bir sıcaklıkta zincirler birbirinden ayrılamaz. Bu nedenle, çapraz bağlı polimerler doğal olarak çözünmez ama jel oluşturarak şişebilirler. Bir polimerin şişmesi ve çözünmesi arasındaki fark aşağıdaki Şekil 2.6. de gösterilmiştir.

Şişme, polimerik ağ yapılarının karakteristik bir özelliğidir. Çapraz bağlanma miktarına bağlı olarak polimerik ağlar çözünmeden çok yüksek miktarda sıvı absorplayabilirler [43].

Bir polimerik jelin şişme yeteneğini içerdiği fonksiyonel grupların birbiriyle ve çözücüyle etkileşimi belirlemektedir. Zincirler arası itme ve çekme, kovalent olmayan elektrostatik, hidrofobik, Van der Waals ve hidrojen bağından etkilenmektedir. Hidrofobik etkileşimler bu tür fiziksel çapraz bağ benzeri etkileşimlerdir ve bu da jelin şişme davranışını etkilemektedir [21,41,44].



Şekil 2.6. Sulu ortamda farklı davranış gösteren polimer zincirlerinin jel ve hidrojel oluşturmaları ● kovalent çapraz bağları ○ polimer zincirleri arasındaki karışıklıkla oluşan gerçek olmayan çapraz bağlar

Çeşitli uygulamalarda kullanılacak hidrojellerin, gerçek sistemlere benzer olarak dış ortamdan gelebilecek uyarılara cevap verebilecek özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu amaçla hazırlanan ve dış ortamdan gelen herhangi bir uyarı sonucunda yapısal değişime uğrayarak tersinir fiziksel veya kimyasal özellikler gösteren polimerlere “uyarı-cevap polimerleri ya da akıllı polimerler” adı verilmektedir [45,46].

Polimerlerden üretilen uyarı-cevap hidrojelleri uyarı türüne göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilirler:

- ❖ Sıcaklık-duyarlı hidrojeller
- ❖ pH-duyarlı hidrojeller
- ❖ Elektrik alana-duyarlı hidrojeller
- ❖ Işık-duyarlı hidrojeller
- ❖ Manyetik alana duyarlı hidrojeller

### Sıcaklık duyarlı hidrojeller:

Sıcaklık jellerin faz davranışını etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Sıcaklık duyarlı hidrojeller ilaç salımı araştırmalarında çevre duyarlı polimer sistemlerinin en çok çalışılan sınıfıdır [47,48].

Sıcaklık duyarlı hidrojellerde; polimer sistemini oluşturan bileşenlerden en az biri çözücü ortamında (genelde su) sıcaklığa bağlı bir çözünürlüğe sahip olmalıdır. Sudaki şişme derecesinde belirgin bir değişiklik gösteren sıcaklığa duyarlı bir hidrojel elde etmek için, bu jeli oluşturan bileşenlerin belli bir sıcaklığın altında veya üstünde çözünmez olmaları gerekir. Bu sıcaklıkta görülen hacim değişimi polimer zincirinin bileşenlerine ve hidrojin iyonizasyon derecesine bağlı olarak geri dönüşümlüdür. Sıcaklık kritik bir değere ulaştınca polimerde faz değişimi olur ve polimeri çözen bu en düşük çözücü sıcaklığına “Alt Kritik Çözünme Sıcaklığı, AKÇS” (Lower Critical Solution Temperature, LCST) ve en yüksek çözücü sıcaklığına ise “Üst Kritik Çözünme Sıcaklığı, ÜKÇS” (Upper Critical Solution Temperature, UCST) denir [49].

İlaç salımı uygulamalarında kullanılan polimerler AKÇS değerinin altında çözünürler. AKÇS değeri, sıcaklığa duyarlı ve yan zincirlerinde iyonize gruplar olan polimerlerde pH ya da bağlıdır. Ayrıca polimerin hidrofilik/hidrofobik dengesi de AKÇS değerini etkiler [50]. Birçok polimerin suda çözünürlüğü sıcaklık artmasıyla artar. AKÇS gösteren polimerlerin sıcaklık arttıkça suda çözünürlükleri azalır. Bu özelliğe sahip polimerlerden yapılmış hidrojeller AKÇS’ nın üstünde sıcaklık artmasıyla büzülürler. Bu tür şişme davranışı karışık sıcaklık bağımlılığı olarak bilinir.

Düşük sıcaklıklarda, polimer zincirinin hidrofilik halkaları arasındaki hidrojen bağı ve su molekülleri suda çözünmeyi iyileştirmeye yardımcı olur. Sıcaklık artarken hidrofobik halkalar arasındaki hidrofobik etkileşimler; hidrojen

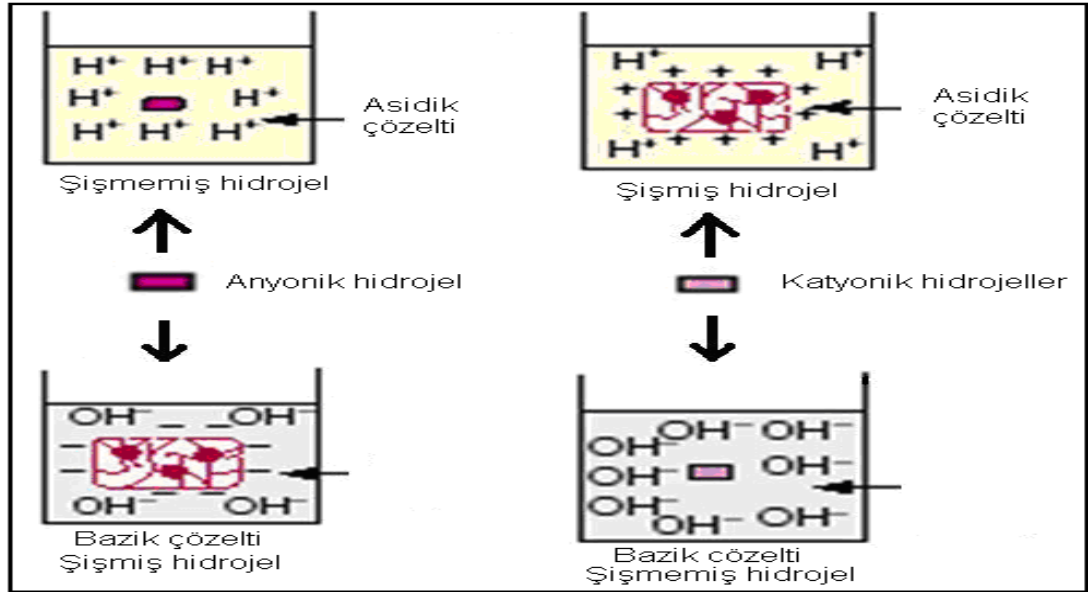
bağları zayıflarken kuvvetlenir. Kesin sonuç hidrofobik etkileşimlerle polimerler arası zincir ayrışmasından ötürü hidrojelilerin büzüşmesidir [12].

pH-duyarlı hidrojeller:

Eğer bir jel iyonlaşabilen grup içeriyorsa pH-duyarlı jel olarak adlandırılır, çünkü iyonlaşma pH tarafından belirlenir [51]. pH-duyarlı hidrojeller, pH değişimine karşı iyonlaşmayı ve bu sebeple jelin özelliklerini değiştiren karboksilik asit ve primer aminler gibi asılı (pendant) asidik veya bazik gruplar veya sülfonik asit ve kuarterner amonyum tuzları gibi güçlü asit ve bazları içerirler [12]. Uygun pH ve iyonik şiddetli sulu ortamda, asılı gruplar iyonlaşır ve polimer ağında sabit yükler ortaya çıkmaya başlar. Böylece elektrostatik itici güç oluşturarak, hidrojelin şişmesine veya büzüşmesine neden olur. Bunun sonucunda da ilaç salımını kontrol eder [13,52-54]. pH-duyarlı hidrojeller, polielektrolit yapısında olup, ortam pH sına bağlı olarak tersinir iyonlaşma özelliği gösterirler. İyonlaşma polimerin polaritesini ve fonksiyonel gruplar arasındaki etkileşimleri değiştirir, dolayısıyla polimer özellikleri değişir [18,55,56].

Bununla birlikte, polielektrolitlerde iyonlaşma diğer bitişik iyonlaşmış gruplarla kullanılan elektrostatik etkileri yüzünden daha zordur. Bu eğilim görünen ayrışma sabitini ( $K_a$ ); karşılık gelen monoasit veya monobazdan farklı yapmak içindir [12]. Anyonik hidrojellerin asılı grupları, polimerik ağın  $pK_a$  sının altında iyonlaşmaz üstünde iyonlaşır. İyonların varlığıyla yüksek ozmotik şişme gücü yüzünden polimer  $pK_a$  sının üstündeki pH da hidrojelin şişmesine yol açar. Katyonik hidrojeller için ise tam tersi olur, polimerik ağın  $pK_a$ 'sından daha düşük pH da şişme söz konusudur.

İyonik hidrojellerin; asidik ve bazik tamponlardaki farklı şişmeleri Şekil 2.7. de gösterilmiştir.

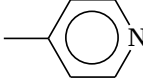


Şekil 2.7. pH-duyarlı anyonik ve katyonik hidrojellerin şişmesi

En çok çalışılmış pH-duyarlı hidrojeller poli(akriamid) (PAAm), PAA, PMAA, poli(dietilaminoetilmetakrilat) ve poli(dimetilaminoetilmetakrilat) içerir [13].

Çizelge 2.2. de pH ya duyarlı hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan monomerler verilmiştir [52,57].

Çizelge 2.2. pH-duyarlı hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan monomerler

| Tür      | Monomer                          | pH-duyarlı grup                                                                       |
|----------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Anyonik  | AA, Metakrilik asit              | -COOH                                                                                 |
|          | Sodyumstirensülfonat             | -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>                                         |
|          | Sülfoksietilmetakrilat           | -SO <sub>3</sub> H <sup>+</sup>                                                       |
| Katyonik | Aminoetilmetakrilat              | -NH <sub>2</sub>                                                                      |
|          | N,N-dimetilaminoetilmetakrilat   | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                                     |
|          | N,N-dietilaminometakrilat        | -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                                     |
|          | Vinilbenziltrimetilamonyumklorür | -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>                        |
|          | Vinilpiridin                     |  |

### 2.1.6. Kimyasal çapraz bağlanma ile hidrojel hazırlanması

Kimyasal çapraz bağlanma ile hidrojel hazırlanması, doğrusal veya dallanmış homopolimer ya da kopolimerin az miktarda çapraz bağlayıcı kullanılarak doğrudan çapraz bağlanması ile gerçekleştirilir [6]. Bu tepkime çözelti içinde (genellikle biomedikal uygulamalar için sulu çözelti) süspansiyon polimerizasyonu ile yürütülür. Çapraz bağlayıcı olarak, hidroksil grubu ile birlikte iki ya da daha fazla fonksiyonel grup içeren maddeler kullanılır. En çok kullanılan çapraz bağlayıcılara gluteraldehit, formaldehit ve asetaldehit gibi aldehitler, maleik asit, okzalik asit, dimetilüre, poliakrolein, diizosiyanatlar, divinilsülfat, (EGDMA), etilenbisakrilamid, seryum içeren redoks sistemler, 1,3-butandiol diakrilat, N,N-metilen bisakrilamid örnek olarak verilebilir.

Kimyasal çapraz bağlanma ile hidrojel hazırlanmasında başlatıcı olarak anyonik ve radikalik başlatıcıların her ikisi de kullanılabilir. En yaygın kullanılan başlatıcılar, azobisisobutyronitril (AIBN) ile benzoil ya da kumil peroksit gibi peroksitlerdir [2]. Kimyasal yolla hidrojel hazırlanması dört basamakta oluşur: başlama, zincir büyümesi ve çapraz bağlanma, birleşme veya bölünme ile sonlanma. İlk önce çapraz bağlayıcılar varlığında birbirine kimyasal olarak bağlanan monomerler polimerleri oluşturur ve daha sonra monomerlerin bazılarının çapraz bağlayıcı ile yer değiştirip polimer zincirlerinin birbirine bağlanmasıyla da hidrojel oluşur [40].

### 2.2. IPN Tipi Hidrojellerin Önemli Kullanım Yerleri

Farklı yapılardaki iki veya daha fazla polimerin fiziksel ve kimyasal bileşimi spesifik ihtiyaçlar için gereken özelliklerin modifikasyonuna olanak sağlar. Örneğin; malzemelerin işlenmesinde kolaylık, esneklik ve darbe direnci, hava koşullarına dayanıklılık, kimyasal direnç, yanma direnci gibi özellikler kazandırabilir. Bu fiziksel özellikler, birleştirilen polimerlerin niteliklerine ve birleştirme yöntemine bağlıdır [58].

Biyolojik ve biyomedikal alanlarda kullanılmak üzere “akıllı jel” formunda IPN jeller sentezlenebilir. Örneğin; PAAm ve PAA kullanılarak sıcaklık duyarlı hidrojel yapılabılır. Bu IPN yapı sıcaklık artışına bağlı olarak şişer. Bunun nedeni hidrojinin yapısında bulunan hidrojen bağlarının sıcaklıktaki değişime bağlı olarak bir fermuar gibi açılıp kapanmasıdır. Çevresel koşullardaki değişimlere verdiği cevaplar, güçlü mekanik özelliklere sahip IPN ve yarı-IPN’lerin önemini artırmakta ve bu biyobozunur yapıların farmasötik ve biyomedikal alanda birçok uygulamada kullanımını gündeme getirmektedir [59].

CS ile hazırlanan IPN tipi hidrojel çöğunlukla kontrollü ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada GA ile çağraz bağlı CS ve PEO-g-PAAm gibi biyoyumlu polimerlerin fiziksel karışımları ile matriksler hazırlanmış, düşük miktarda graft kopolimer ve düşük çaprazbağ yoğunluğu ile yapılan mikrokürelerden ilaç salımının daha yüksek olduğu gözlenmiş. Böylece hazırlanan yarı-IPN hidrojel matrikslerin ilaç salımı için uygunluğu kanıtlanmış [60].

CS ile hazırlanan bir diğer IPN tipi hidrojelde ise NaCl çözeltisindeki poli(etilen glikol) makromer (PEGM)/CS hidrojellerinin eğilme davranışı ve bir elektrik alan tarafından çekimi incelenmiş, hidrojellerin eğilme hızının uygulanan voltaja ve hidrojel bileşimine bağlı olduğu bulunmuş. Uygulanan voltajın hızının ve uzunluğunun hidrojellerin deformasyonunu artırdığı tespit edilmiş [61].

Bir diğer çalışmada PAAm/poli(vinil prolidon) yarı-IPN hidrojel-Ag nanokompozitler hazırlanarak bu yapıların antibakteriyal aktiviteleri incelenmiştir. Bu nanokompozitlerin *Escherichia Coli* üzerindeki antibakteriyal aktivitesi olduğu belirlenmiş [62].

IPN tipi hidrojellerin dolgu bileşikleri, yapay diş yapımı, iyon değıştirici reçineler, sert kauçuk ve plastik malzeme yapımı, otomotiv sektörü,

boyanabilir araba parçaları, tabaka kalıplama bileşenleri, seçici geçirgen zarlar, ses ve titreşim sönümlenmesi, basınca duyarlı yapıştırıcılar ve kaplamalar gibi önemli kullanım alanları bulunmaktadır [63].

### 2.3. Kontrollü İlaç Salımı

Uzun yıllar ilaç alanındaki çalışmaların başlıca amacı, çeşitli hastalıkları tedavi edici yeni bir molekül geliştirmek olmuştur. Ancak araştırmaların uzun zaman alması, ekonomik yükü ve her zaman beklenen sonucu vermemesi alternatif arayışları başlatmıştır. Bu arayışlardaki amaç, hastanın tedavisinin yanı sıra yaşam kalitesini arttırmaktır. İlaç dozunu azaltma, dozlama aralığını uzatma, yan ve zararlı etkilerden arındırma hatta ilacı hedef bölgeye gönderme çalışmaları bu amaca yöneliktir ve bu beklentilere en iyi yanıt veren kontrollü salım sistemleridir.

Her ilacın kan serumundaki tedavi edici derişiminin alt ve üst sınırları vardır. Bu iki derişim değerin arasındaki değer “terapötik aralık” olarak tanımlanır. İlaç maksimum serum derişimi üzerinde toksik etki gösterirken, minimum serum derişimi altında ise etkisiz kalmaktadır.

Geleneksel ilaç verme şekilleri, etken maddeyi aniden salıveren sistemlerdir. Düzenli bir dozlama aralığı ile ilacın uygulanması sırasında sürekli olarak terapötik aralıkta kalması sağlanmaya çalışılır. Ancak geleneksel ilaç verme şekillerinde her doz uygulaması ile serum derişiminde dalgalanmalar olur. Bu dalgalanmaların giderilmesi için etken maddenin salım hızının yavaşlatılmasına çalışılmıştır [55,64].

Bütün ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlarken iki temel amaç söz konusudur. İlaç taşıyıcı sistem etkin maddeyi vücutta istenen organ veya dokuya taşıyarak en kısa zamanda istenen kan derişimini sağlamalı ve bu derişimi öngörülen süre zarfında devam ettirmelidir. İdeal olarak ilaç taşıyıcı sistemleri, etkin maddeyi istenen doku veya organa istenen hızda taşınmalıdır. Etkin maddeyi istenen

doku veya organa taşıyan sistemlere “hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler” denir [65-69].

Genellikle, membran ve matriks yapılı sistemler birkaç yüz veya daha küçük molekül ağırlıklı ilaçların kontrollü salımı için tasarlanmıştır. Proteinler gibi makromoleküllerin bu sistemlerden serbestleşmesinin, bu moleküllerin kullanılan polimerdeki geçirgenliğinin çok düşük olması nedeniyle, pratik öneme sahip olmayacağı düşünülmüştür. Örneğin normal olarak büyük molekülleri geçirmeyen etilen –vinil asetat kopolimeri gibi polimerlerden, metilen klorür gibi uçucu bir çözücü kullanılarak çözücü döküm yöntemiyle hazırlanan, toz halinde makromolekülleride içeren matrikslerde, makromoleküllerin serbestleşmesi için yeterli büyüklükte gözeneklerin olduğu bildirilmiştir [70].

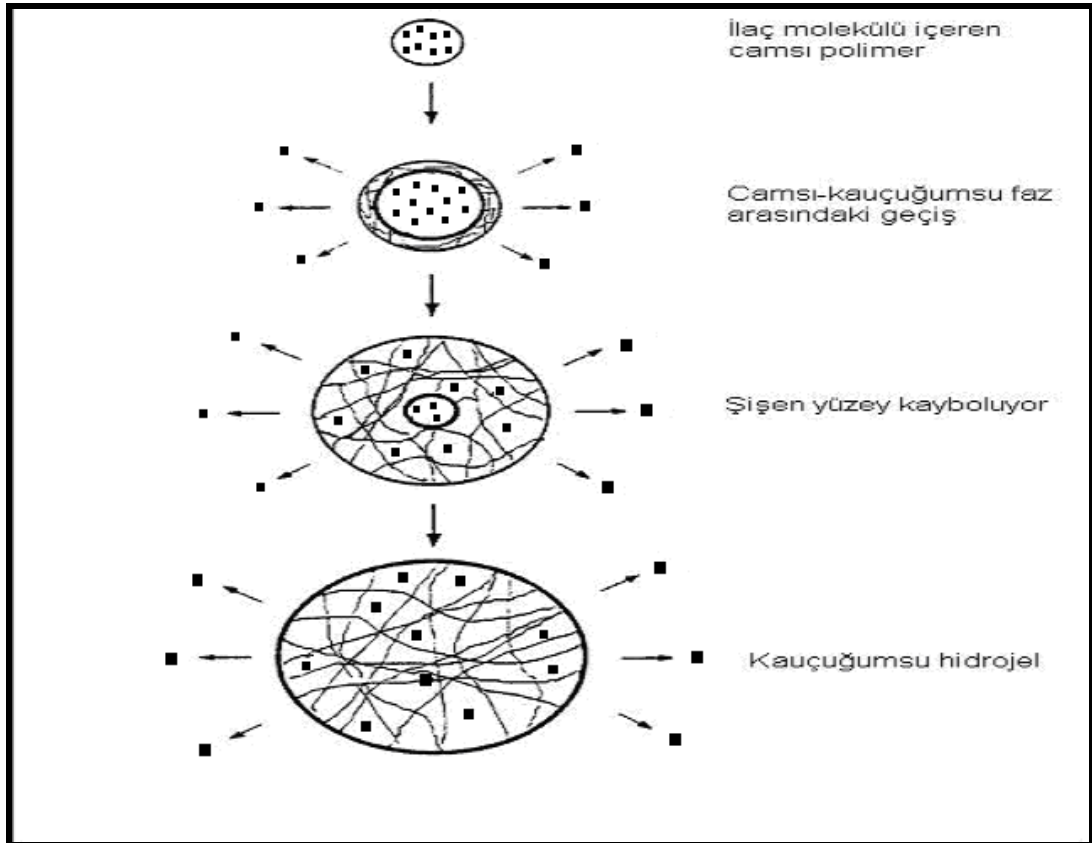
Hidrojellerin dinamik şişme davranışı polimerik ağ yapısı ve polimer-çözücü etkileşimleri ile kontrol edilebilir. İlaç camsı ağ yapı içine alındığı zaman su geçişi ilaç salımı ile ilişkili olarak kontrol edilir. Camsı ve kauçuğumsu ağların her ikisinde karakteristik şişme kinetiklerine sahiptir.

Şişme kontrollü ilaç salım aparatları bu prensip ile oluşturulur. İlaç başlangıçta şişen jel içinde dağılmış ya da çözünmüş durumdadır. Çözücünün buharlaştırılması ile içinde dağılmış bir şekilde biyolojik ajan bulunduran camsı polimerik matriks elde edilir. Bu sistem tipik şişebilen kontrollü salım sistemidir [71,72]. Şişme davranışı salımı doğrudan etkilemektedir. Salım mekanizmaları Fick yasaları ile açıklanabilmektedir

#### **2.4. Difüzyon davranışları ve Fick yasaları**

Salım mekanizmaları genel olarak Fick difüzyon yasaları ile ele alınır. Çünkü ilaç salımı, şişme olayı gibi temel olarak bir difüzyon meselesidir. Genel olarak, sistemlerin şişme davranışları Fick tipi (difüzyon kontrollü şişme) ve Fick olmayan tip (relaksasyon kontrollü şişme) olarak sınıflandırılır [25].

Başlangıçta etken madde camsı polimer içinde dağılmış ve çözünmüş olarak bulunmaktadır. Ancak çözücü matrikse girince, camsı geçiş sıcaklığı deney sıcaklığının altına düşer ve polimer şişer. Polimer etken maddenin difüzyonuna izin verir [73].



Şekil 2.8. Şişme kontrollü sistemden ilaç salımı ■ : İlaç molekülü

Camsı bir polimer tabakasından çözücü difüzyonuyla aynı anda fakat ters yönde oluşan etken madde salımı aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir [46,74,75].

$$M_t/M_\infty = k \cdot t^n \quad (2.1)$$

$M_t$ , t anında serbestleşen etken madde miktarını;  $M_\infty$ , sonsuz zamanda serbestleşen madde miktarını; k, ilaç-polimer sisteminin yapısal ve geometrik karakteristیکlerini içeren kinetik sabit (salım hız sabiti); t, serbestleşme

zamanını ve n etken madde serbestleşme mekanizmasını karakterize eden üstel sayıyı gösterir.

Eş. 2.1. camsı polimerlerden Fick yasasına uyan ve uymayan sistemler için difüzyonla salım mekanizmalarının birleştirilmiş halidir ve  $\ln (M_t/M_\infty)$  değerleri  $\ln (t)$  ye karşı grafiğe alındığında, difüzyon kinetiği ile ilgili k ve n büyüklükleri elde edilmiş olur [76].

Difüzyon katsayısı, D, polimerik sistemlerdeki bazı kimyasal türler için önemli bir salım parametresidir. n ve k kullanılarak D, Eşitlik 2.2. deki şekilde hesaplanabilir [77-79].

$$k = 4 (D / \pi r^2)^n \quad (2.2)$$

D, difüzyon katsayısını; r, hidrojin yarıçapını göstermektedir.

Kauçuğumsu ya da camsı polimerlerdeki etkili geçiş, sistemin sıcaklığına ve termodinamik aktivitesine bağlı olarak Fick, Fick olmayan (anormal), Durum II veya Süper Durum II geçişi olarak sınıflandırılabilir. Molekül ağırlığı, çapraz bağlanma derecesi, polimerin dallanma derecesi, çözücünün termal genişleme katsayısı gibi parametreler geçiş mekanizmasını etkiler [75,76,80].

Polimer şişmesinin dinamiğine bağlı olarak su ve ilacın bağıl hareketliliği Fick ve Fick olmayan ilaç geçişine neden olabilir. Gevşeme hızı ( $R_{\text{gevşeme}}$ ) difüzyondan ( $R_{\text{dif}}$ ) daha hızlı ise Fick difüzyonu gözlenir. Bu hidrojin kauçuğumsu halde olduğu  $T_g$  sıcaklığının üstünde meydana gelir [38]. Yani Fick difüzyonunda, su moleküllerinin hareketliliği polimer zincirlerinin gevşeme hızından daha yavaştır.

Ayrıca difüzyon hızı ( $R_{\text{dif}}$ ), düzlemsel geometride sürücü derişim hızının devamlı azalması yüzünden sürekli zaman ile azalır. Fick olmayan difüzyon

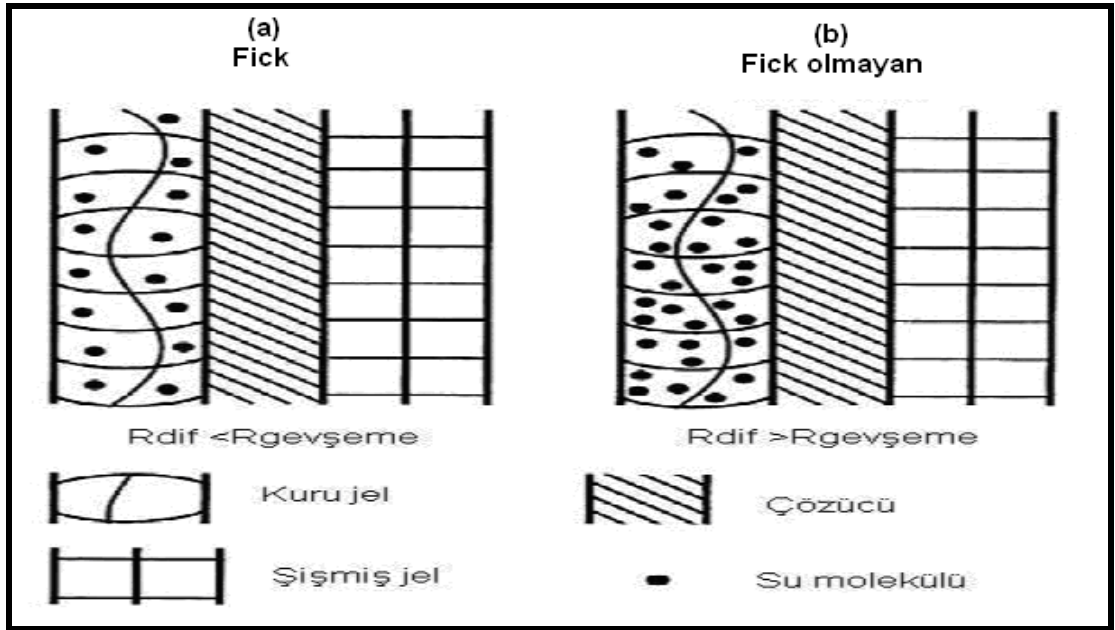
ile Durum II difüzyonu ise sırasıyla  $n$  üsteli değerleri Çizelge 2.3. te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Difüzyon ile serbestleşme mekanizmasının analizi

| n değerleri     |                   |                   | Geçiş mekanizması                 | $dM_t/dt$       |
|-----------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------|
| İnce Film       | Silindir          | Küre              |                                   |                 |
| 0,5             | 0,45              | 0,43              | Fick difüzyonu                    | $t^{-0.5}$      |
| $0,5 < n < 1,0$ | $0,45 < n < 0,89$ | $0,43 < n < 0,85$ | Fick'e uymayan (anormal) difüzyon | $t^{-n-1}$      |
| 1,0             | 0,89              | 0,85              | Durum II                          | 0. derece salım |
| $n > 1,0$       | $n > 0,89$        | $n > 0,85$        | Süper Durum II                    | $t^{-n-1}$      |

Çözünme ortamının (su, biyolojik sıvı vb.) polimer matriks içine nüfus etmesiyle çözücü içermeyen matriks şişmeye başlar ve iç kısımda camsı dış tarafta ise şişen kauçuğumsu faz olmak üzere iki farklı faz meydana gelir. Eğer polimer çözünme ortamı ile termodinamik olarak dengede ise matriksin camsı geçiş sıcaklığı ortam sıcaklığının altına düşer ve matriks kauçuğumsu duruma geçer. Bu ağ yapının plastikleşmesinden dolayı makromoleküler hareketliliğin önemli derecede artmasına ve hacim büyümesine neden olur. Ara yüzeyin her iki tarafıda bu şişme davranışı ile karakterize edilir. Kauçuğumsu bölgeden camsı bölgeyi ayıran bu yüzey “şişme ara yüzeyi” olarak adlandırılır. İlaç molekülleri polimerin kauçuğumsu bölgesinden dışarı difüzlenebilir. İlaç salımı, şişme ara yüzeyinin pozisyonu ve akış hızı ile kontrol edilir [25].

Fick ve Fick olmayan difüzyon Şekil 2.9. da şematize edilmiştir.



Şekil 2.9. Fick ve Fick olmayan difüzyon

Fick olmayan ve Durum II geçişleri difüzyon ve gevşeme mekanizmalarının arasındaki ilişkinin göstergesidir. Gevşeme, kauçuğumsu durumdan camı duruma geçişle ilişkilidir. Gevşeme mekanizması şişme boyunca polimerde oluşan gerilim sonucu oluşur. Durum II geçişinde suyun hareket kabiliyeti, segmental relaksasyon hızından daha büyüktür. Relaksasyon şişmiş ve plastikleşmemiş olan polimer arasında keskin bir sınırdadır ve bu da hız belirleyen basamaktır. Durum II geçişi tamamen polimer yapının gevşemesine bağlıdır ve zamanla doğru orantılıdır. Eşitlik 2.1. de açıkça görüldüğü gibi,  $n=1$  ise ilacın salım hızı zamandan bağımsızdır. Bu durum sıfırıncı derece kinetiğe uygundur. [38]. Birçok uygulamada arzu edilen mekanizma  $n$  üstelinin 1,0 olduğu sıfırıncı dereceden serbestleşmedir [76]. İlaç salımını kontrol etmek için Durum II difüzyon mekanizmasını kullanan araştırmacıların çalışmalarında, ilaç şişmemiş matrikste bulunmakta, şişme sınırı ilerledikçe ve polimer şiştikçe ilaç salım hızı artmaktadır. Böylece ilaç salımı matriksin şişme hızına uymakta, polimer yapı sıfırıncı dereceden salım göstermektedir [77,81].

Çizelge 2.3. de görüldüğü gibi “Durum II Difüzyonu”, geometrik faktörler nedeniyle küre ve silindirlerde görülmez. Bu nedenle küre ve silindirlerde  $n=1$  olması basit olarak Fick yasasına uymayan difüzyonu ifade eder [74,75].

Süper Durum II geçişlerine, çözücü ile polimerin temas etmesi durumunda sürücü güç olan ozmotik basınçta çok büyük artışlar olmaktadır. Böylece difüzyon hızı zamanla üstel bir biçimde artmaktadır [28,46,82].

## 2.5. Büyüme Faktörleri ve İşlevleri

Büyüme faktörleri serumda çok düşük derişimlerde ( $10^{-9}$  -  $10^{-11}$ M) bulunan ve dokuların büyüme gelişiminden sorumlu olan oligopeptit yapısındaki moleküllerdir. Hücre bölünmesini ve farklılaşmasını doğrudan uyan bu biyosinyal moleküller hücresel aktiviteleri değıştiren mekanizmaların anlaşılması açısından son derece değerli malzemeler haline gelmişlerdir [83].

Büyüme faktörleri hücre yüzeyindeki alıcılara bağlanarak farklılaşma ve çoğalmayı aktive ederler. Bazı büyüme faktörleri yüksek derecede özelleşmişken bazıları daha geniş bir etki spektrumuna sahiptir.

Büyüme faktörleri, hormonlar gibi hücre aktivitesini kontrol ederler ancak hormonların aksine bu düzenleme hücre-hücre düzeyinde gerçekleşir. Hormonların etki mekanizması oldukça geniştir. Kısa peptitler olan büyüme faktörleri hücreler arası sinyal iletimi yaparlar ve hücre aktivitesini düzenlerler. Günümüze kadar yaklaşık 130 adet büyüme faktörü tanımlanmıştır. Bazı durumlarda hücre dışına salgılanmayan hücre içi olarak salgılanan büyüme faktörlerine de rastlanır. Bunlar Golgi aygıtı gibi organellere direkt olarak etki ederler. Bazı tip büyüme faktörleri dışarı salgılanabilirler ancak hücrenin membranında aktive olabilirken diğerleri tamamen hücre dışına salınarak hücre dışı matriks’de (Extra-celluler matrix,

ECM) bazal lamina'da<sup>1</sup> heparin türü moleküllere bağlanır. Bundan sonra aktivasyon sinyali alınırsa buradan serbestleşirler.

Fazla sayıda büyüme faktörü tanımlandığı halde nadir bulunan moleküller oldukları için çoğu hakkında ayrıntılı bilgi edinilememiştir. Şu ana kadar bilinen belli başlı büyüme faktörleri Çizelge 2.4. te sunulmuştur.

Çizelge 2.4. Belli başlı büyüme faktörlerinin kökenleri ve etkileri

| Büyüme Faktörü                                                  | Kaynağı                                                   | Aktivitesi                                                                                      | Yorumlar                                                                                  |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| PDGF<br>(Platelet Kökenli<br>Büyüme Faktörü)                    | Plateletler, endotel<br>hücreler, plasenta                | Bağ dokusu, gliyal ve<br>yumuşak kas hücresi<br>çoğalması                                       | 3 farklı dimer formunda<br>bulunur; AA, AB ve BB.<br>A zinciri 125 aa<br>B zinciri 160 aa |
| EGF<br>(Epidermal Büyüme<br>Faktörü)                            | Sub-Maksiler<br>bezler, Brunner<br>bezi                   | Mezenşimal, glial ve<br>epitelyumial hücre çoğalması                                            |                                                                                           |
| TGF- $\alpha$<br>(Transforming<br>Büyüme Faktörleri- $\alpha$ ) | Transforme<br>hücreler                                    |                                                                                                 | EGF bağlantılı yara<br>iyileşmesinde rol oynadığı<br>düşünülmektedir                      |
| FGF<br>(Fibroblast Büyüme<br>Faktörü)                           | Pek çok farklı<br>hücre çeşidi                            | Pek çok hücre tipinin<br>çoğalması, erken embriyo<br>safhasında mezoderm<br>oluşumu             | En az 19 farklı üyeye sahiptir.<br>4 farklı reseptörü bulunur                             |
| NGF<br>(Sinir Büyüme<br>Faktörü)                                | Sub-mandibüler<br>tükütük bezlerinden<br>izole edilirler. | Nörit'lerin gelişimi, nöral<br>hücrelerin yaşamını<br>sürdürmesi                                | TrkA, trkB ve trkC proto-<br>onkogenlerinin transkribe<br>ettiği benzerleri bulunur.      |
| Eritropoitein                                                   | Böbrek                                                    | Eritrositlerin çoğalması ve<br>farklılaşması                                                    |                                                                                           |
| TGF- $\beta$<br>(Transforming<br>Büyüme Faktörleri- $\beta$ )   | T-helper ve NK<br>(doğal katil)<br>hücreler               | Yara iyileşmesi, anti-<br>enflamatuar özellik, makrofaj<br>ve lenfosit çoğalması<br>inhibisyonu | En az 100 farklı ailesine sahiptir                                                        |
| IGF-I<br>(İnsülin Bezleri<br>Büyüme Faktörleri-I)               | Karaciğer                                                 | Pek çok hücre çeşidinin<br>çoğalması                                                            | Somatomedin-C olarak da<br>bilinir. IGF-I ve proinsülin'e<br>benzerlik gösterir           |
| IGF-II<br>(İnsülin Bezleri<br>Büyüme Faktörleri-II)             | Karaciğer                                                 | Pek çok hücre çeşidinin,<br>özellikle fetal dönemde<br>çoğalması                                | IGF-I ve proinsülin'e benzerlik<br>gösterir                                               |

<sup>1</sup> Bütün epitelyum hücre tabakalarının altında uzanan esnek, ince, özelleşmiş hücre dışı yapı

Büyüme faktörleri, hücreleri birkaç mekanizma ile etkiler. Bu mekanizmalar aynı anda işlev gösterebilirler ve farklı dokularda farklı etkiler yaratırlar. Bu etkiler aşağıdaki alt başlıklarda ayrıntılı açıklanmıştır [84].

#### Mitojenik Aktivite:

Bu aktivite en erken keşfedilmiş mekanizmalarından biridir. Belirli derişimdeki büyüme faktörleri hücre bölünmesini oldukça yüksek oranda artırır. Mitoz bölünme pek çok büyüme faktörü tarafından sekonder hücre içi taşıyıcılarla uyarılır. Bu taşıyıcılara örnek olarak fosfodiesteraz, diacylglycerol ve c-kinaz verilebilir. Taşıyıcılar hücre içi kalsiyum iyonlarını ve pH'ı artırarak DNA sentezini artırır; sonuçta mitoz gerçekleşir. PDGF ve EGF, kalsiyum iyonu ve pH düzenlemesi ile mitozu artıran iki tipik büyüme faktörüdür.

#### Hücre Farklılaşması:

Diğer büyüme faktörleri hücre farklılaşmasını indükler ve mitoz bölünmeyi yavaşlatır. Buna klasik bir örnek olarak TGF- $\beta$  verilebilir. TGF- $\beta$  büyüme faktörü ailesinden en az bir tanesinin önemli bir hücre içi haberci olan tirozin kinaz aktivitesini yavaşlattığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra pek çok değişik yoldan farklılaşma indüklenebilir. TGF- $\beta$ 'nın bazı hücreleri farklılaştırarak ECM sentezlemelerini sağladığı düşünülmektedir. TGF- $\beta$ , aynı zamanda yine ECM bileşenleri olan kollajen, fibronektin, elastin ve glikozaminoglikanların sentezini de artırmaktadır.

#### Hücre Göçü:

Hücre göçü son derece karmaşık bir hücresel aktivitedir. Gerçekleşmesi için hücre dışı madde, büyüme faktörleri ve hücre için olaylar hassas bir uyum içinde olmalıdır. Pek çok büyüme faktörü hücre göçünü etkiler. Örneğin PDGF'nün BB dimeri vasküler yumuşak kas hücreleri için kemo-atraktan olarak görev görür. İlginçtir ki transgenik tavuk embriyoları ile yapılan

çalışmalarda FGF'nin de aynı aktiviteyi gösterdiği tespit edilmiştir. NGF hücre bölünmesini uyarmaz ancak nöronların yalancı ayak oluşturmasını ve göç etmelerini sağlar.

#### Gen Regölasyonu:

Mitoz ve farklılaşmayı etkileyen büyüme faktörleri genetik aktiviteyi de etkiler. Büyüme faktörleri son derece karmaşık hücre içi yollar vasıtası ile hücre içi pH'ı ve kalsiyum miktarını dolayısıyla genetik aktiviteyi ayarlarlar. IGF-2, NGF ve PDGF genetik regölasyon yapabilen büyüme faktörlerine örnek olarak verilebilir.

#### Reseptörler:

Bir reseptörün büyüme faktörü tarafından aktive edilmesi, pek çok biyokimyasal değişimi beraberinde getirir. Ancak nasıl meydana geldiği hala tam olarak anlaşılamamıştır. İkincil haberci moleküllerin büyüme faktörü aktivasyonundaki rolleri tartışılmazdır. Sistemin karmaşıklığına örnek olarak G proteinlerinden<sup>1</sup> bahsedilebilir. Tıpkı reseptörler gibi, G proteinleri de mambrana bağlıdır. Büyüme faktörü reseptöre bağlandığı zaman oluşan yapıda konformasyonel değişimler meydana gelir ve kompleksin G proteinine ilgisi artar. G proteini reseptör-büyüme faktörü kompleksinin yapısal olarak özelleşmiş bir bölgesine bağlanır ve G proteininden GDP (Guanozin difosfat) salgılanmasına yol açar. Hemen sonrasında GTP (Guanozin trifosfat) G proteinine bağlanır. G proteini GTP bağlı alfa alt ünitesi ve beta alt ünitesine ayrılır. Aktive edilmiş G proteininin iki alt ünitesi hücre aktivitesini direkt olarak etkileyen pek çok hücre içi enzimi etkiler. Alfa alt ünitesi siklik AMP seviyesini düzenleyen ve mitoz açısından kilit bir enzim olan adenilat siklaz'ın aktivitesini artırır. Beta alt ünitesinin ise iyon aktivitesini ayarladığı düşünölmektedir. G proteinleri hücre içi aktivitenin büyüme faktörlerince

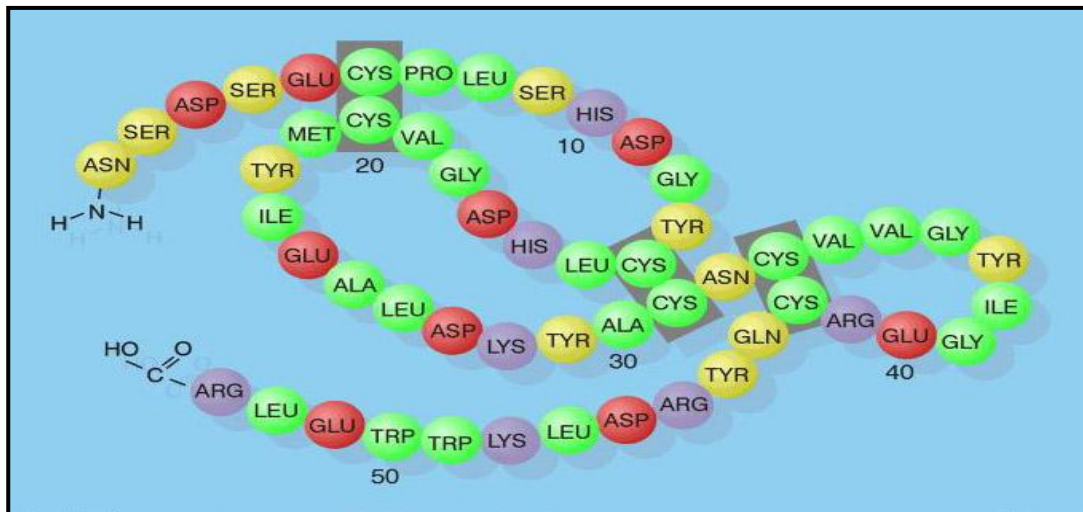
---

<sup>1</sup> reseptörlerden hücre içi hedef enzimlere bilginin iletiminden sorumlu moleküller.

düzenlenmesine tek örnek değildir. Enzim kullanılan diğer sekonder haberci sistemleri de -ki buna büyüme faktörü tarafından uyarılan tirozin kinaz verilebilir- hücre içi faaliyeti düzenlerler. Ancak tüm mekanizma henüz tamamı ile anlaşılmaktan uzaktır.

## 2.6. Epidermal Büyüme Faktörü

EGF ilk kez Dr. Stanley Cohen tarafından 1962 yılında erkek fare Submandibüler tükrük bezinden izole edilmiştir. Araştırmacı erkek fare Submandibüler tükrük bezlerinde Sinir Büyüme Faktörünü (NGF) izole etmeye çalışırken, bu bezlerden elde ettiği ekstrenin yeni doğan farelere enjekte edildiğinde erken göz kapağı açılışına ve erken diş çıkışına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve epidermis gelişimini hızlandırıcı etkisi nedeni ile bu maddeye “Epidermal Büyüme Faktörü” adını vermiştir [85]. EGF molekülünün aminoasit dizilimi Şekil 2.10. da sunulmuştur [86].



### Sekil 2.10. EGF molekülünün aminoasit dizilimi

EGF, 53 amino asitten oluşan üç disülfid bağına sahip bir oligopeptittir [84]. Genellikle tükürük bezlerinde bir arjinin esterase ile kombine olmuş bir durumda bulunur. Başka bir büyüme faktörü olan NGF ile biyosentezi ve

aktivasyonu açısından benzerlik gösterir, aynı genetik lokusun<sup>1</sup> kontrolünde oldukları düşünülmektedir. Bu hipotez her iki peptidin de androjen bağımlı olduğunun anlaşılmasından sonra daha da güçlenmiştir. Dokularda EGF salımı sinir sistemi kontrolündedir. EGF'nin embriyonik ve neonatal (yeni doğanla ilgili) aşamada dişlerin çıkması, gözlerin açılması ve deri oluşumu gibi özelliklerinin yanısıra normal, özellikle de epitel hücreler üzerinde pek çok etki gösterdiği bilinmektedir. Epitel dokuda EGF son derece hızlı bir biçimde hücrelere molekül taşınımını hızlandırır, bunu RNA sentezlenmesinde bir yükseliş ve ribozomların polizomlara dönüşüm oranında bir artış izler. EGF reseptöründe de intrinsik tirozin kinaz aktivitesi vardır. Reseptöre EGF bağlanır bağlanmaz reseptördeki kinaz domaini reseptörün tamamını ve çeşitli sinyal transdüksiyonu gruplarını fosforile ederek aktivasyonu gerçekleştirir [87]. Memelilerde bilinen biyolojik aktivitelerinden bazıları şunlardır [88].

- Epidermis'in oluşumunu, farklılaşmasını artırır ve keratince zengin tabaka oluşmasını sağlar.
- Cenin akciğer dokusunun büyüme ve olgunlaşmasını hızlandırır.
- Sindirim sistemi mukozasında ornitin dekarboksilaz aktivitesini ve DNA sentezini artırır.
- Korneal epitelyumda yara iyileşmesini, membran ve nükleer proteinlerin fosforilasyonunu hızlandırır.
- Mezodermal (orta deri ile ilgili) ve ekdodermal (üst deri ile ilgili) kökenli pek çok hücre tipi için çoğaltıcı etkilere sahiptir.
- Bazı kötü huylu hücre tipleri için negatif büyüme etkilerine sahiptir.

Hücre kültürü çalışmalarında insan sütünün pek çok hücre tipi için mitojenik olduğu gözlemlenmiştir. Deneysel çalışmalarla EGF'nin insan sütündeki büyümeyi arttırıcı temel molekül olduğu tespit edilmiştir [89]. Sindirim esnasında tamamen yok olmadığından sindirim kanalındaki dokuları direkt

---

<sup>1</sup> Bir genin RNA, DNA ya da kromozomdaki yeri

olarak etkilediği düşünülmektedir. EGF'nin bir diğer ilgi çekici özelliği ise bitkilerde gelişmeyi ve kök oluşumunu indüklemesidir. EGF ve EGF benzeri maddelerin bitki üretkenliğini artırdığı düşünülmektedir [90].

EGF'nin korneal endotelyal hücreler, fibroblastlar, sinir sistemi destek dokusu hücreleri üzerinde mitojenik aktiviteye sahip olması, gastrik asit salgılanmasını yavaşlatması, embriyonun gelişmesi ve yeni kan damarlarının oluşması üzerinde etkili bulunması sonucu üzerinde yoğun çalışmalar yapılmıştır. EGF'nin yara iyileşmesi sırasında epidermisin farklılaşması ve kontrollü hücre çoğalmasında etkili olduğu görülmüştür [91]. Yara bölgesine topikal olarak da uygulandığı zaman iyileşmeyi hızlandırır. Sıçanlarda sub-mandibüler bezlerin cerrahi müdahale ile alınmasıyla meydana gelen gastrik ülser vakalarının EGF'nin intragastrik olarak uygulanması sonucu iyileştiği tespit edilmiştir [92]. Aynı zamanda mezodermal kökenli hücreler için mitojenik olmasından ötürü anjiyogeneizde de rol alır [93].

Tüm bunlara ek olarak, bir gastrik asit inhibitörü olan ürogastron ile büyük oranda benzerlik göstermektedir. EGF'nin 53 amino asidinden sadece 16'sı ürogastrondan farklı olduğu gibi, neonatal farelerde gözlerin açılması gibi etkilere sahip olan ürogastron fonksiyonel olarak da EGF'ye benzerlik gösterir. Ürogastron tükrük bezleri tarafından salgılanan, polipeptid yapıda idrar ekstresi; midenin hidroklorik asit salgısının inhibitörüdür. Bu bulgulara dayanarak, ürogastronun EGF'nin hormonal benzeri olduğu söylenebilir. Fibroblast hücrelerinde de aynı reseptörü paylaştıkları belirlenmiştir.

## 2.7. Büyüme Faktörlerinin Kontrollü Salımı

Büyük bir doku hasarının *in vivo* onarımı için uygulanacak çeşitli stratejiler vardır [85]. Eğer yenilenecek doku yüksek bir rejenerasyon etkisine sahipse, yerleştirilen biyo-absorplanabilir bir polimer iskeleye çevredeki sağlıklı dokudan gelecek olgunlaşmamış hücreler ile yeni doku oluşumu başlayabilir. Ancak, eğer rejenerasyon kapasitesi azsa, örneğin hücre ve büyüme

faktörünün derişimi düşükse dokuda beklenen iyileşme görülmeyecektir. Bu durumda en basit yöntem bölgeye hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını başlatacak büyüme faktörlerinin sağlanmasıdır. Ancak, genellikle bir büyüme faktörünün yaklaşık bir gün içerisinde hasarlı bölgeden yok olmasıyla sonuçlanmaktadır. Büyüme faktörünün biyolojik etkilerini tam olarak gösterebilmesi için kontrollü salım sistemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu konuda ümit vadeden bir teknik, büyüme faktörünün uygun bir taşıyıcıya yüklenmesi ve bu taşıyıcıdan uzun bir süre boyunca salınarak etki göstermesidir. Böylelikle büyüme faktörü proteolizden<sup>1</sup> de korunmuş olarak aktivitesini *in vivo* koşullarda uzun süre sürdürebilir.

Yapılan bir çalışmada deri bozukluklarının iyileşmesi için EGF içeren çift tabakalı bir yara örtücü hazırlamak amaçlanmıştır. Bu amaçla toksik olmayan, yüksek vücut sıvısı absorplama kapasitesine sahip, içerisinde makromoleküllerin ve büyüme faktörlerin salım oranları kontrol edilebilir, yumuşak materyaller kullanılmıştır. Histolojik incelemeler sonucunda, EGF yüklü, biyobozunur materyallerin biyoyumlu olduğu görülmüştür [94]. Bir diğer çalışmada korneal epitelyum bozukluk üzerine yerleştirilmiş katyonik jelatin hidrojelden EGF'nin kontrollü salımı ile okuler yüzeydeki yara iyileşmesinin hızlandığı tespit edilmiştir [95].

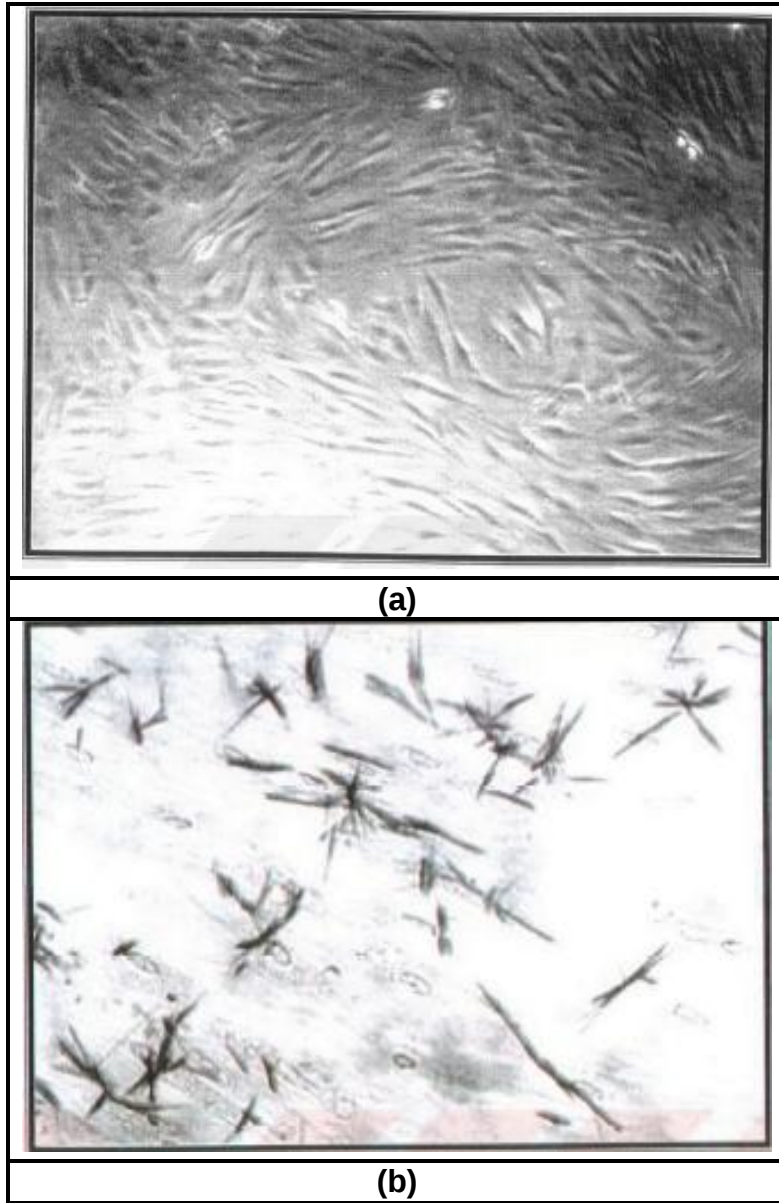
## 2.8. Hücre Çoğalmasının Takibinde Kullanılan MTT Yöntemi

Sitotoksisite çalışmalarında en sık kullanılan *in vitro* enzimatik test MTT'dir. Bu test mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesini ölçer. MTT'nin ana komponenti 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoliumbromiddir. Fosfat tamponu ile çözündürülen MTT sarı renklidir. Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri MTT nin tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen mor-mavi renkli formazan kristallerini oluştururlar. Bu kristaller asitlendirilmiş isopropanol içinde çözünürler. Sonuçta elde edilen mor çözelti

---

<sup>1</sup> Albuminoid ya da proteinik maddelerin erimesi ve sindirilmesi

spektrofotometrik olarak ölçülür. Hücre sayısındaki artma veya azalma, hücre sayısı ile bağlantılı olarak oluşan formazan miktarında değişmeye neden olur. Spektrofotometrik ölçüm sonucu elde edilen değer test edilen materyalin toksisitesini belirler. Şekil 2.11. de MTT testinden elde edilebilecek genel bir görüntü sunuldu [96].



Şekil 2.11. (a) Fibroblast hücreler (b) Oluşan formazan kristalleri

## 2.9. Çalışmada Kullanılan Bazı Önemli Maddeler

### 2.9.1. Fibroblast Hücre

Embriyonal bağ dokudan oluşur. Henüz farklılaşmamış ve embriyoda bulunan bir bağ doku tipidir. Hücreleri yıldız şeklinde uzantılı ve büyüktür. Bu hücrelere fibroblast denir. Fibroblast uzantıları komşu hücre uzantıları ile bağlantılıdır. Hücreler arası, jelatinimsi bir madde ile doludur. Matriks veya esas madde adı verilen bu ara madde tek tük kollajen lifler içerir. Bu liflerin miktarı fetüsün yaşına paralel olarak artar [97].

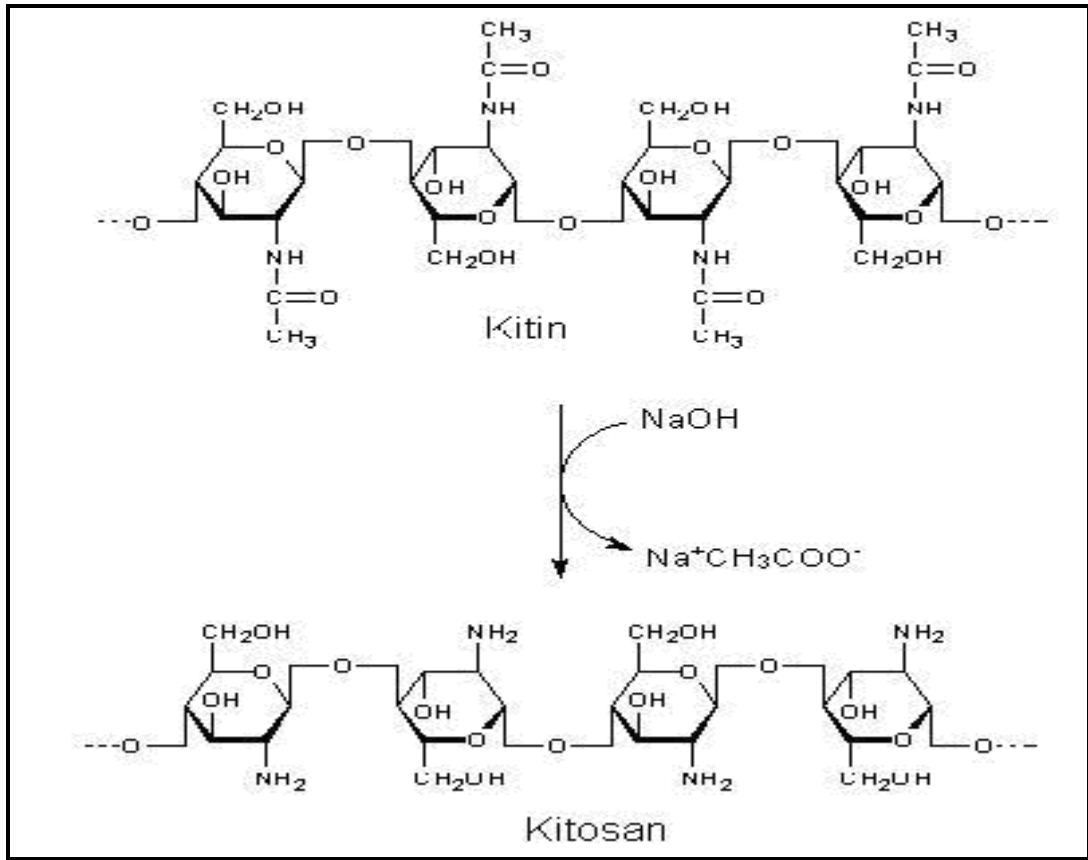
Fibroblastlar hücre dışı matriks salgılanmasından, doku formuna göre oluşan hücre dışı matriksin bağlanmasından ve yara iyileşmesinin kolaylaştırılmasından sorumludur. Deri kesildiğinde fibroblastlar çoğalırlar ve yaraya doğru göç ederek yarığı doldururlar. Çoğalma sırasında geniş ölçüde hücre dışı matriks salgırlar. Hücre kültüründe çoğalan fibroblastlar tek sıra halindedir ve çoğalmaları kontakt inhibisyon ile kontrol altındadır [98].

### 2.9.2. Kitosan

CS kitinin N-asetillenmiş türevidir [99]. Kitin; uzun ve dallanmış yapıya sahip bir polisakkarittir. Selülozun ikinci karbonunda bulunan  $-OH$  grubunun  $-NHCOCH_3$  grubu ile yer değiştirmiş türevi olarak düşünülebilir. Genel olarak bazı deniz kabuklularının, yumuşakçaların ve böceklerin kabuklarında yer almaktadır [100-102].

Kitin, poli(N-asetil-2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glikopiranoz) olarak adlandırılır ve burada N-asetil-2-amino-2-deoksi- $\beta$ -D-glikopiranoz (veya glikozamin) grupları (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$  bağları ile bağlanır [103,104]. CS, kitinin alkalik deasetilasyon ile elde edilen bir poliamininosakkariddir ve amorf yapıdadır. Kitinden kitosan elde tepkimesi Şekil 2.12. de sunulmuştur.

Molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi kitosanın yüzey yük yoğunluğunu, kristalinitesini, çözünürlüğünü, enzimatik degradasyonunu ve hücre etkileşimlerini etkilemektedir. Deasetilasyon derecesinin yüksek olduğu yapılarda hücre yapışmasının daha fazla olduğu ve biyodegradasyon hızının yüksek olduğu belirlenmiştir [105,106].



Şekil 2.12. Kitinden Kitosan elde ediliş tepkimesi

CS amorf yapıda katı bir polimerdir. Pratik olarak suda hemen hemen hiç çözülmez; formik asit ve asetik asit gibi organik asitlerin sulu çözeltilerinde çözünür. Suda çözmek için hafif asidik ortamlar oluşturulmaktadır [107,108]. CS ve suda çözünen türevi hidroksipropil CS toksik olmayan ve vücutta enzimatik olarak parçalanabilen bir polimerdir [109].

CS nin özellikleri N-asetil grubunun süstitüsyon derecesine, polimerizasyon derecesine ve üretim prosesi ile kullanılan kitinin özelliklerine bağlı olarak olarak değişmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, doğal kaynaklı, ucuz ve üretimi çevreye zarar vermeyen özellikleri nedeniyle CS, oldukça fazla ilgi gören bir malzeme haline gelmiştir [110]. Biyouyumlu ve toksik olmayan yapısı ile vücut içerisine implante edilebilen ya da enjekte edilebilen sistemlerde kullanım alanı bulmaktadır [111]. Bunlara ek olarak, lizozomlar gibi vücut içerisindeki enzimlerle hidroliz yoluyla parçalanabilen biyobozunur bir yapıdır [112].

CS kontrollü salım sistemlerinde çok kullanılır ve bu amaçla mikroküre, implant ve insertleri hazırlanmıştır [113]. CS kullanımını cazip kılan bazı özellikleri ve bu özelliklerle ilgili uygulamaları Çizelge 2.5 de özetlenmiştir [114,115].

Çizelge2.5. Kitosanın özellikleri ve uygulamaları

| Alan                  | Uygulamalar                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fizikokimyasal</b> | Atık su arıtımı, Boyalar için bağlayıcı, Değişik ayırma membranları, Ultrafiltrasyon, gaz ve sıvı ayırma; Kromatografik destek materyali; Fiber; Kâğıt imalatı                                                                              |
| <b>Biyomedikal</b>    | Parçalanabilen sutureller; Yapay deri ve böbrek membranları; Sert ve yumuşak lens; Ameliyet ambalajları; Hücre kültürü; İmmobilize enzim destek materyali; Yara-yanık örtü materyali; Spesifik protein/enzim adsorpsiyonu; Diş kompozitleri |
| <b>Farmasötik</b>     | Geciktirilmiş salım materyali; Tablet bağlayıcı, stabilizer gibi katkı                                                                                                                                                                      |
| <b>Besin</b>          | Besin antistaling ajan; Besin katkıları; Tohum kaplama, Toprak iyileştirme; Kozmetik ürünleri                                                                                                                                               |

### 2.9.3. Akrilik Asit (AA)

AA oda sıcaklığında renksiz ve kokulu bir sıvıdır. Su ve birçok organik çözücü ile karışabilir. AA ticari açıdan iki sınıfta incelenir: esterleşme tepkimeleri için olan teknik sınıf (% 94 lük) ve suda çözünen reçine üretimi için olan derişik sınıf (kütlege % 98,0 - 99,5 ve kütlege maksimum % 0,3 ü su) tır.

AA ısıya, ışığa veya metallere maruz bırakıldığında çok kolay polimerleşir. Bu yüzden kuvvetli bir ekzotermik polimerleşmeden korunmak için ticari AA içerisine polimerleşme inhibitörü eklenir [116].

AA nın kimyasal yapısı ve bazı özellikleri Çizelge 2.6 de sunulmuştur.

Çizelge 2.6. AA'in kimyasal yapısı ve bazı özellikleri

|                             |                               |
|-----------------------------|-------------------------------|
| Kimyasal yapısı             | $\text{CH}_2 = \text{CHCOOH}$ |
| Molekül ağırlığı (g/mol)    | 72,0                          |
| Donma noktası (°C)          | 13,5                          |
| Yoğunluk (g/mL)             | 1,045 (25,0 °C )              |
| Normal kaynama noktası (°C) | 141,0                         |
| Refraktif indeksi           | 1,4185 (25,0 °C )             |
| Kinematik viskozitesi (cks) | 1,1 (25,0 °C)                 |

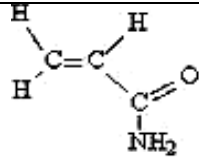
Kolayca polimerleşmesi ve hidrofilik özelliklerinden dolayı pek çok uygulama alanına sahiptir. AA; tekstil materyallerinin modifiye edilmesinde, plastiklerde, kâğıt imalatında, dış cephe boyalarında, zemin cilalarında, zemin ve duvar kaplamalarında, otomobil, araç-gereç ve mobilya verniklemede, eczacılıkta kontrollü ilaç salım sistemlerinde çok fazla kullanım alanlarına sahiptir bir maddedir.

Bioadhesive hidrojel olarak hem mukozaya yapışan hemde viskozite arttıran polimer olarak PAA jelleri hiyalüronikasit sodyum tuzudur. PAA jelleri genel olarak insertlerden daha rahat kullanılır ve gözde merhemler gibi bulanıklık yapmaz [117].

#### 2.9.4. Akrilamit (AAm)

Renksiz ve kokusuz bir madde olan AAm oda sıcaklığında kristal yapıdadır. Su, metanol, etanol, dimetil eter ve aseton içerisinde çözünürken benzende ve heptanda çözünmez. Monomeri erime noktasında veya UV ışığı altında anında polimerleşir. Katı AAm oda sıcaklığında kararlı haldeyken, eridiğinde veya yükseltgen ajanlarla etkileştirildiğinde şiddetle polimerleşir. Ayırştırmak için ısıtıldığı zaman, zehirli bir gaz, keskin bir duman ve çeşitli NO gazları yayar. Eğer yüksek sıcaklıklara kadar ısıtılırsa patlayabilir [118]. Akrilonitrilin sülfürik asitle tepkimesinden elde edilen AAm'in kimyasal yapısı ve bazı özellikleri Çizelge 2.7 da sunulmuştur.

Çizelge 2.7. AAm'in kimyasal yapısı ve bazı özellikleri

|                              |                                                                                       |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Kimyasal yapısı              |  |
| Molekül ağırlığı (g/mol)     | 71,1                                                                                  |
| Erime noktası (°C)           | 85,0                                                                                  |
| Yoğunluk (g/mL)(25 °C)       | 1,13                                                                                  |
| Normal kaynama noktası (°C)  | 125,0                                                                                 |
| Sudaki çözünürlüğü (g/100mL) | 216,0                                                                                 |

AAm banyo üretiminde, yapıştırıcılarda, kağıt ve tekstil sanayisinde atık arıtma işlemlerinde, cevher işlemede, çeşitli reaksiyonlarda çapraz bağlayıcı olarak kullanılır [119]. Çeşitli polimerlerin modifikasyonlarında aşırı kopolimer

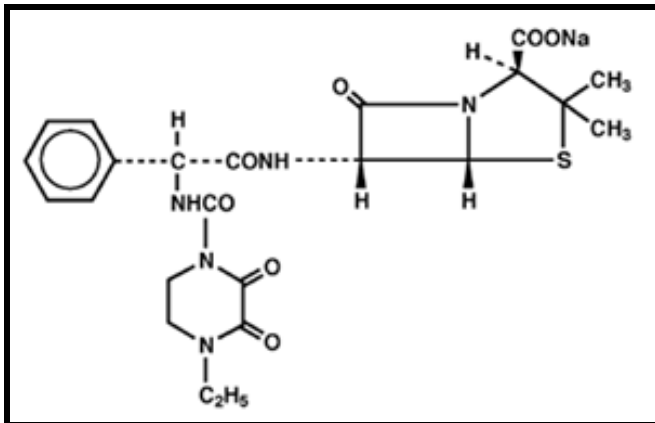
olarak yer almaktadır [120,121]. Ayrıca kontrollü ilaç salım sistemlerinde çok geniş bir uygulama alanına sahiptir [122].

### 2.9.5. Piperasilin/Tazobactam

Piperasilin, *Pseudomonas aeruginosa* da etkili olan geniş spektrumlu bir yarı sentetik üreidopenisilindir. Molekül kütlesi 539,5 g/mol dür. Kimyasal formülü Şekil 2.13 te sunulmuştur.

Diğer penisilinler gibi piperasilin de kromozomal ve plazmid kaynaklı laktamazlarla hidrolize olabilir. Antibakteriyal etkisi zayıf olmakla beraber karşılaştığı çeşitli kromozomal ve plazmid kaynaklı laktamazları inhibe edebilen tazobaktam, sulbaktamdan ve klavulanik asitten daha güçlü bir laktamaz inhibitörüdür [123].

Piperasilinin etki spektrumunu kromozomal veya plazmid kaynaklı laktamaz üreten pek çok *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram-negatif bakteriyi kapsayacak şekilde genişletir; ayrıca *Bacteroides fragilis*'i de kapsayan oldukça geniş bir anti-anaerob etkinlik ekler [124].



Şekil 2.13. Piperasilinin kimyasal formülü

Piperasilin tazobactam, piperasilinden elde edilir ve daha etkili bir inhibasyon sağlar. Ticari ürünü Tazocin EF adı altında satılmaktadır. Steril liyofilize Tazocin EF tozunu içeren flakonlar 25 °C'nin altındaki oda sıcaklığında saklanmalıdır. Çözeltiler, talimat doğrultusunda sulandırıldıklarında buzdolabında (2 - 8 °C) 48 saat, oda sıcaklığında 24 saat dayanıklı kalırlar. Seyreltilmiş çözeltiler buzdolabında (2 - 8 °C), intravenöz torba veya şırıngalar içinde 48 saat dayanıklı kalır. Kullanılmayan çözeltiler atılmalıdır.

Tazocin EF nin farmokinetik özellikleri şu şekilde verilebilir:

Metabolizma: Doruk plazma derişimlerine, enjektörle kas içine ilaç verildikten sonra 40 ile 50 dakikada; ilaç, kan ürünleri veya beslenme ürünlerinin belli bir sürede toplardamar yoluyla verilmesi ile ise derhal ulaşılır. Sağlıklı yetişkinlerde, tek veya çoklu dozları takiben, Tazocin EF kombinasyonunun plazma eliminasyon yarılanma ömrü 0,7 ile 1,2 saat arasında değişir. Bu yarılanma ömürleri tek başına doz veya infüzyon süresinden etkilenmezler.

En yaygın uygulama yolu, toplardamar içinden topluca ve hızlı ilaç enjeksiyonudur. Bununla beraber, intramüsküler enjeksiyonu takiben piperasilin ve tazobaktamın ortalama mutlak biyoyararlanımları sırasıyla % 71 ve % 84'dür. 30 dakikalık intravenöz infüzyonun ardından Tazocin EF, plazma derişiminin genellikle % 50 ila 100'ü ortalama doku derişimlerini oluşturacak şekilde dokulara dağılır. Tazocin EF derişimleri safra kesesi, safra, apendiks, barsak mukozası, akciğer ve kas gibi iyi perfüze edilen dokularda en yüksektir. Piperasilin insanlarda metabolize olmaz.

Eliminasyon: Piperasilin, öncelikle böbreklerden, idrarda dozun % 68'i hiç değişmemiş ilaç halinde atılır. Safrada % 2'ye varan oranlarda piperasilin dozu saptanmıştır. Piperasilin atılımı, tazobaktamla birlikte alınmasından etkilenmez.

Tazobaktam, öncelikle böbreklerden, idrarda dozun % 80'i değişmemiş ilaç ve kalan doz da metabolit olarak atılır. Her bir bileşiğin büyüklüğü, böbrek yoluyla atılımın glomerüler filtrasyon ve net aktif tübüler sekresyon ile gerçekleştiğini düşündürür. Tazobaktamın idrarla atılımı, tahminen böbrekte kanı süzme ve idrar oluşturma görevi olan salgı bezi tarafından salgılanan madde rekabetine bağlı olarak piperasilin varlığında azalmaktadır.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu bölümde sürdürülen deneysel çalışmalar ayrıntıları ile açıklanmıştır.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihazlar

- ✕ Cs (Aldrich, FW. 161) (%75-85 deasetilasyon derecesi)
- ✕ AA (Aldrich)
- ✕ AAm (Aldrich)
- ✕ EGDMA (Aldrich)
- ✕  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (Merck)
- ✕  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (BDH)
- ✕ EGF (Sigma, E4127)
- ✕ Borik asit (BDH)
- ✕  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Merck)
- ✕  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck)
- ✕ NaOH (Merck)
- ✕ Asetik asit (Merck)
- ✕ Etanol (Riedel-de Haën, 32221)
- ✕ Fare fibroblast hücresi, L929 (No; 92123004, ŞAP Enstitüsü, Ankara)
- ✕ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma)
- ✕ Fetal bovine serumdan (FBS) (Sigma)
- ✕ Trypsin/EDTA (Sigma)
- ✕ Tripan mavisi çözeltisi (Sigma)
- ✕ Piperasilin/Tazobactam (Wheyt)
- ✕ 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kaplarına (Nunc, Danimarka)
- ✕ İnkübatör (Binder)
- ✕ Etüv (Ultralab U-120)
- ✕ Terazî (Scaltec)
- ✕ Su banyosu (Mettler)
- ✕ Manyetik karıştırıcı (Şimşek Labortechnik)
- ✕ pH metre (Cyberscan 500)

- ✕ Mikronmetre (Newman, Carbon Steel Caliper)
- ✕ Freeze-dryer da (Christ-Alfa 2-4 Model)
- ✕ Scanning Electron Microscope (SEM)(Jeol, Jsm-6060LV)
- ✕ CO<sub>2</sub> etüvü (Heraus Instruments, Almanya)
- ✕ Laminar Akış Ünitesi (Bioair, Typell Laminar Flow Cabinet, İtalya)
- ✕ Ependorf tüpü (RVS Orange, cat no: 2505007)
- ✕ Hemositometre (Neubauer)
- ✕ Optik mikroskop (Olympus IX71, Japonya)
- ✕ Dijital kamera (Olympus C-400, Japonya)
- ✕ UV spektrofotometresi (Labomed Double Beam UV-visible spektrofotometre, ABD)

### 3.2. Hidrojellerin Hazırlanması

CS-AA-AAm içeren hidrojeller temel olarak radikalik polimerleştirme yoluyla üretildi [125-129]. Bunun için % 1'lik CS/Asetik asit, 6M AA/su ve 6M AAm/su çözeltilerinden Çizelge 3.1. de açıklanan mol oranlarına denk gelecek hacimlerde alınarak karışımlar hazırlandı. Bu karışımlar içlerine çapraz bağlayıcı olarak 0,1 mL EGDMA ve başlatıcı olarak 0,05g/0,05g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 / (\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  redoks başlatıcı çifti ilave edilerek hızla petri kaplarına aktarıldı. Tam IPN elde etmek için ise EGDMA'ın yanı sıra CS'ı çapraz bağlamak üzere değişen miktarlarda GA içeren çözelti ilavesi gerçekleştirildi. Oda şartlarında 30 dakika beklendikten sonra ortamdan alınarak 0,5x1,0 cm şeritler halinde kesilen tabakalar tekrar oda şartlarında bir gece bırakıldı. Daha sonra bol saf su içinde defalarca yıkanarak polimerleşmeye girmeyen bileşenlerin uzaklaşması sağlandı ve bu numuneler sabit tartıma gelinceye kadar önce havada, daha sonra 37 °C de etüvde 48 saat kurutuldu. Kuru örneklerin ortalama kalınlıkları kompas ile ölçüldü ve 2,0-3,0 mm aralığında olduğu belirlendi.

Çizelge 3.1. Hidrojellerin hazırlanmasında kullanılan bileşenlerin miktarları

| Bileşenler<br>Hidrojel    | CS (g) | AA<br>(mol) | AAm<br>(mol) | GA<br>( $\text{kütle} \times 10^5$ , g) | Yorum          |
|---------------------------|--------|-------------|--------------|-----------------------------------------|----------------|
| (CS-PAA) <sub>Y</sub> -1  | 0,025  | 0,03        | -            | -                                       | Sert-sağlam    |
| (CS-PAA) <sub>Y</sub> -2  | 0,035  | 0,03        | -            | -                                       | Sert-sağlam    |
| (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -1 | 0,025  | -           | 0,03         | -                                       | Sert-sağlam    |
| (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2 | 0,035  | -           | 0,03         | -                                       | Sert-sağlam    |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -1  | 0,025  | 0,03        | -            | 3,125                                   | Yumuşak-sağlam |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -2  | 0,035  | 0,03        | -            | 3,125                                   | Yumuşak-sağlam |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -3  | 0,025  | 0,03        | -            | 15,625                                  | Yumuşak-sağlam |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -4  | 0,025  | 0,03        | -            | 31,250                                  | Sert, kırılğan |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -5  | 0,025  | 0,03        | -            | 62,500                                  | Sert, kırılğan |

### 3.3. Hidrojellerin Jelleşme Yüzdelерinin Gravimetrik Olarak Tayini

Bölüm 3.2. de belirtilen şekilde hazırlanan hidrojel tabakalar sabit tartıma gelene kadar etüvde kurutuldu ( $m_i$ ), sonra 250,0 mL saf su içine konularak ve su banyosu sürekli tazelenerek 48 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda sudan çıkarılan hidrojel tabakalar tekrar sabit tartıma gelene kadar kurutuldu ( $m_s$ ). Her bir hidrojin jelleşme yüzdeleri Eşitlik 3.1. kullanılarak hesaplandı [130,131].

$$\text{Jelleşme Yüzdesi} = \frac{m_s}{m_i} \times 100 \quad (3.1.)$$

### 3.4. Hidrojellerin Şişme Deneyleri

Bu bölümde hidrojellerin zaman, sıcaklık ve pH değişimlerine karşı şişme davranışlarının incelenmesi anlatıldı. Tüm deneyler jelleşmeye girmeyen bileşenlerinden yıkanarak arındırılmış üçer örnek üzerinden yürütüldü. (CS-PAA)<sub>T</sub>-4 ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-5 hidrojelleri sert ve kırılğan olduğundan, şişme deneylerine tabi tutulamadı.

#### 3.4.1. Hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişiminin incelenmesi

Hidrojellerin şişme değerlerinin zamanla değişimi 37 °C de 48 saat süreyle incelendi. Etüvde kurutulup sabit tartıma getirilen şerit şeklindeki kuru hidrojeller ilk tartımları alındıktan sonra ( $w_0$ ), 50,0 mL Britton-Robinson (BR) tamponu (bkz. Ek:1) (pH=7,4) içeren ağzı kapalı şişelere konuldu. Belirli zaman aralıklarında ortamdan alınan hidrojeller, yüzeyleri hafif bir şekilde kâğıtla kurularak tartıldı ( $w$ ) ve tekrar şişme ortamına konuldu. Bu işleme hidrojeller denge şişme değerine ulaşmaya kadar devam edildi ve hidrojel şeritlerinin kütlelerindeki değişimler kaydedildi. Her bir hidrojin yüzde şişme (%Ş) değeri Eşitlik 3.2. kullanılarak hesaplandı [132].

$$\% \text{ Ş} = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100 \quad (3.2)$$

w = Şişirilmiş hidrojel kütlesi,

w<sub>0</sub> = Kuru hidrojel kütlesi

### 3.4.2. Hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişiminin incelenmesi

Hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi pH=7,4 de denge şişme değerinin elde edildiği 30 saat süreyle incelendi. Etüvde sabit tartıma getirilen (w<sub>0</sub>) şerit şeklindeki kuru hidrojeller, 50,0 mL BR tamponu içeren ağzı kapalı şişelere konuldu. Hidrojellerin şişme değerlerine sıcaklık etkisi 4,0; 10,0; 20,0; 30,0; 37,0; 40,0; 50,0 ve 60,0 °C sıcaklıklarında incelendi. Her sıcaklıkta, denge şişme süresi olan 30 saat bekletilen örnekler bulundukları ortamdan uzaklaştırıldı ve yüzey sularının fazlası bir kâğıtla alındıktan sonra tartıldı (w). % Ş değerleri Eşitlik 3.2. kullanılarak hesaplandı [133].

### 3.4.3. Hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişiminin incelenmesi

Hidrojellerin şişme değerlerinin pH ile değişimi 37 °C de 30 saat süreyle incelendi. Etüvde kurutulup sabit tartıma (w<sub>0</sub>) getirilmiş olan şerit şeklindeki hidrojeller, 50,0 er mL pH=2,0; pH=4,0; pH=6,0; pH=8,0; pH=10,0 ve pH=12,0 BR tamponu içerisine konuldu. 37 °C sıcaklıkta 30 saat bekletildikten sonra ortamdan çıkarıldı, kurulandı ve tartıldı (w). Hidrojellerin % Ş değerleri Eşitlik 3.2. kullanılarak hesaplandı.

### 3.5. Hidrojellerin SEM (Scanning Electron Microscope) İncelemeleri

(CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerinin kuru halleri ve şişmiş hallerinin morfolojik özellikleri, SEM ile çekilen yüzey fotoğraflarından belirlendi. Şişmiş hidrojellerin gözenek yapısının gözlenebilmesi için örnekler

önce  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  deki bir derin dondurucuda 24 saat bekletildi ve daha sonra  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  deki bir freeze-dryer da bir hafta tutuldu. Tüm örnekler yüzeylerinin iletken hale getirilmesi için  $200\text{ }^{\circ}\text{A}$  kalınlığında altın-platin karışımı ile kaplandı ve SEM incelemeleri gerçekleştirildi.

### **3.6. EGF Çalışması**

#### **3.6.1 Hidrojellere EGF yüklenmesi**

Yaklaşık  $175\text{ mm}^3$  hacminde, 10 mg kütlesinde hazırlanan  $(\text{CS-PAA})_{\gamma}-2$  ve  $(\text{CS-PAAm})_{\gamma}-2$  hidrojellerin 1,5 mL;  $(\text{CS-PAA})_{\tau}-2$  hidrojelinin ise 2,5 mL PBS içerisinde şişerek dengeye geldiği tespit edildi. 25 mL steril PBS içerisinde 1 mg EGF'nin çözülmesiyle hazırlanan stok çözeltiden ( $0,04\text{ mg/mL}$ ) gerekli seyreltmeler yapılarak belirlenen miktarlardaki EGF, her üç hidrojele de emdirildi. EGF miktarı her bir örnekte 1,0 ; 2,0 ve 4,0  $\mu\text{g}$  olacak şekilde ayarlandı (Her tür jel örneği için birim kütle başına düşen EGF miktarları 0,1  $\mu\text{g/mg}$ , 0,2  $\mu\text{g/mg}$ , 0,4  $\mu\text{g/mg}$ ' dir).

#### **3.6.2 EGF yüklü hidrojellerin sterilizasyonu**

Yükleme işlemi steril PBS içerisinde gerçekleştirilen örnekler öncelikle %70'lik etanolde 10 dakika bekletildi. Daha sonra 15 dakika boyunca UV ile muamele edilerek sterilizasyon işlemi tamamlandı.

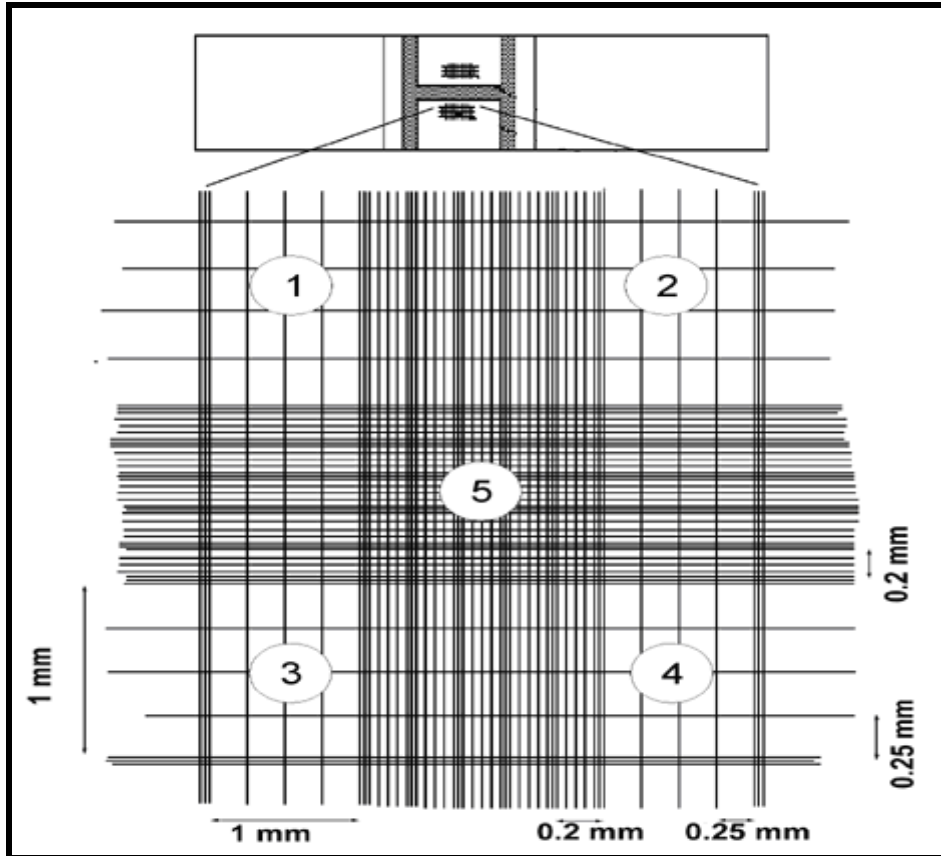
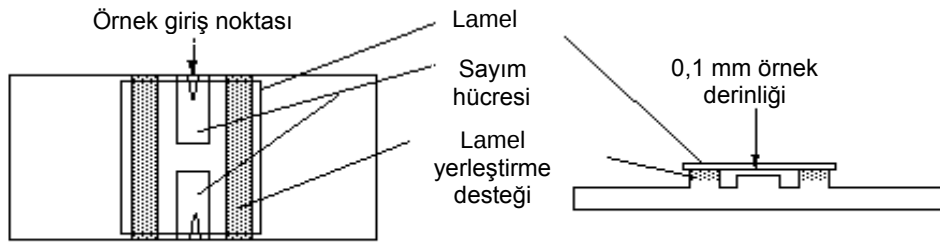
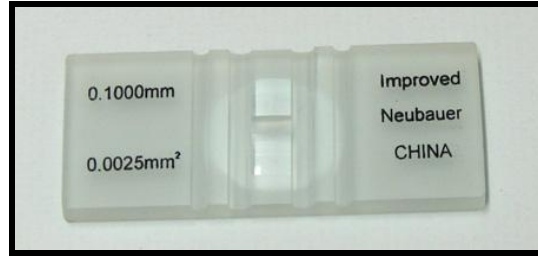
#### **3.6.3 Hücre kültür çalışmaları**

Hücre kültürü çalışmalarında HÜKÜK hücre bankasından temin edilen L929 fare fibroblast hücreleri kullanıldı. Ampuller içerisinde  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de dondurulmuş olarak saklanan hücreler hızlı bir şekilde  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' deki su banyosuna alınarak çözüldü ve santrifüjlendikten sonra (1000 rpm, 4 dakika) besi ortamı içerisine alındı. Besi ortamı; DMEM ve %10 FBS dan oluşmuştur. Hücreler,  $25\text{ cm}^2$  ve daha sonra  $75\text{ cm}^2$ 'lik hücre kültür kaplarına ekildi. 2. pasajdaki hücreler

yüzeyde tek tabaka oluşturdudan sonra % 0,01 tripsin/10 mM EDTA çözeltisi kullanılarak tripsinizasyon yöntemi ile yüzeyden koparıldı ve tekrar santrifüjlendikten sonra besi ortamı içeren 24-gözlü hücre kültür kaplarına ekimleri gerçekleştirildi. Başlangıçtaki hücre derişimi  $5 \times 10^4$  hücre/mL olarak belirlenmiştir. Hücreler her bir göze 1 mL besi ortamı içerisinde süspanse halde konuldu. Sterilizasyonu gerçekleştirilmiş hidrojel örnekler her bir göze yerleştirildi. Aynı zamanda kontrol grubu (TCPS, 1 mL ortam içerisinde hücre süspansiyonu) ve serbest EGF grubu da kullanıldı. 5 günlük çalışma süresi boyunca hücreler 37 °C' de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi. Hücreler ile yapılan ve steril ortam gerektiren tüm işlemler Laminar Akış Ünitesi'nde gerçekleştirildi.

#### 3.6.4 Hücre sayımı

Ependorf tüpüne 0,9 mL % 0,4'lük tripan mavisi çözeltisi (Bkz. EK-5) konuldu. Sayımı yapılacak olan hücre süspansiyonundan 0,1 er mL alınarak bu tüpteki boya çözeltisi içerisine ilave edildi. Böylece hücreler 1:10 oranında seyreltilmiş oldu. Süspansiyon köpük oluşturmuyacak şekilde dikkatlice homojenize edildi. Hemositometre lamı ve lameli alkol ile temizlendi ve lamel lam üzerine yerleştirildi. 0,05 mL kadar boyanmış hücre süspansiyonu alındı ve hemositometrenin lamı ile lameli arasına yavaşça akıtıldı. Işık mikroskobu yardımıyla, 10X objektif kullanılarak hemositometrenin tüm karelerindeki canlı hücreler (boya almayan, parlak sarı renkte görülen hücreler) sayıldı. Sayım sırasında en sağdaki üçlü çizgiden başlayarak küçük karelerin içindeki tüm hücreler, sağ çizgi üzerindikiler ve en üst çizgi üzerindikiler sayılarak yukarıya, daha sonra yandaki küçük kareden aynı prensiple aşağıya doğru inildi ve alt çizgidekiler de sayıldıktan sonra yandaki küçük karelere geçildi. Böylece tüm alan sayılınca kadar devam edildi. Neubauer laminın görüntüsü Şekil 3.1 de verilmiştir. Sayım sırasında 1, 2, 3 ve 4 numarayla gösterilen büyük karelerdeki hücrelerin tamamı sayılır.



Şekil 3.1. Neubauer lamininin görüntüsü

Ölü hücreler (içine boya almış hücreler) de aynı şekilde sayıldıktan sonra mililitredeki canlı hücre yoğunluğu ve canlılık oranı aşağıdaki formüller

yardımıyla hesaplandı. Hücre yoğunluğunun sayılamayacak kadar fazla olması durumunda PBS ile belli oranda seyreltme gerçekleştirilir ve bu yeni seyreltme faktörü üzerinden hesaplamalar yapılır.

$$\text{Canlı yada ölü hücre yoğunluğu (hücre/mL)} = \frac{\text{Hücre sayısı} \times \text{Seyrelme oranı} \times 10^4}{4} \quad (3.3)$$

$$\text{Canlılık oranı (\%)} = \frac{\text{Sayılan canlı hücre miktarı}}{\text{Sayılan toplam hücre miktarı}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.6.5 MTT Testi

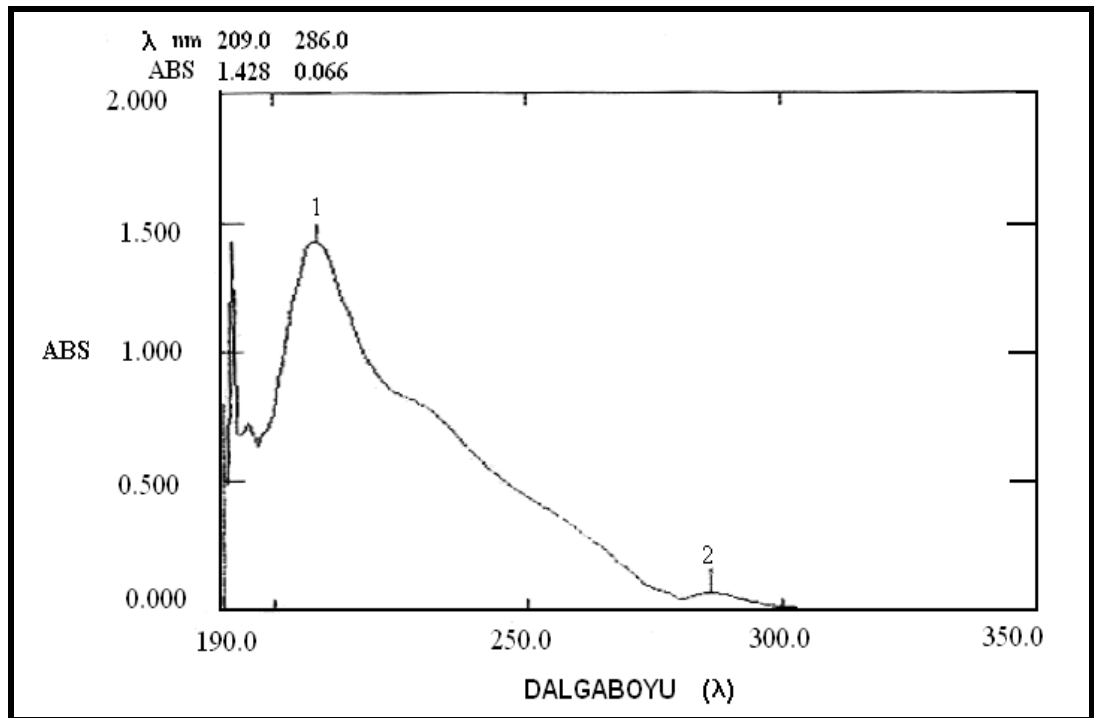
1, 2, 3, ve 5. günlerde hücre canlılığı MTT testi ile kontrol edildi. Öncelikle hidrojel örnekleri içeren petrilerdeki hücrelerin üzerinde bulunan ortam uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir göze 600 µL serumsuz ortam ve 60 µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) ilave edildi. Hücreler bu şekilde 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> etüvünde 3 saat inkübe edildikten sonra üzerlerindeki ortam çekildi ve 400 µL isopropanol/ HCl (0,1 M) çözeltisi konuldu. Son olarak her bir örnekten 200 µL alınarak 570 nm'de UV spektrofotometresi ile absorbans değerleri ölçüldü. Absorbansı ölçülen madde, canlı hücrelerin mitokondrilerinde MTT den dönüşen formazandır ve formazan kristallerinin asitlendirilmiş isopropanolde çözünmesi sağlanmıştır. Böylece formazan kristallerinin yoğunluğuna bağlı olarak hücre canlılığı hakkında bilgi edinildi. MTT testinin yanı sıra hücrelerin optik mikroskop altında incelenmesi ve dijital kamera ile fotoğraflarının çekilmesi suretiyle morfolojik karşılaştırmalar da yapıldı.

### 3.7. Piperasilin/Tazobactam Salımının İncelenmesi

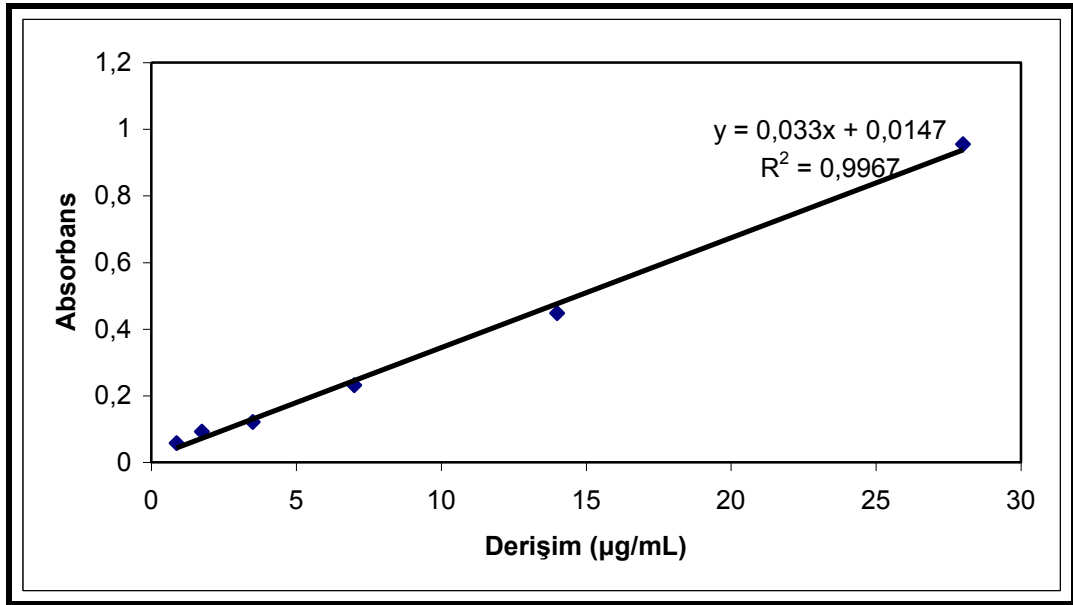
Sunulan çalışmada, (CS-PAA)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub> ve (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojellerden Piperasilin/Tazobactam salımı incelendi. Söz konusu hidrojeller birbirlerinden farklı içeriklerde olmaları ve şişme değerlerinin yüksek olmaları nedeniyle seçildi. Deneylerin ayrıntıları aşağıdaki alt başlıklarda verildi.

### 3.7.1. Piperasilin/Tazobactam'ın UV-Spektrofotometrik Analizi

Piperasilin/Tazobactam ilaç salımının takip edilebilmesi için öncelikli olarak 0,028 mg/mL'lik su-piperasilin çözeltisinin UV spektrofotometresinde 190–800 nm dalga boyları arasında tam spektrumu alındı ve zirve absorbans verdiği dalga boyu  $\lambda_{\max} = 209,0$  nm olarak belirlendi. Elde edilen spektrum Şekil 3.2. de sunulmuştur. Daha sonra farklı derişimlerdeki Piperasilin/Tazobactam çözeltilerinin 209,0 nm de absorbansları ölçülerek Piperasilin/Tazobactam için kalibrasyon doğrusu hazırlandı. Çizilen bu doğru deney süresince salınan Piperasilin/Tazobactam derişimini belirlemekte kullanıldı. Piperasilin/Tazobactam'ın kalibrasyon doğrusu Şekil 3.3. de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Piperasilin/Tazobactam'ın tam spektrumu



Şekil 3.3. Piperasilin/Tazobactam'ın kalibrasyon doğrusu ( $\lambda_{\max} = 209,0 \text{ nm}$ )

### 3.7.2. (CS-PAA)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojellerine Piperasilin/Tazobactam yüklenmesi

Bölüm 3.2. de anlatıldığı gibi hazırlanan (CS-PAA)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub> ve (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojellerine Piperasilin/Tazobactam emdirme yöntemiyle yüklendi. Bunun için 1,0 mg/mL, 10,0 mg/mL ve 15,0 mg/mL'lik Piperasilin/Tazobactam çözeltileri hazırlandı. Hidrojeller 30 saat süre ile bu çözeltide şişirilerek yükleme işlemi yapıldı. Yükleme işlemi sırasında belirli saatlerde çözeltilerden numuneler çekilip 209,0 nm de absorbansları okunarak çözeltinin derişiminde önemli bir değişiklik olmadığı belirlendi.

### 3.7.3. (CS-PAA)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojellerinden Piperasilin/Tazobactam salımının UV-Spektrofotometresi ile tayini

Kapaklı cam şişelerde bulunan 100 er mL su içerisine Piperasilin/Tazobactam yüklenmiş jeller konuldu. Bu ortamdan belirli saatlerde alınan 100 er µL örneklerin 209,0 nm deki absorbans değerleri ölçüldü. Alınan örnek miktarları çok az olduğundan çalışma süresince “sink”

koşulların (etkin maddenin herhangi bir t anındaki derişiminin doygunluk derişiminin %15'inden daha az olması) sağlandığı kabul edildi. Çalışma oda koşullarında ve 37,0 °C de 24 saat süreyle yürütüldü ve hidrojellerden Piperasilin/Tazobactam salımı absorbans-derişim grafiğı yardımıyla belirlendi.

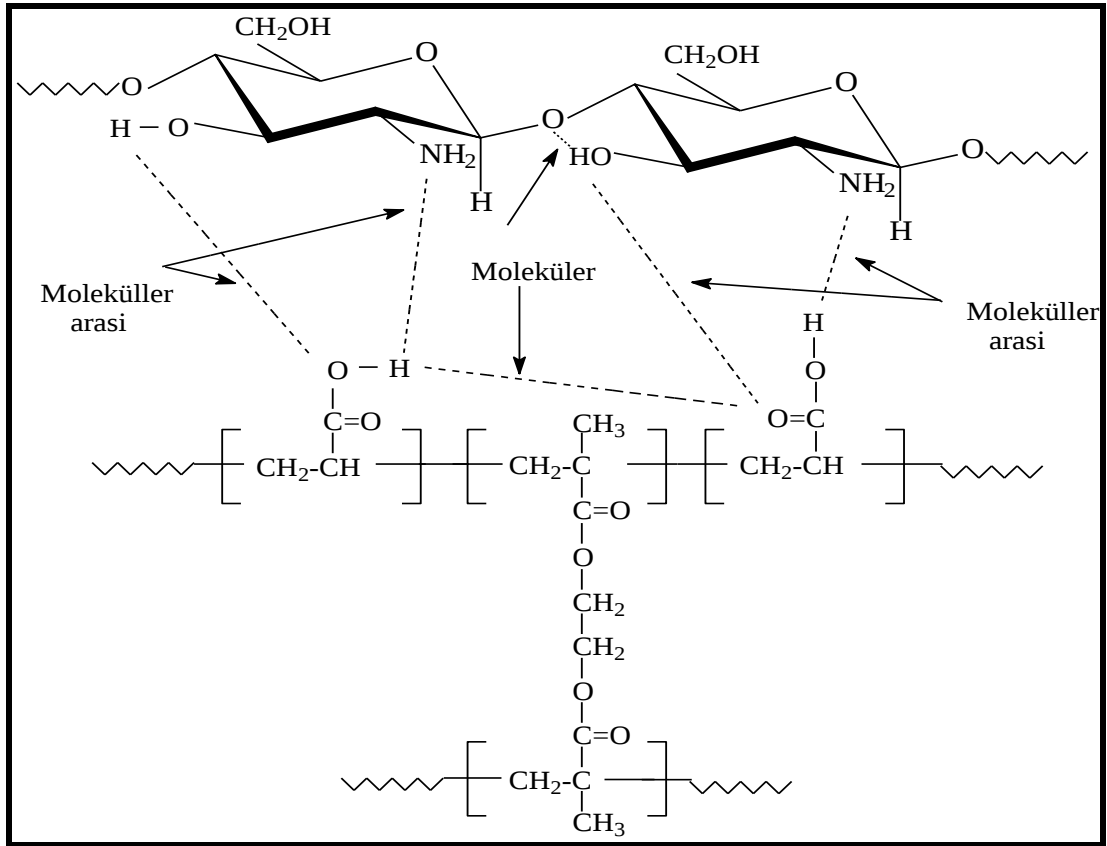
#### 4. DENEYSEL BULGULAR VE YORUM

Bu bölümde deneysel kısımda açıklanan yöntemlerin uygulamalarından elde edilen sonuçlar yorumları ile beraber alt başlıklar halinde sunulmuştur.

##### 4.1. Hidrojel Oluşumu

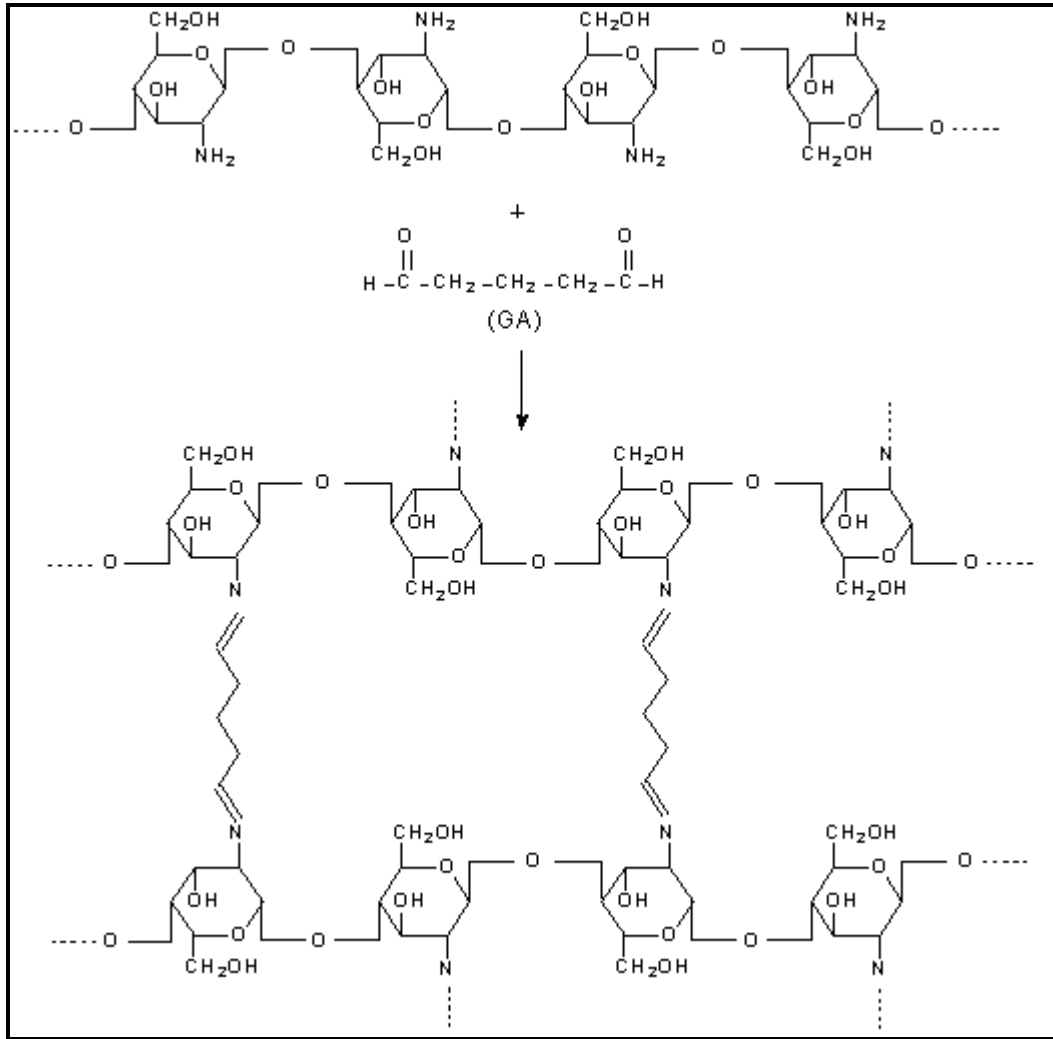
Tam ve yarı-IPN tipi hidrojel oluşumuna bileşenlerin etkilerini incelemek üzere Çizelge 3.1. de verilen oranlar kullanılmıştır. Elde edilen hidrojellerin 7 adedinin kullanıma uygun sağlamlıkta olduğu belirlenmiştir. Ancak GA artırılarak hazırlanan  $(CS-PAA)_T-4$  ve  $(CS-PAA)_T-5$  hidrojellerinin, kullanılamayacak kadar sert ve kırılgan olduğu gözlenmiştir. Bu durum çapraz bağlanma oranının artmasıyla yapının sıkılaşması ve esnekliğinin azalması şeklinde açıklanabilir. Söz konusu örnekler çalışma kapsamının dışında tutulmuştur.

Üretilen yarı-IPN tipi hidrojellere ait olası bir şema Şekil 4.1. de sunulmuştur. Bu şemada AA in, amonyum persülfat / sodyummetabisülfid başlatıcıları ve EGDMA çapraz bağlayıcısı eşliğinde polimerleştiği önerilmektedir [134]. CS ın yarı-IPN tipi hidrojelde misafir polimer olarak yer aldığı düşünülen örneklerimizde, CS ile ev sahibi polimer ağ yapı arasında olası H-bağları da söz konusu olabilir [135,136]. Benzer tepkimelerin AAm için de söz konusu olduğu düşünülebilir.



Şekil 4.1. Üretilen yarı-IPN tipi hidrojellerdeki moleküler ve moleküller arası bağların şematik gösterimi

CS içeren tam-IPN tipi hidrojellerimizde, GA CS moleküllerini çapraz bağlamada kullanılmıştır. Bu tepkime Şekil 4.2. de şematize edilmiştir [137]. Bu şekilde hem çapraz bağlı PAA ve hem de çapraz bağlı CS zincirlerinin iç içe geçtiği ağ yapıların kurulduğu düşünülmektedir. Aynı durum PAAm içeren IPN yapılar için de öngörülmektedir.



Şekil 4.2. GA ile kitosan arasındaki çapraz bağlanmanın şematik gösterimi

#### 4.2. Hidrojellerin Jelleşme Yüzdeleri Sonuçları

Bölüm 3.3. te anlatıldığı şekilde yürütülen yüzde jelleşme deneylerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1. de sunulmuştur. Çizelgede görülen sonuçlar şunlardır: PAA içeren hidrojellerin jelleşme oranları çok yüksek, PAAm içeren hidrojellerin jelleşme oranları ise nispeten düşüktür. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA ın daha çok AA yapısına uygun olmasının bu duruma yol açtığı düşünülebilir.

Çizelge 4.1 Hidrojellerin jelleşme yüzdeleri.

| Hidrojel                  | Jelleşme Yüzdesi |
|---------------------------|------------------|
| (CS-PAA) <sub>Y</sub> -1  | 95,37            |
| (CS-PAA) <sub>Y</sub> -2  | 95,08            |
| (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -1 | 91,64            |
| (CS-PAAm) <sub>Y</sub> -2 | 89,75            |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -1  | 92,23            |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -2  | 93,87            |
| (CS-PAA) <sub>T</sub> -3  | 94,19            |

### 4.3. Hidrojellerin Şişme Deneyleri Sonuçları

Üretilen hidrojellerin şişme deneyleri Bölüm 3.4. de anlatıldığı şekilde yürütülmüş ve sonuçlar alt başlıklar halinde sunulmuştur.

#### 4.3.1. Hidrojellerin % şişme değerlerinin zamanla değişimi

Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin zamanla değişim sonuçları Ek-2 de verilmiş ve ayrıca Şekil 4.3. deki grafikte sunulmuştur.

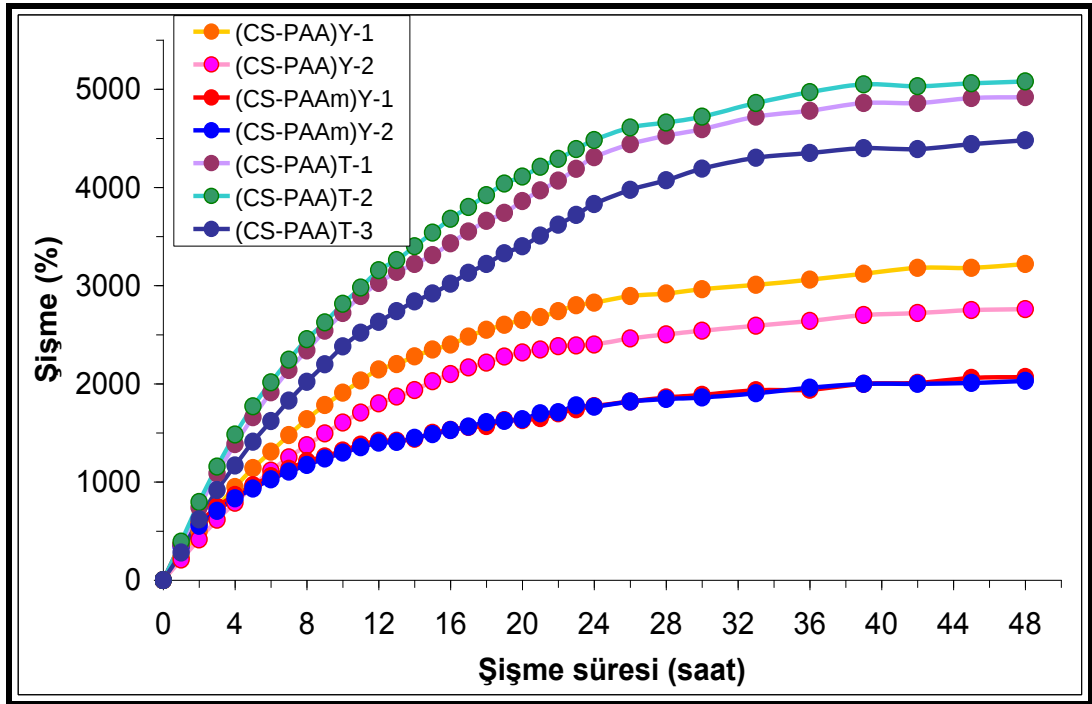
Şekil 4.3. de görüldüğü gibi, tüm hidrojellerin % Ş değerleri zamanla artmış ve yaklaşık 30 saat civarında dengeye ulaşmıştır. Sabit kaldığı bu % Ş değeri daha sonra yapılan deneylerde denge şişme süresi olarak kullanılmıştır [12,138,139].

Şekil 4.3. e genel olarak bakıldığında, CS ın fazla kullanıldığı (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerinin şişme değerlerinin, CS ın az kullanıldığı (CS-PAA)<sub>Y</sub>-1, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-1 ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-1 hidrojellerinin şişme değerlerinden pek farklı olmadığı belirlenmiştir. Bu durumda kullanılan CS miktarları kapsamındaki değişikliklerin şişme olayını fazlaca etkilemediğini söyleyebiliriz. Şişme değerleri literatür ile mukayese edildiğinde, CS ilavesinin saf PAA ve saf PAAm hidrojellerine göre şişme değerini önemli

oranda arttırdığı söylenebilir [140]. Örneğin saf PAA den daha önceki çalışmalarımızda aynı yöntemle üretilen hidrojin şişme değeri % 2300 ler civarında iken, sunulan çalışmada CS ilaveli PAA hidrojinin şişme değerinin % 3000 lere yaklaştığı gözlenmektedir [79]. Bu durumda, gerek CS in hidrofilik yapısı ve gerekse yarı-IPN tipinin getirdiği özellikler, şişme değerini arttırmıştır. Aynı yöntemle üretilen PAAm hidrojinine ait şişme değeri ise, literatürde % 700 ler civarında verilmektedir [134,140]. Bu çalışmada CS ilaveli PAAm hidrojinin şişme değeri % 2000 lere yaklaşmıştır. Buradaki keskin artış, yine CS in hidrofilikliği ve yarı-IPN tipi hidrojinlerin yapısal özelliklerine bağlıdır.

AA içeren hidrojinlerin AAm içeren hidrojinlere göre çok daha fazla şiştikleri diğer bir gözlemdir. Bu durum AA in iyonikleşebilen yapısı ile açıklanabilir. Ayrıca AA in AAm e göre daha hidrofilik olduğu da bilinmektedir [79].

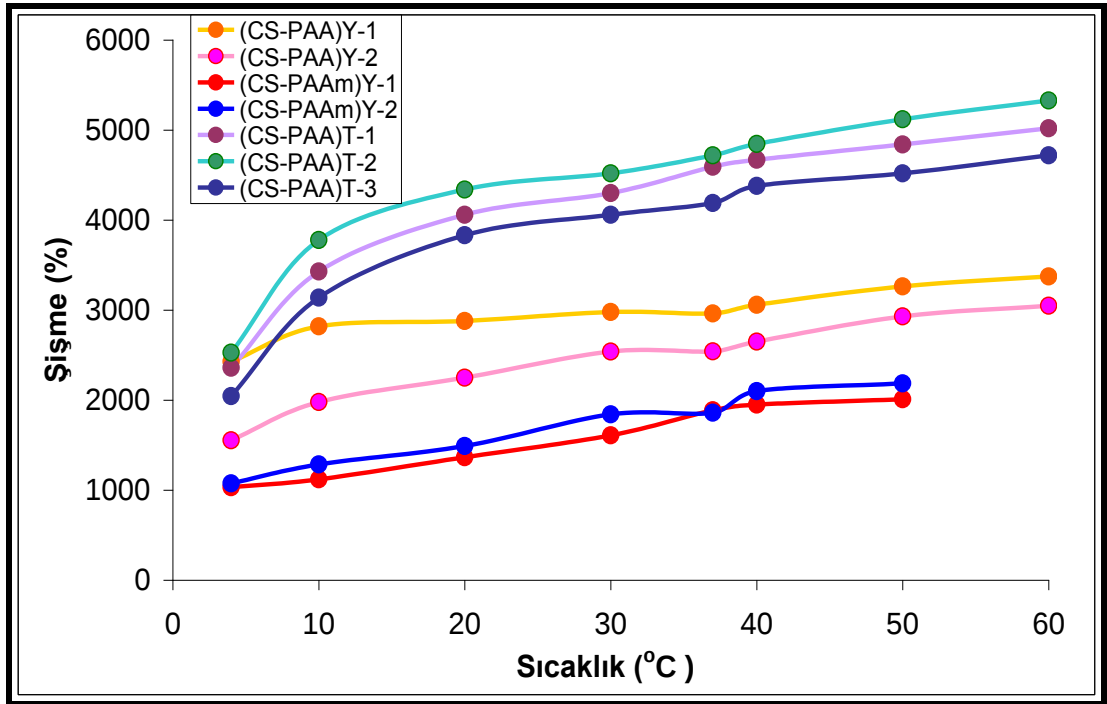
Tam ve yarı-IPN tipi hidrojinlerdeki şişme değerleri kıyaslandığında, tam-IPN tipi hidrojinlerin daha fazla şiştiği gözlenmiştir. Bu durum CS için kullanılan çapraz bağlayıcı GA in işlevini yerine getirmiş olduğunu düşündürür. Böylece her iki çapraz bağlayıcı da çalışmış ve yapıda su tutabilecek odacık sayısı artmıştır denebilir. Örneğin CS/PAA hidrojinin yarı-IPN tipi olanı % 3000 ler civarında, tam-IPN tipi olanı ise % 5000 ler civarında şişme göstermiştir. Her iki hidrojinin jelleşme oranları da yüksek olduğundan, şişmeye jelleşme oranının etkisinin olmadığı düşünülmektedir. (CS-PAA)<sub>T-2</sub> ve (CS-PAA)<sub>T-3</sub> hidrojinleri ele alındığında, GA miktarının artması ile şişme değerinin düştüğü gözlenmiştir. GA artışı ile çapraz bağlanma oranının artmış olduğunu ve yapının daha sıkılaşmasına yol açtığını söyleyebiliriz. Böylece şişme değerinde göreceli bir düşüş gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin zamanla değişim grafiği (T= 37 °C; pH=7,4)

#### 4.3.2. Hidrojellerin % şişme değerlerinin sıcaklıkla değişimi

Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin sıcaklıkla değişim sonuçları Ek-3 te verilmiş, ayrıca sonuçlar grafiğe alınarak Şekil 4.2. de sunulmuştur. Bu şekilden de görüldüğü gibi şişme değerleri tüm hidrojeller için sıcaklıkla önce bir artma göstermiş ve sonra 30 °C civarında dengeye ulaşmıştır. En fazla şişme gösteren hidrojel tam-IPN tipi (CS-PAA)<sub>T-2</sub> dir. Diğer hidrojellerin şişme değerleri Şekil 4.3. de sunulan sıralanmaya uymaktadır. CS içeren yarı-IPN tipi PAAm hidrojellerinin sıcaklığa fazla dayanıklı olmadıkları belirlenmiştir. Bu durum, EGDMA ın AAm için çok uygun bir çapraz bağlayıcı olmamasından kaynaklanıyor olabilir.



Şekil 4.4. Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin sıcaklıkla değişim grafiği (pH = 7,4; t= 30 saat)

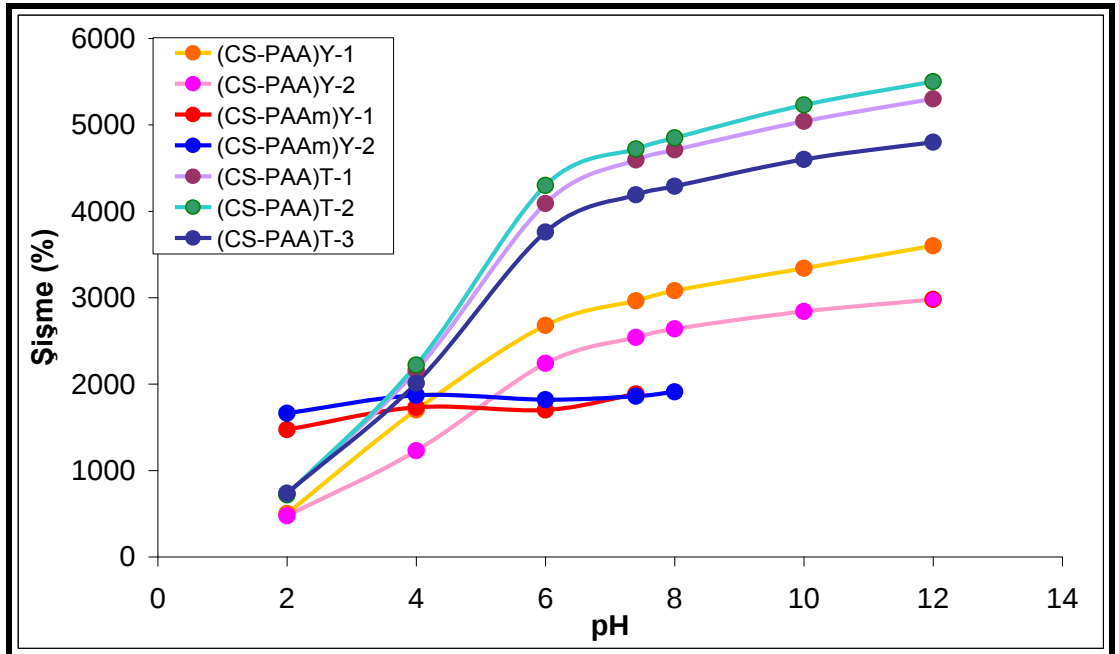
Hidrojellerin şişme değerlerinin sıcaklıkla artması polimer moleküllerinin termal hareketliliklerinin artışına bağlanabilir [141]. Ayrıca kullanılan tüm yapıların sıcaklıkla büzülme göstermeyen, şişme gösteren özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Böylece elde edilen bu sonucun literatüre uygun olduğu söylenebilir. Bu durum ayrıca PAA-PAAm ile CS arasında gerçekleşme ihtimali bulunan H-bağları ile de açıklanabilir. H-bağlarının sıcaklık artışı ile kırıldığını ve böylece şişme yüzdelerinin arttığını söylememiz mümkündür [142].

#### 4.3.3. Hidrojellerin % şişme değerlerinin pH ile değişimi

Tüm hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin pH ile değişim sonuçları Ek-4 de verilmiş, ayrıca sonuçlar grafiğe alınarak Şekil 4.5. te sunulmuştur.

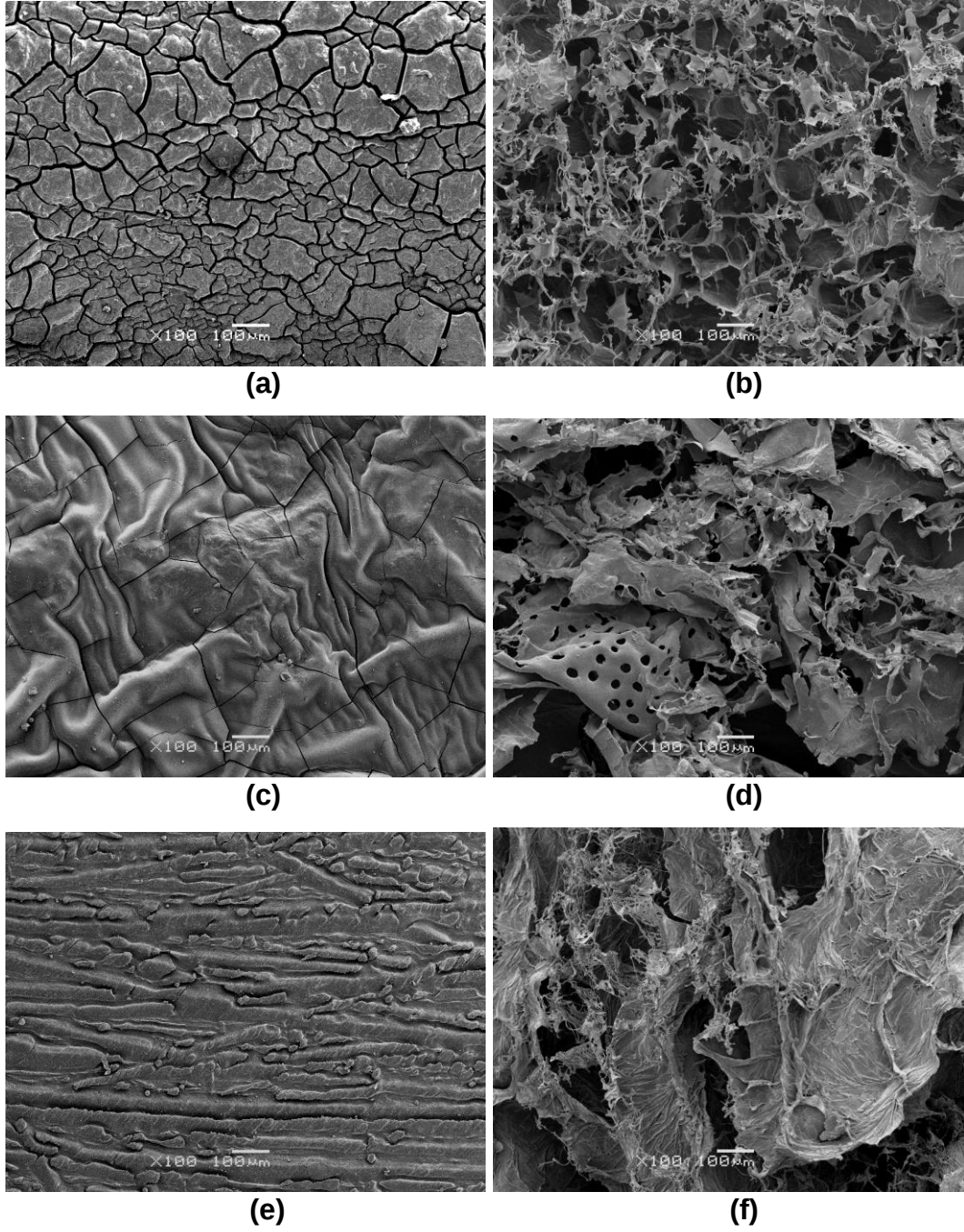
Sonuçlardan görüleceği gibi, AA içeren tüm hidrojeller düşük pH larda az, yüksek pH larda çok şişmiştir. Bu iyonik AA içeren hidrojellerde genel olarak

gözlenen bir durumdur. PAA polimeri sulu ortamda iyonik ve hidrofilik bir polimerdir. pKa değerinin ( $pK_a=4,25$ ) üstündeki ve altındaki değerlerde AA içeren hidrojellerin şişme oranları önemli değişiklikler gösterir [143,144]. Çünkü AA gibi karboksilli asit grubu içeren hidrojellerdeki bu gruplar, yüksek pH larda kolaylıkla iyonlaşırken düşük pH lar da daha az iyonlaşırlar. Böylece hidrojelde oluşan iyonlaşmış gruplar birbirlerini iterek yapının gevşemesini artırır ve şişmeyi kolaylaştırır [145-147]. pH değişimi karşısında en çok şişme gösteren (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojelidir. PAA içeren tam ve yarı-IPN tipi hidrojellerin jelleşme oranları birbirine hemen hemen eşit ancak şişme yüzdeleri çok farklıdır. Bu durumda şişme değerlerindeki farklılık, hidrojel yapının morfolojisi ile açıklanabilir. SEM analizleri bu durumu açıklamakta yardımcı olacaktır. PAAm içeren hidrojellerin şişme davranışlarının, pH değişimlerinden etkilenmediği gözlenmiştir. Bu durum iyonik olmayan AAm için beklenen bir sonuçtur. AAm içeren hidrojellerin pH değişimlerine cevap vermediği bilinmektedir [148].



Şekil 4.5. Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin pH ile değişim grafiği (T= 37 °C; t= 30 saat)

#### 4.4. Hidrojellerin SEM Görüntülerinin Analizi

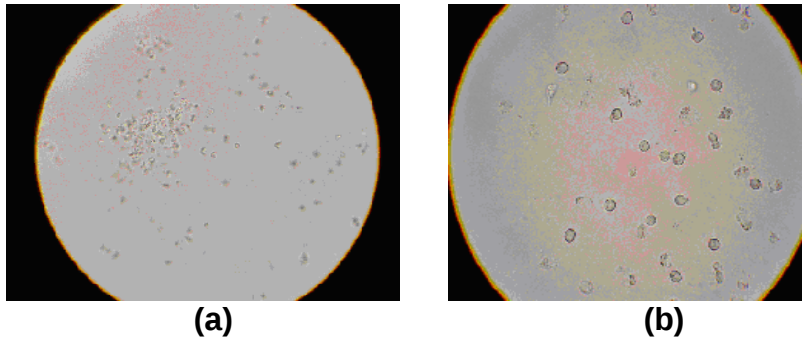


Resim 4.1. Hidrojellerin SEM fotoğrafları (a) kuru (CS-PAAm) $_{\gamma-2}$ , (b) şişmiş (CS-PAAm) $_{\gamma-2}$ , (c) kuru (CS-PAA) $_{\gamma-2}$ , (d) şişmiş (CS-PAA) $_{\gamma-2}$ , (e) (CS-PAA) $_{T-2}$  kuru, (f) (CS-PAA) $_{T-2}$  şişmiş

Resim 4.1. de verilen SEM fotoğrafları incelendiğinde, (a), (c) ve (e) de görülen kuru hallerin diğer şişmiş hallere göre farklılığı açıkça gözlenir. Şişmiş haldeki tüm hidrojenlerin olağanüstü gözenekli olduğu, en çok şişen (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojeninin, diğerlerine göre daha iri gözeneklere sahip olduğu saptanmıştır. Yarı-IPN ler kıyaslandığında, her iki yapının da çok gözenekli olduğu görülür. Tüm yapıların gözenekli olmasına karşın, şişme değerlerinin PAA içeren yapılarda daha fazla saptanmış olması, AA deki iyonlaşma gücüne bağlanabilir.

#### 4.5. Hücre Üreme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

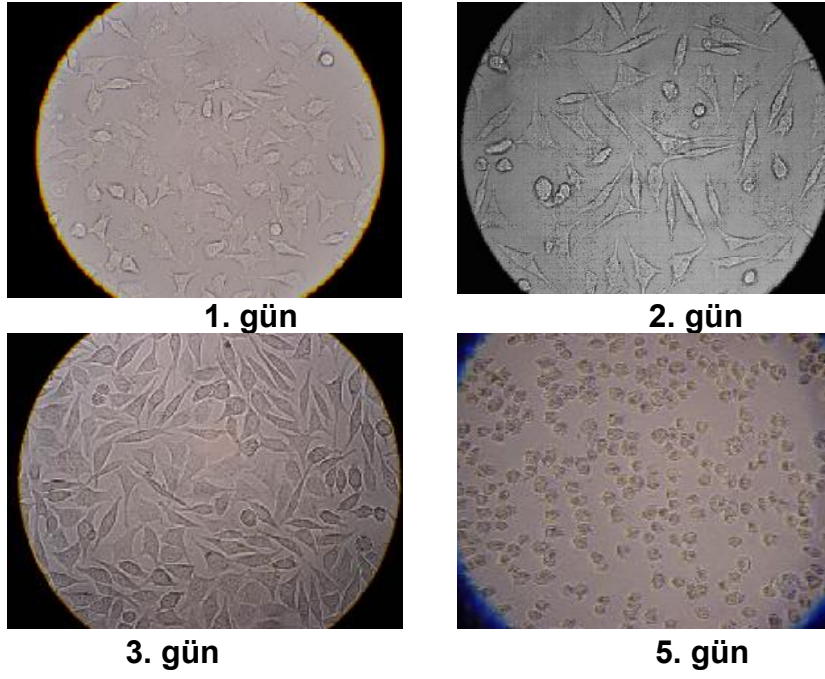
EGF içeren hidrojenlerin hücre üremesine etkisi Bölüm 3.6. da açıklanan MTT testi aracılığıyla incelendi. AA içeren (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojenlerinde hücre üreme testlerinden bir sonuç alınamadı. Bu durum söz konusu hidrojenlerin ortam pH sını düşürmesi ile ilgilidir. Bu iki hidrojen için çekilmiş optik mikroskop görüntüleri Resim 4.2. de verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde her iki hidrojenin bulunduğu ortamda da herhangi bir hücre üremesi görülmemektedir.



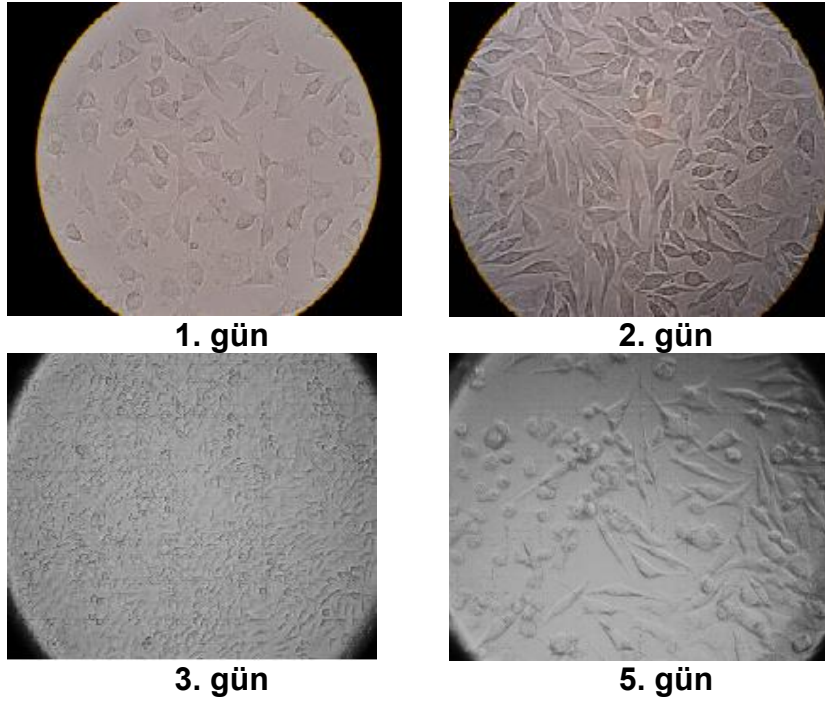
Resim 4.2. EGF yüklü (a) (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (b) (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojenleri için optik mikroskop görüntüleri

Serbest EGF'nin MTT drafı Şekil 4.6. da sunulmuştur. Doğrudan hücre üreme miktarı hakkında bilgi veren absorban değerleri kıyaslanırsa, EGF içermeyen kontrol grubunda, 1 µg ve 2 µg serbest EGF içeren ortamlarda hücre üremesinin 5. gün sonunda düştüğü; öte yandan en yüksek miktarda

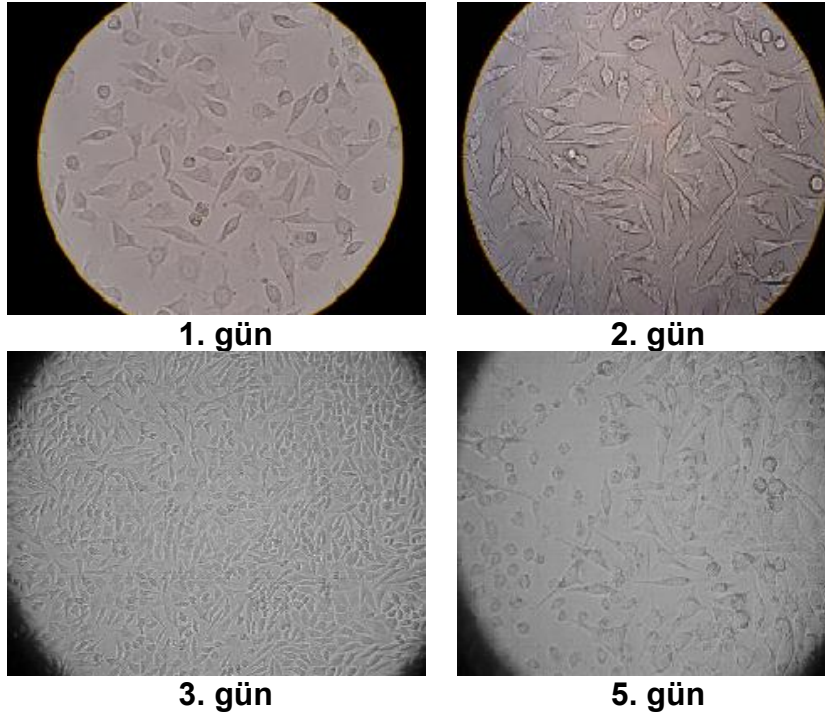




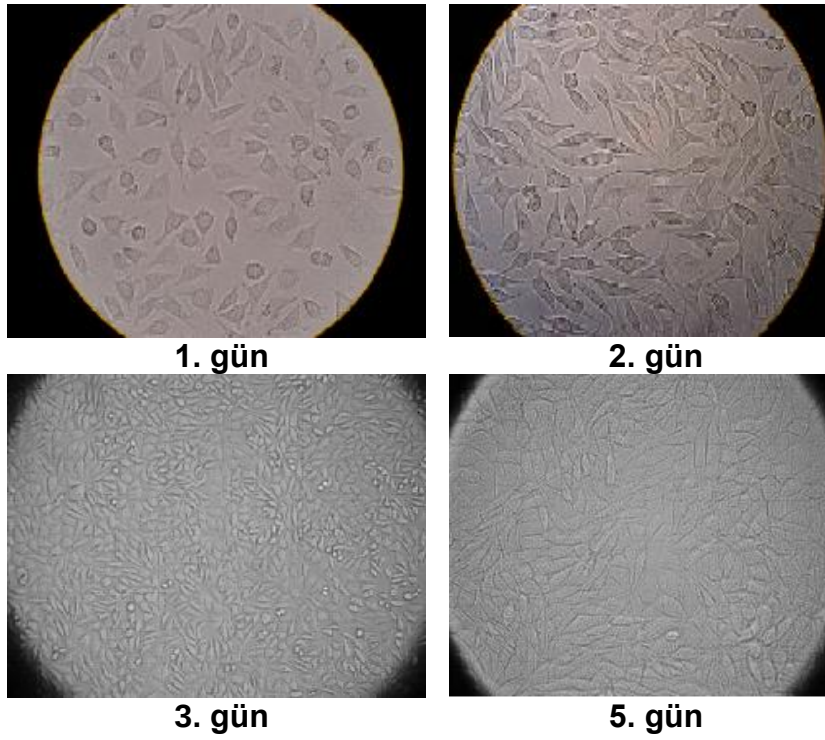
Resim 4.3. EGF içermeyen kontrol ortamındaki hücrelerin optik mikroskop görüntüleri



Resim 4.4. 1 µg lık serbest EGF ortamındaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri

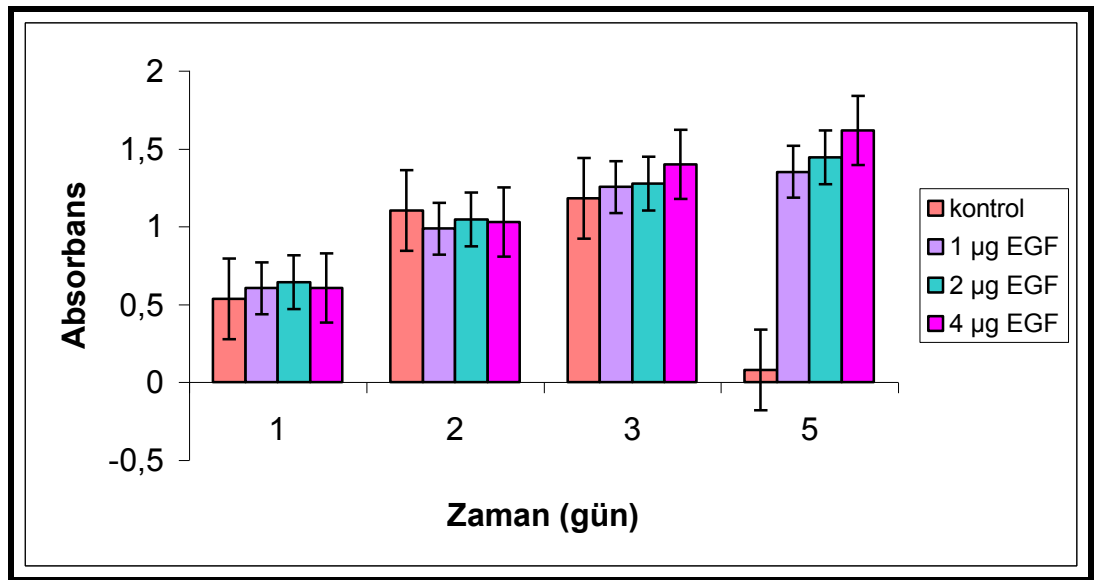


Resim 4.5. 2 µg lık serbest EGF ortamındaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri



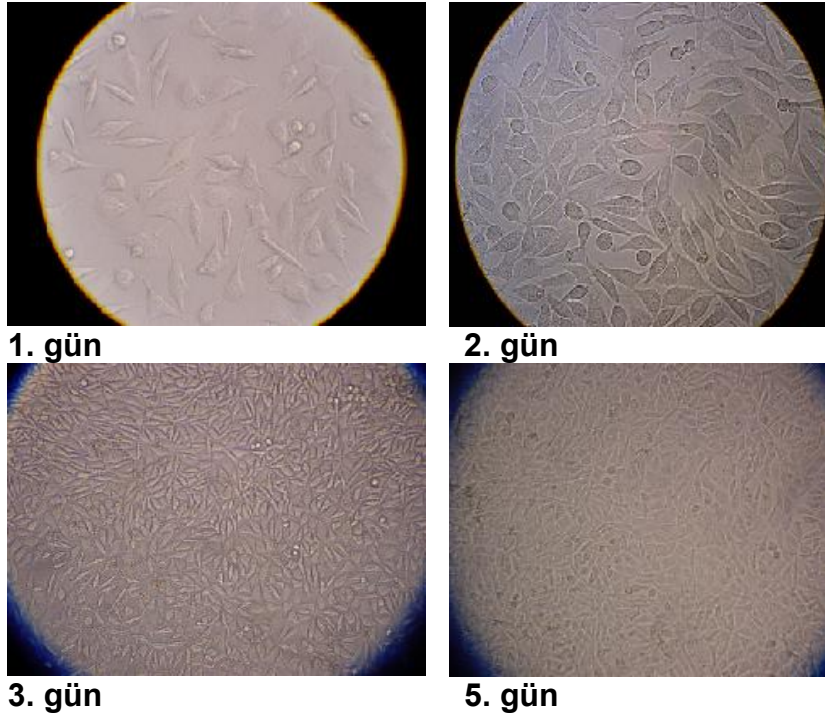
Resim 4.6. 4 µg lık serbest EGF ortamındaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri

(CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 hidrojel için yürütülen MTT test sonucu Şekil 4.7. de sunulmuştur. Görüldüğü gibi EGF içermeyen kontrol ortamında hücre üremesi 5. gün sonunda keskin bir biçimde düşmüştür. Oysa EGF yüklü hidrojeldeki etkinlik günler içerisinde düzenli olarak artmış ve 5. gün sonunda en yüksek değerine ulaşmıştır. Yine en yüksek etkinlik en fazla EGF içeren hidrojel için elde edilmiştir. Yani ilk 3 gün kontrol ortamı ile benzer değerde hücre üremesi gösteren EGF yüklü hidrojellerimiz, 5. günde dahi etkinliğini devam ettirmektedir. Bu arzu edilen bir durumdur ve (CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 Hidrojeline EGF yüklenmesinin hücre üremesine uzun süreli ve olumlu etki yaptığını göstermektedir.

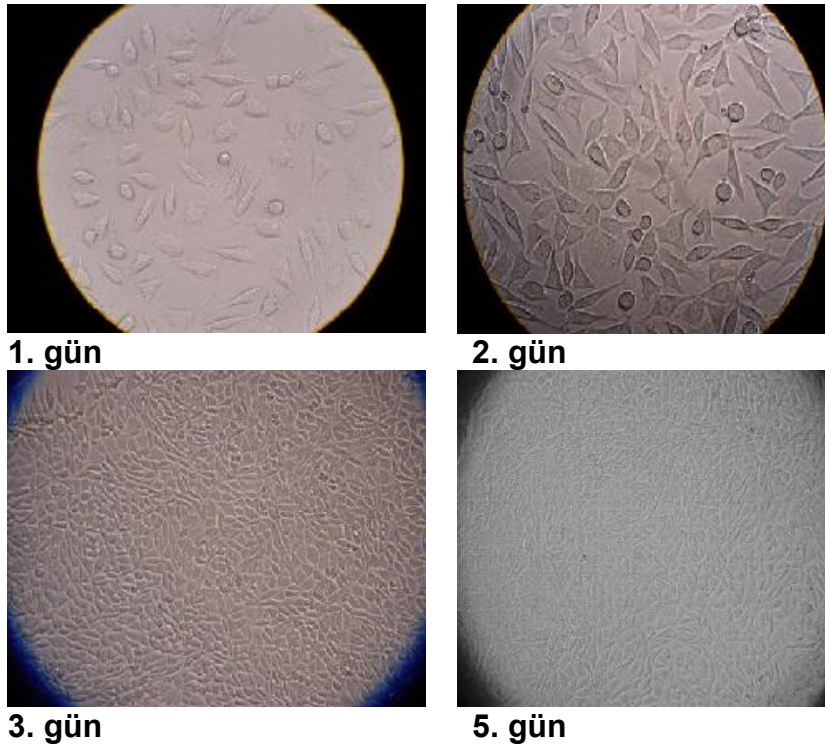


Şekil 4.7. EGF yüklü (CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 hidrojel için MTT grafiği

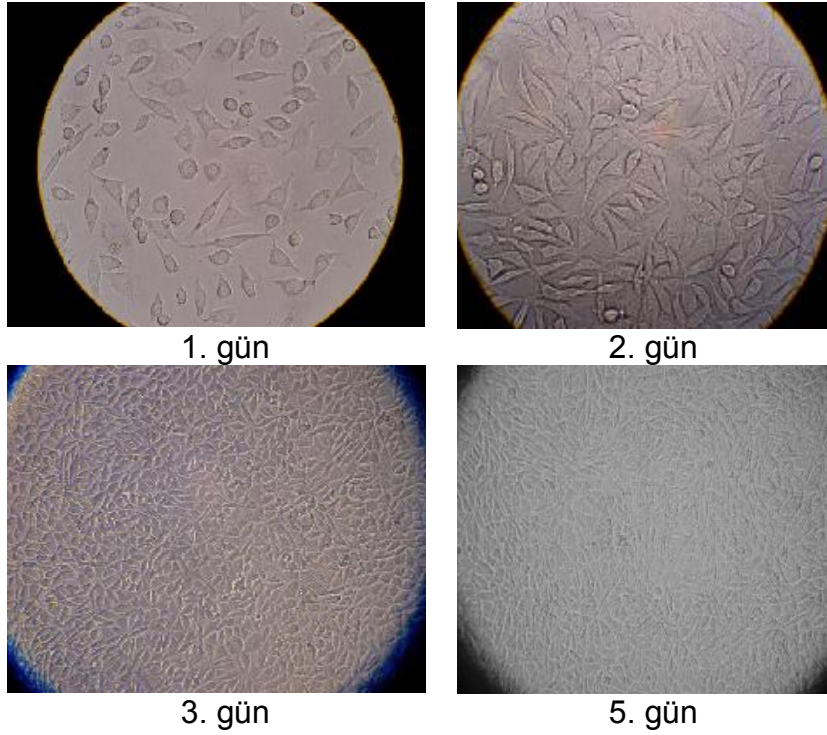
Farklı miktarda EGF yüklü (CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 hidrojel ile ilgili çalışmaya ait optik mikroskop görüntüleri Resim 4.8. - Resim 4.9. - Resim 4.10. ve Resim 4.11. de ayrıca verilmiştir. Optik görüntüler incelendiğinde aynı süre içerisinde farklı miktarlarda EGF içeren ortamdaki hücrelerin yüzeye yapışarak yayılmasının EGF miktarı arttıkça arttığı, zamanla hücrelerin yoğunluğu incelendiğinde ise fibroblast hücrelerin 5 gün boyunca sürekli arttığı ve fibroblastik morfolojilerini oluşturdukları görülmektedir.



Resim 4.7. 1 µg EGF içeren (CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 hidrojelinin bulunduğu ortamdaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri

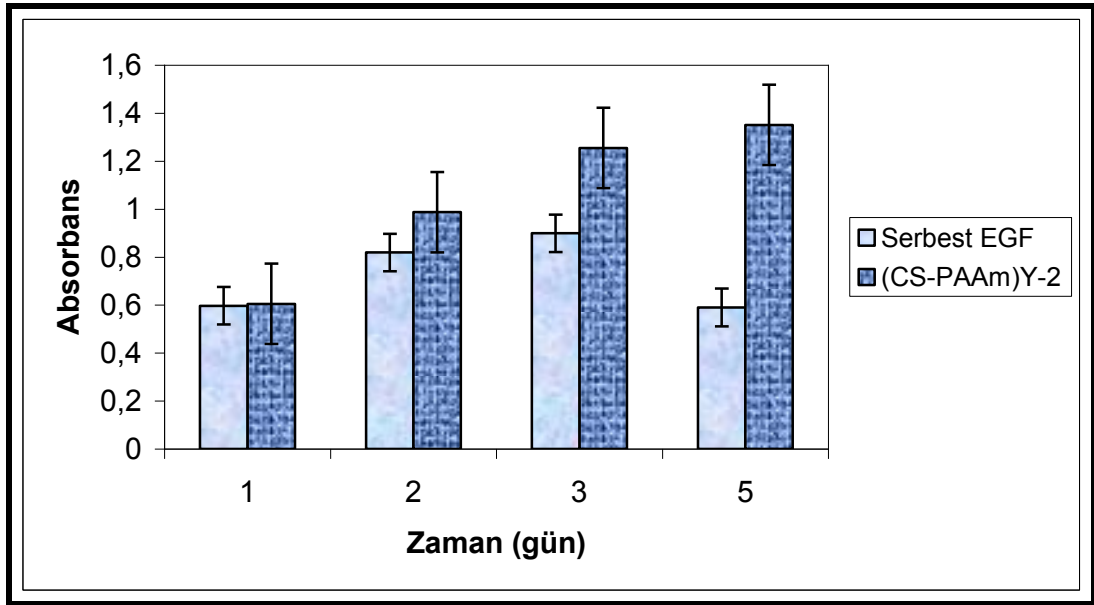


Resim 4.8. 2 µg EGF içeren (CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 hidrojelinin bulunduğu ortamdaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri

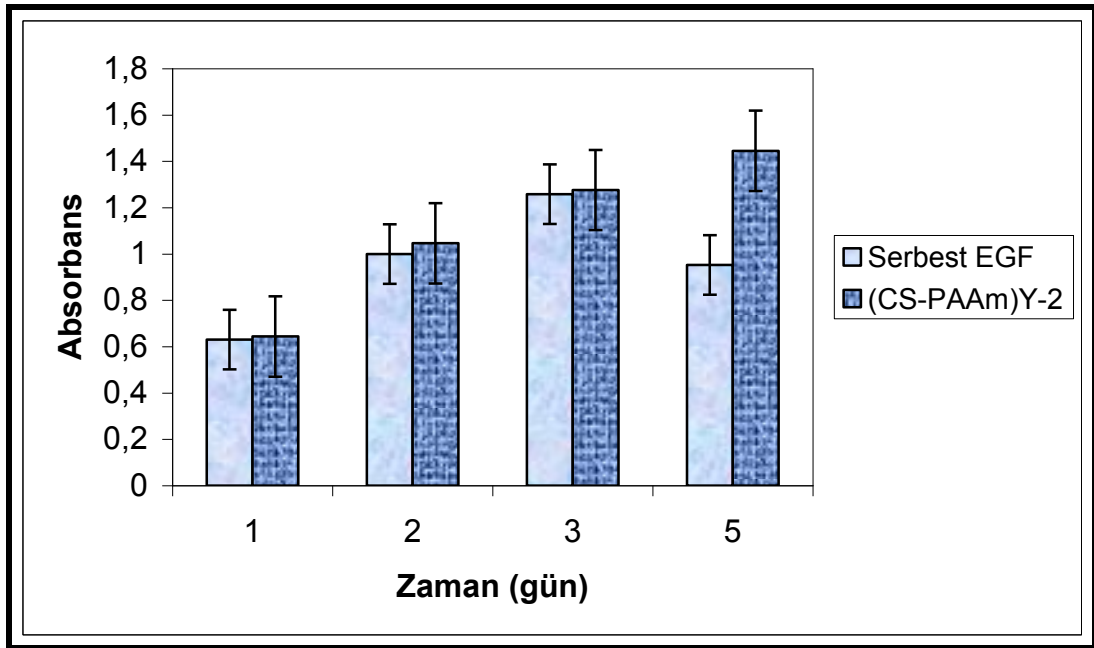


Resim 4.9. 4  $\mu$ g EGF içeren (CS-PAAm) $_{\gamma}$ -2 hidrojelinin bulunduğu ortamdaki hücrelerin 1. 2. 3. ve 5. günlerdeki optik mikroskop görüntüleri

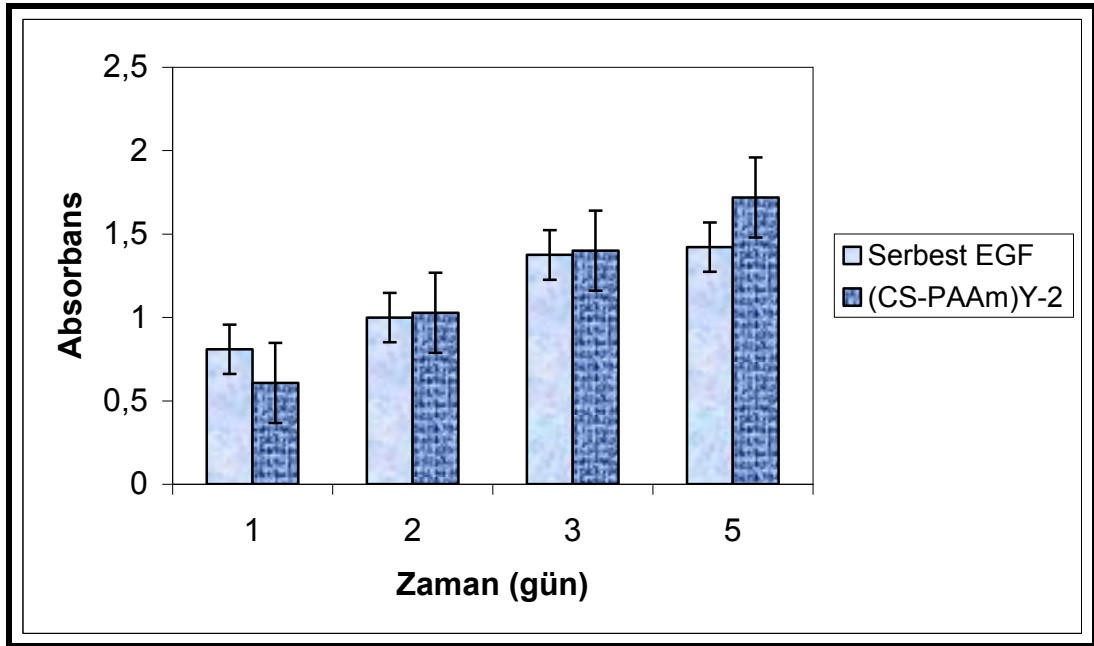
Şekil 4.8. - Şekil 4.9. ve Şekil 4.10. da farklı miktarlarda EGF yüklü (CS-PAAm) $_{\gamma}$ -2 hidrojenlin hücre üremesine etkisi görülmektedir. 1  $\mu$ g EGF içeren (CS-PAAm) $_{\gamma}$ -2 hidrojelinin kontrol ortamına göre hücre üremesine etkisi Şekil 4.8. den yorumlanabilir. Görüldüğü gibi serbest EGF içeren ortamda üreme 5. günde düşüşe geçmiş buna karşın EGF yüklü hidrojelimizin hücre üremesine olumlu etkisi 5. günde de devam etmiştir. En yüksek EGF içeren ortamın grafiği olan Şekil 4.10. incelendiğinde, 5. günde kontrol ortamındaki üremenin fazla düşmediği gözlenir. Bu durum, serbest EGF'nin fazla olması nedeni ile etkinliğin fazla azalmadığı şeklinde açıklanabilir. İlk günde kontrol ortamı ile aynı etkinliğe sahip olan EGF yüklü (CS-PAAm) $_{\gamma}$ -2 hidrojelinin olumlu etkisi günler ilerledikçe ortaya çıkmaktadır. Böylece EGF yüklü (CS-PAAm) $_{\gamma}$ -2 hidrojelini uzun süreli malzeme olarak kullanılmasının uygun olabileceği düşünülebilir.



Şekil 4.8. 1 µg EGF içeren (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin serbest EGF'ye karşı yapılan MTT grafiği



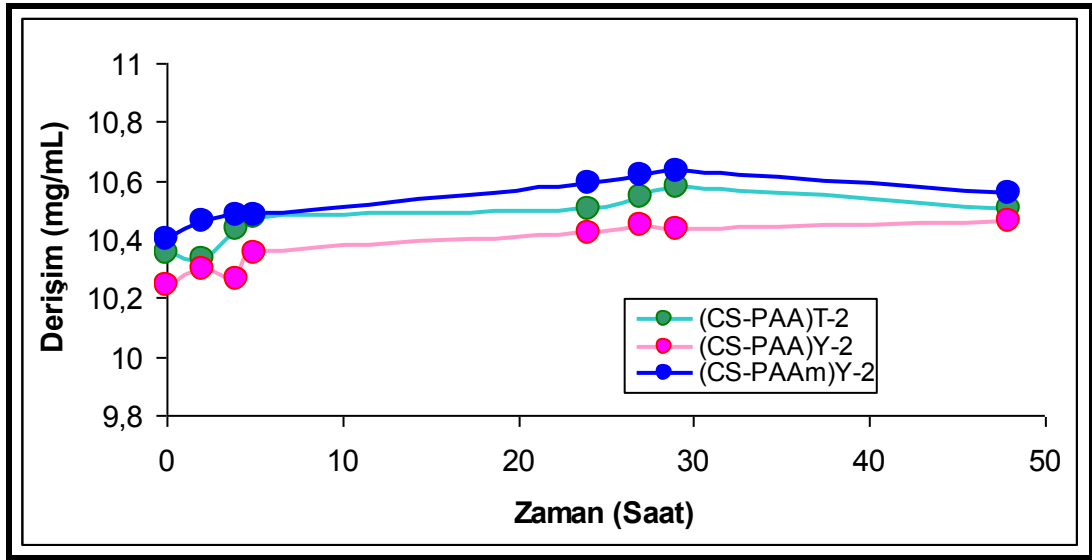
Şekil 4.9. 2 µg EGF içeren (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin serbest EGF'ye karşı yapılan MTT grafiği



Şekil 4.10. 4 µg EGF içeren (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin serbest EGF'ye karşı yapılan MTT analizi

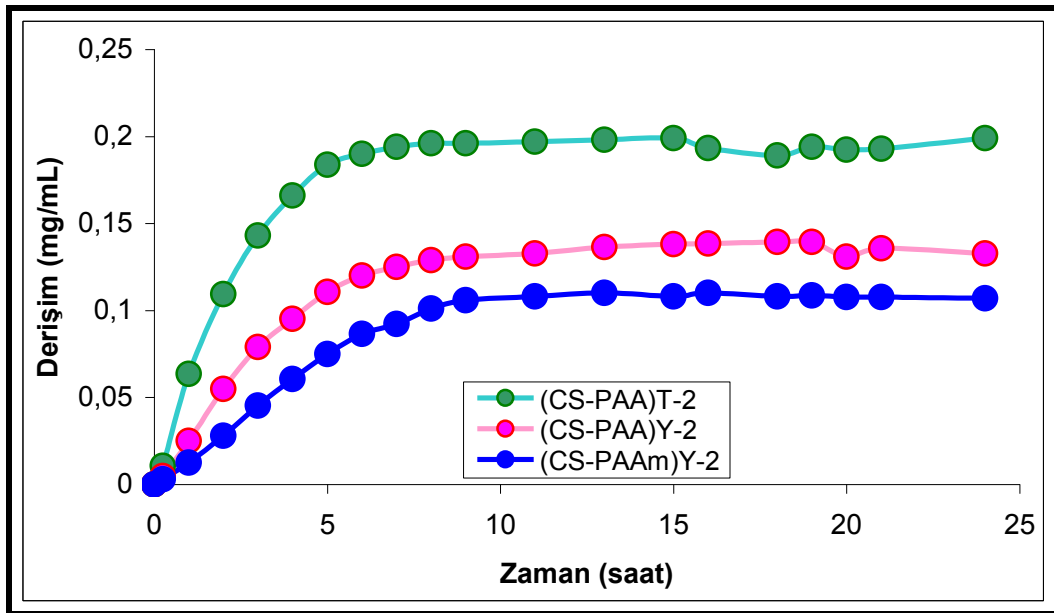
#### 4.6. (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 Hidrojellerinden Piperasilin/Tazobactam Salımı

(CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerine Piperasilin/Tazobactam yüklemesi Bölüm 3.7.2 de anlatıldığı şekilde takip edilmiştir. Bu aşamada üç farklı derişimde yükleme çözeltisi kullanılmış, salım çalışmalarının 10 mg/mL yükleme ortamında elde edilen hidrojeller ile yürütülmesine karar verilmiştir. Söz konusu yükleme ortamından çeşitli sürelerde alınan numunelerin derişim tayinlerinden elde edilen sonuçlar Ek-7 de tablo halinde ve Şekil 4.11. de grafik halinde sunulmuştur. Bu grafik incelendiğinde, yükleme ortamındaki ilaç derişiminin 48 saat süre zarfında değişmediği gözlenmiştir. Emdirme yönteminde şişen hidrojel iç ve dış kısmında kalan çözelti derişimlerinde bir farklılık gözlenmemesi beklenen bir durumdur.



Şekil 4.11. (CS-PAA)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojellerine oda koşullarında 1 g/100 mL Piperasilin/Tazobactam yüklenmesinin takibi

10 mg/mL yükleme ortamında Piperasilin/Tazobactam yüklenen (CS-PAA)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojellerinden salım incelenmiş; spektrofotometrik çalışmalardan zamana karşı hesaplanan ortam derişimleri Ek-8 de tablo halinde ve Şekil 4.12 de grafik halinde sunulmuştur.

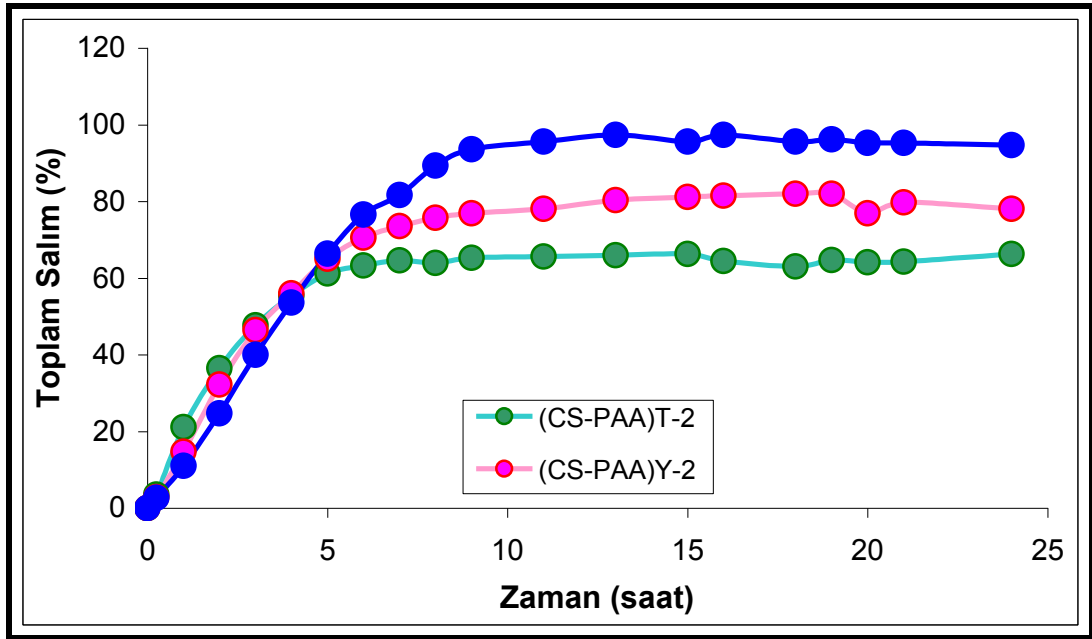


Şekil 4.12. (CS-PAA)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub>, (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojellerinden Piperasilin/Tazobactam'ın salımı

Şekil 4.12. den görüldüğü gibi, tüm hidrojellerden Piperasilin/Tazobactam salımı önce zamanla artmış ve bir süre sonra sabitlenmiştir. Bu sabitlenme hızının (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojeli için en yüksek, (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelleri için ise daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Resim 4.1 de sunulan SEM görüntüleri incelenirse, serbestleşme hızları kolaylıkla yorumlanabilir. En iri gözeneklere sahip olan (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojeli, içindeki etken maddeyi yaklaşık 6 saatte salmış gözükmektedir. En yavaş salım sonucu ise yaklaşık 10 saat olarak (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojeli için elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre Piperasilin/Tazobactam salımının en yavaş olduğu (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin yara iyileşmesi için uygun olduğu düşünülmektedir.

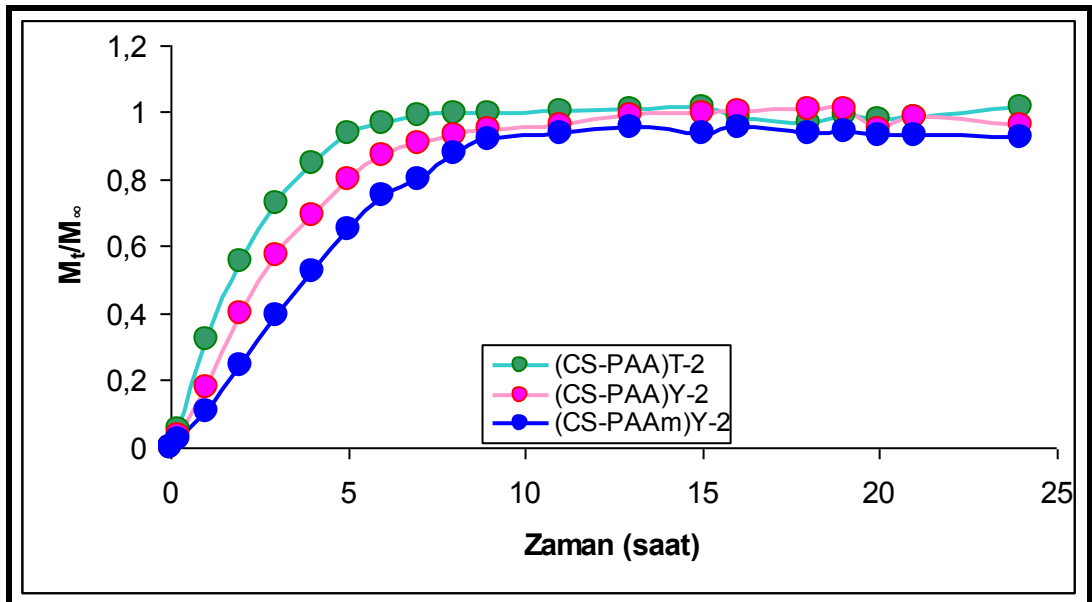
Tüm hidrojeller birlikte değerlendirildiğinde, en fazla ilacı (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojelinin saldığı, dolayısı ile bu hidrojelin diğerlerine göre içine daha fazla etken madde aldığı söylenebilir. Bu durum şişme testleri ile de uyumludur. Dolayısı ile söz konusu hidrojel daha çok çözelti emmiş, içine daha fazla etken madde almış ve sonuç olarak da daha çok madde salmıştır. Daha önce tartışıldığı gibi bu hidrojelin çok şişmesi hem iri gözenekleri, hem de hidrofilikliği ile ilgilidir.

Piperasilin/Tazobactam yüklü (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerden yüzde salım, teorik yükleme miktarlarına dayalı olarak hesaplanmış ve buna göre çizilen grafik Şekil 4.13 de ve buna ait veriler Ek-9 da tablo halinde sunulmuştur. Bu grafikten elde edilen gözlem, en az şişen (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin ilacın tamamına yakın miktarını saldığı şeklindedir. Çok şişmesine rağmen yüzde olarak daha az salım yapan hidrojellerin ortak noktası is AA içermesidir. Bu durumda hidrofilik özelliğı daha fazla olan AA li hidrojellerin ilacı salmakta isteksiz davrandığı düşünülebilir. Bir diğer yaklaşım ise, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin küçük gözeneklere sahip olması nedeniyle, etken maddenin yapının iç kısımlarına nüfuz etmesinin fazla olamadığı ve bu nedenle de toplam salım konusunda daha başarılı olabileceğidir.

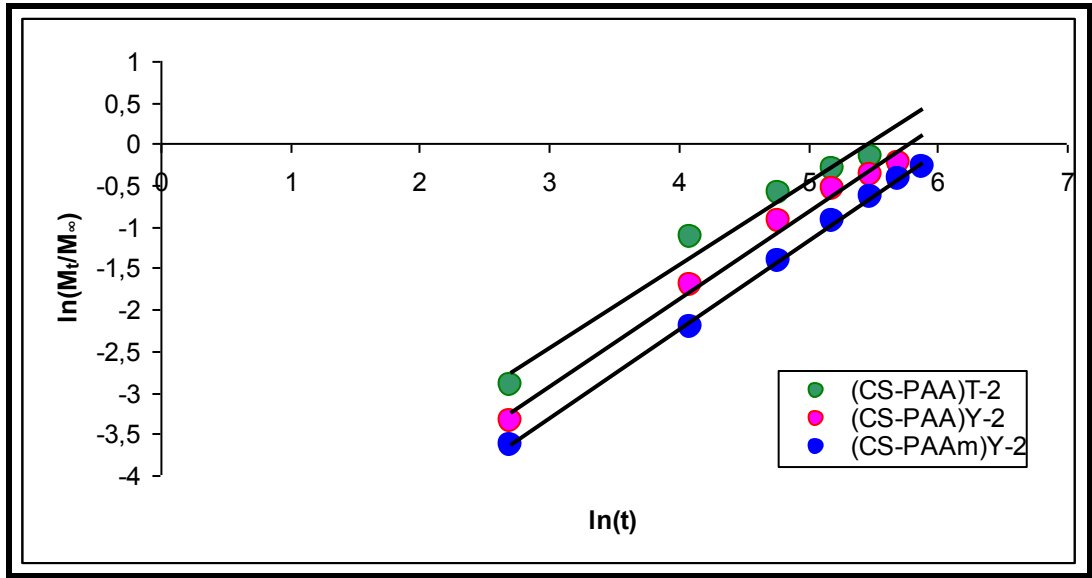


Şekil 4.13. (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojenlerinden Toplam Piperasilin/Tazobactam salımı

Piperasilin/Tazobactam salımını kinetik olarak inceleyebilmek için Eşitlik 2.1. ile anlatıldığı şekilde çizilen  $M_t/M_\infty$ - t grafiği Şekil 4.14. de sunulmuştur.



Şekil 4.14. Piperasilin/Tazobactam yüklü (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojenleri için  $M_t/M_\infty$  değerlerinin zamanla değişimi



Şekil 4.15. (CS-PAA)<sub>T</sub>-2, (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojellerinden Piperasilin/Tazobactam'ın zamana karşı salım kinetiği

Çizelge 4.2. Piperasilin/Tazobactam yüklü (CS-PAA)<sub>T</sub>-2, (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojellerine ait kinetik parametreler

| Hidrojeller               | n     | k                     | D (cm <sup>2</sup> /s) | R <sup>2</sup> |
|---------------------------|-------|-----------------------|------------------------|----------------|
| (PAA-CS) <sub>T</sub> -2  | 1,003 | 4,14x10 <sup>-3</sup> | 3,53x10 <sup>-6</sup>  | 0,9736         |
| (PAA-CS) <sub>Y</sub> -2  | 1,058 | 2,21x10 <sup>-3</sup> | 2,77x10 <sup>-6</sup>  | 0,9915         |
| (PAAm-CS) <sub>Y</sub> -2 | 1,072 | 1,42x10 <sup>-3</sup> | 2,03x10 <sup>-6</sup>  | 0,9989         |

Kinetik verilere geçmek için aynı eşitlikten yararlanılarak çizilen  $\ln(M_t/M_\infty)$ – $\ln t$  grafikleri Şekil 4.15. de ve bunlara ait veriler Ek-10 da sunulmuştur. Bu grafikten yararlanılarak tüm hidrojeller için difüzyon parametreleri hesaplanmış ve Çizelge 4.2. de verilmiştir. Elde edilen n değerlerinin tümü de 1,0 a çok yakındır. Bu durum özellikle (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojeli için daha da belirgindir. Böylece, tüm hidrojellerin 0. dereceden salım kinetiğine uygun davranmış oldukları gözlenmektedir. Yani salım hızının zamandan bağımsız olduğu söylenebilir. D değerlerini ele alırsak en hızlı salım yapan (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojelinin 3,53x10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>/s difüzyon katsayısı değerine sahip olduğu görülür. Bu durum tüm salım değerleri ile uyumludur.

## 5. SONUÇLAR

- ➔ Amonyum persülfat/sodyummetabisülfid başlatıcısı ve EGDMA ve GA çapraz bağlayıcısı eşliğinde, serbest radikal polimerleşme tekniği CS-AA-AAm bazlı yarı-IPN ve tam-IPN tipi 7 tür hidrojel üretilmiştir. Hazırlanan hidrojellerin jelleşme yüzdeleri, gravimetrik yöntem kullanılarak hesaplanmış ve en yüksek jelleşme yüzdesi (CS-PAA)<sub>Y-1</sub> hidrojelinde, en düşük jelleşme yüzdesi ise (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub> hidrojelinde gözlenmiştir. AA içeren tüm hidrojellerde genel olarak yüksek jelleşme oranları elde edilmiştir.
- ➔ Hidrojellerdeki şişme davranışlarının zamanla değişimi incelenmiş, şişme değerlerinin yaklaşık 30 saat civarında dengeye ulaştıkları belirlenmiştir. En yüksek şişme değeri (CS-PAA)<sub>T-2</sub> hidrojeli için yaklaşık olarak % 4720, en düşük şişme değeri ise (CS-PAAm)<sub>Y-2</sub> için yaklaşık olarak % 1860 olarak elde edilmiştir.
- ➔ Genel olarak CS ilavesinin şişme değerlerini fazla etkilemediği belirlenmiştir. Tam ve yarı-IPN tipi hidrojellerdeki şişme değerleri kıyaslandığında, tam-IPN tipi hidrojellerin daha fazla şiştiği gözlenmiştir.
- ➔ Şişme davranışlarının sıcaklıkla değişimi incelenmiş, şişme değerleri tüm hidrojeller için sıcaklıkla önce bir artma göstermiş ve sonra 30 °C civarında dengeye ulaşmıştır. 37,0 °C de en çok şişen hidrojin (CS-PAA)<sub>T-2</sub> olduğu en az şişen jelin ise (CS-PAAm)<sub>Y-1</sub> olduğu gözlenmiştir.
- ➔ Hazırlanan hidrojellerin şişme davranışlarının pH ile değişimi incelenmiş ve AA içeren tüm hidrojellerin düşük pH larda az, yüksek pH larda çok şiştiği, PAAm içeren hidrojellerin şişme davranışlarının, pH değişimlerinden etkilenmediği gözlenmiştir.

- ➔ SEM fotoğrafları incelendiğinde şişmiş haldeki tüm hidrojellerin olağanüstü gözenekli olduğu, en çok şişen (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojelinin ise, diğerlerine göre daha iri gözeneklere sahip olduğu saptanmıştır.
- ➔ EGF içeren hidrojellerin hücre üremesine etkisi MTT testi ve optik mikroskop görüntüleri aracılığıyla incelenmiştir. AA içeren (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2 ve (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerinde hücre üreme testlerinden bir sonuç alınamamış ve bu durumun ortam asitliği ile ilgili olduğuna karar verilmiştir.
- ➔ (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojeli için yürütülen MTT test sonucunda EGF içermeyen kontrol ortamında hücre üremesinin 5. gün sonunda keskin bir biçimde düştüğü, EGF yüklü hidrojeldeki etkinliğin günler içerisinde düzenli olarak arttığı ve 5. gün sonunda en yüksek değerine ulaştığı görülmüştür. Yüksek etkinlik en fazla EGF içeren hidrojel için elde edilmiştir.
- ➔ Şişme davranışı uygun olan (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojellerinden Piperasilin/Tazobactam salımı UV spektrofotometresi ile takip edilmiştir. Toplam salım yüzdesi açısından bakıldığında (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin etken maddenin tamamına yakını saldığı tesbit edilmiştir.
- ➔ Kullanılan hidrojellerin k ve n kinetik parametreleri sırasıyla şöyle bulunmuştur; (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 için  $k = 4,14 \times 10^{-3}$ ,  $n = 1,003$ , (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2 için  $k = 2,21 \times 10^{-3}$ ,  $n = 1,058$ , (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 için  $k = 1,42 \times 10^{-3}$ ,  $n = 1,072$  dir. Buna göre elde edilen n değerlerinin tümü 1,0 a çok yakın olduğundan tüm hidrojellerin 0. dereceden salım kinetiğine uyduğu yorumuna varılmıştır.
- ➔ Hidrojellerin D değerleri incelendiğinde (CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojelinin en yüksek, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2 hidrojelinin ise en düşük difüzyon katsayısına

sahip olduğu belirlenmiştir. Bu da (CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 hidrojelinin salımının en yavaş olduğunu kanıtlamaktadır.

- Gerek EGF etkinliğinin incelenmesi çalışmalarından gerekse Piperasilin/Tazobactam salımından elde edilen sonuçlar (CS-PAAm)<sub>γ</sub>-2 hidrojelinin yara iyileşmesinde kullanılabileceğinin nerilebileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Know, Y., Song, M., Hwang, Y. G., Chang, S. H., Hong, W. J., "Effect of materials structure and composition on properties of siloxane-containing hydrogels", **Current Applied Physics**, 8: 486-489 (2008).
2. Duran, S., Şolpan, D., Güven, O., "Synthesis and characterization of acrylamide-acrylic acid hydrogels and adsorption of some textile dyes", A Thesis of Master of Science, **The Institute for Graduated Studies in Pure and Applied Sciences of Hacettepe University**, Ankara, 6-8 (2000).
3. Gupta, P., Vermani, K., Garg, S., "Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery", **Drug Discovery Today**, 7 (10): 569 (2002).
4. Zhang, J., Peppas, N.A., "Synthesis and characterization of pH and temperature-sensitive poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropylamide) interpenetrating polymeric Networks", **Macromolecules**, 33: 102-107 (2000).
5. Park, K., Shalaby, S.W.W., Park, H., "Biodegradable hydrogels for drug delivery", **Technomic Publishing Co. Inc.**, 1-12, 35-66 (1993).
6. Peppas, N. A., Mikos, A. G., "Preparation methods and structure of hydrogels", **Hydrogels Med. and Pharm.**, 1: 1-25 (1986).
7. Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Dubovik, A. S., Grinberg, N. V., Burova, T. V., Grinberg, V. Y., "Temperature-sensitive chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties", **Journal of Controlled Release**, 102: 629-641 (2005).
8. Gan, Q., Wang, T., "Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release", **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 59 (1): 24-34 (2007).
9. Asıl, D., "Kitosan-poliakrilik asit-polisitrakonik asit içeren yarı-IPN tipi hidrojellerin şişme özellikleri ve flukonazol salım davranışlarının incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-13, 29-34, 39-42 (2006).
10. Sinko, P., Kohn, J., "Polymeric Drug Delivery Systems: An Overview, Polymeric Drug Delivery Systems: Properties and Application", **American Chemical Society**, Washington D.C, 18-21(1993).

11. Hong, S. R., Lee, S. J., Shim, J. W., Choi, Y. S., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., Nam, Y. S., Lee, S. I., "Study on gelatin-containing artificial skin IV: a comparative study on the effect of antibiotic and EGF on cell proliferation during epidermal healing", **Biomaterials**, 22: 2777-2783 (2001).
12. Qui, Y., Park, K., "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery", **Advanced Drug Delivery Reviews**, 53: 321-339 (2001).
13. Gupta, P., Vermani, K., Garg, S., "Hydrogels from controlled release to pH-responsive drug delivery", **Drug Discovery Today**, 7: 569-578 (2002).
14. Güven, O., Şen, M., "Preparation and characterization of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels", **Polymer**, 32: 2491-2495 (1991).
15. Mahdavinia, G. R., Pourjavadi, A., Hosseinzadeh, H., Zohuriaan, M. J., "Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties", **European Polymer Journal**, 40: 1399-1407 (2004).
16. Akçakaya, İ., "İyonik poli(N,N dimetilakrilamid-ko-akrilamid) hidrojenlerinin sentezi ve şişme davranışları", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 3-5, 13-17 (2005).
17. Huglin, M. B., Zakarai, M. B., "Swelling properties of copolymeric hydrogels prepared by gamma irradiation", **Journal of Applied Polymer Science**, 31: 457-475 (1986).
18. Bulut, M., "Makrogözenekli poli(akril amit) hidrojenlerinin hazırlanması ve farklı ortamlardaki şişme davranışlarının incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 5-14, 16-19 (2005).
19. Chen, J., Park, K., "Superporous hydrogels fast responsive hydrogel systems", **Pure and Applied Chemistry**, 36: 917-930 (1999).
20. Wu, S. X., Hoffman, S. A., Yager, P., "Synthesis and characterization of thermally reversible macroporous poly(N-isopropyl acrylamide) hydrogels", **Journal of Polymer Science: Part A, Polymer Chemistry**, 30: 2121-2129 (1992).
21. Zhang, X. Z., Yang, Y. Y., Chung, T. S., Ma, K. X., "Preparation and characterization of response macroporous poly(N-isopropyl acrylamide) hydrogels", **Langmuir**, 17: 6094-6099 (2001).

22. Taşdelen, B., Kayaman, N., Güven, O., Baysal, B. M., "Anticancer drug release poli(N-isopropylacrylamide/itaconic acid) copolymeric hydrogels", ***Radiation Physics and Chemistry***, 73: 340-345 (2005).
23. Elvira, C., Mano, J. F., Roman, J. S., Reis, R. L., "Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems", ***Biomaterials***, 23: 1955-1966 (2002).
24. Karadağ, E., Saraydin, D., Çetinkaya, S., Güven, O., "In vitro swelling studies and preliminary biocompatibility evaluation of acrylamide-based hydrogels", ***Biomaterials***, 17: 67-70 (1996).
25. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., "Hydrogels in pharmaceutical formulations", ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 50: 27-46 (2000).
26. Swami, S. N., "Radiation synthesis of polymeric hydrogels for swelling-controlled drug release studies", Doctor of Philosophy, ***University of Western Sydney New South Wales***, Australia, 188, (2004).
27. Hoffman, A. S., "Hydrogels for biomedical applications", ***Advanced Drug Delivery Reviews***, 54: 3-12 (2002).
28. Brazel, C. S., Peppas, N. A., "Mechanisms of solute and drug transport in relaxing, swellable, hydrophilic glassy polymers", ***Polymer***, 40: 3383-3398 (1999).
29. Am Ende, M. T., Peppas, N. A., "Transport of ionizable drugs and proteins in crosslinked poly(acrylic acid) and poly(acrylic acid-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels 2. diffusion and release studies", ***Journal of Controlled Release***, 48: 47-56 (1997).
30. Uysal, İ., "Poli(vinil eter) bazlı ampifilik hidrojellerin sentezi ve kontrollü ilaç salım uygulamaları", Yüksek Mühendislik Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 5-7 (2001).
31. Vakkalanka, S. K., Brazel, C. S., Peppas, N. A., "Temperature and pH-sensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase", ***Journal of Biomedical Materials Science, Polymer Edition***, 8: 119-129 (1996).
32. Bag, D. S., Alam, S., Mathur, G. N., "Terpolymer smart gels: synthesis and characterizations", ***Smart Materials and Structures***, 13: 1258-1262 (2004).
33. Zhang, J., Peppas, N. A., "Morphology of poly(methacrylic acid)/poly(N-isopropyl acrylamide) interpenetrating polymeric

Networks", *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 13: 511-525 (2002).

34. Ostroha, J., Pong, M., Lowman, A., Dan, N., "Controlling the collapse / swelling transition in charged hydrogels", *Biomaterials*, 25: 4345-4353 (2004).
35. Sutani, K., Kaetsu, I., Uchida, K., Matsubara, Y., "Stimulus responsive drug release from polymer gel.-Controlled release of ionic drug from polyampholyte gel", *Radiation Physics and Chemistry*, 64: 331-336 (2002).
36. English, A. E., Tanaka, T., Edelman, E. R., "Polymer and solution ion shielding in polyampholytic hydrogels", *Polymer*, 39: 5893-5897 (1998).
37. Am Ende, M. T., Hariharan, D., Peppas, N. A., "Factors influencing drug and protein transport and release from ionic hydrogels", *React. Polym.*, 25: 127-137 (1995).
38. Peppas, N. A., Khare, A. R., "Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11: 1-35 (1993).
39. Oğuz, O., Sayıl, Ç., "Macroporous poly(N-isopropylacrylamide) network: formation conditions", *Polymer*, 42 (18): 7639-7652 (2001).
40. Basan, S., "Polimer kimyası", *Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları*, Sivas, 60-128 (2001).
41. Ayman, M., Atta and K. F. Arndt., "New crosslinkers to synthesize pH and temperature-sensitive ionic hydrogels" , *Macromolecules*, 14: 671-674 (1994).
42. Turan, E., "Sıcaklık duyarlı poli(N-t-bütillakrilamit-ko-akrilamit) hidrojenlerinin şişme davranışlarına çapraz bağlayıcı türü ve miktarının etkisi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 10-20 (2005).
43. Tanaka, T., "Phase transition in polymer gels", *Sci. Am.*, 7: 110-112 (1985).
44. Kim, J. J., Lee, M. Y., Kim, S. X., "Preparation and characterization of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)/poly(ethylenoxide) semi-interpenetrating polymer Networks", *Journal of Applied Polymer Science*, 90: 3032-3036 (2003).

45. Kim, S. J., Park, S. J., Kim, S. I., "Properties of smart hydrogels composed of poly(acrylic acid)/poly(vinyl sulfonic acid) responsive to external stimuli", **Smart Materials and Structures**,13: 317-322 (2004).
46. Bajpai, A. K., Giri, A., "Swelling dynamics of a macromolecular hydrophilic network and evaluation of its potential for controlled release of agrochemicals", **Reactive and Functional Polymer**, 53: 125-141 (2002).
47. Arı, A., "Sıcaklık ve pH duyarlı poli(vinil eter) hidrojellerinin sentezi ve biyolojik karakterizasyonu", Yüksek Mühendislik Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 4-12, 19-22 (1998).
48. Bromberg, L. E., Ron, E. S., "Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery", **Advanced Drug Delivery Reviews**, 31: 197-221 (1998).
49. Bromberg, L. E., Ron, E. S., "Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery", **Medicine**, 39 (2): 19-24 (2003).
50. Bae, Y. H., "Stimuli-sensitive drug delivery, controlled drug delivery challenges and strategies", Park K.,Editör, **Chem. Soc (chemical society)**, Washington D.C., 147-162 (1997).
51. Shibana, T., Ho, K., Toyama, S., "Highly water-absorbing polymer", **Chemical Abstract**, 106: 33625t, 11 (1987).
52. Kesgin, D., "pH ya duyarlı poli(vinileter) bazlı amfifilik hidrojellerden protein salım kinetiğinin incelenmesi", Yüksek Mühendislik Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 5-7 (2004).
53. Skouri, R., Schoessler, F., Munch, J. P., Candau, S. J., "Swelling and elastic properties of polyelectrolyte gels", **Macromolecules**, 28: 197-210 (1995).
54. Rubinstein, C. R. H., Dobrynin, A. V., Joanny, J. F., "Elastic modulus and equilibrium swelling of polyelectrolyte gels", **Macromolecules**, 29: 398-426 (1996).
55. Orhan, E., "Poli(vinil alkol) / Poli(vinil pirolidon) ve (PVA-aşı-1-Vinil-2- Pirolidon) salisilik asitin kontrollü salımı", Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 16-18 (2004).

56. Siegel, R. A., Firestone, B. A., "pH-dependent equilibrium swelling properties of hydrophobic polyelectrolyte gels", **Macromolecules**, 21: 3254-3259 (1988).
57. Özyürek, C., "Maleik asit ve itakonik asit esaslı poli(2-hidroksietilmetakrilat) hidrojellerinin hazırlanması karakterizasyonu ve uranil iyonlarının adsorpsiyonunda kullanımı", Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 25-32 (2004).
58. Kazancıoğlu E., "Tegomer H-Si 2111-Ce(IV) redoks çifti ile başlatılmış NIPAAm jelleri ve PNIPAAm/PVSi 2250 semi IPN'leri", Yüksek Lisans Tezi, **İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 52-56 (2001).
59. Demirtaş, T. T., "Süpergözenekli, IPN/yarı-IPN hidrojellerin sentezi ve hücre kültürlerinde kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 31-33 (2007).
60. Agnihotri, S. A., Aminabhavi, T. M., "Novel interpenetrating network chitosan-poly(ethylene oxide-g-acrylamide) hydrogel microspheres for the controlled release of capecitabine", **International Journal of Pharmaceutics**, 324: 103-115(2006).
61. Kaewpirom, S., Boonsang, S., "Electrical response characterisation of poly(ethylene glycol) macromer (PEGM)/chitosan hydrogels in NaCl solution", **European Polymer Journal**, 42: 1609-1616 (2006).
62. Murthy, P. S. K., Mohan, Y. M., Varaprasad, K., Sreedhar, B., Raju K. M., "First successful design of semi-IPN hydrogel-silver nanocomposites: A facile approach for antibacterial application", **Journal of Colloid and Interface Science**, 318: 217-224 (2008).
63. Demirci, R., "UV ışınları ile sertleşebilen akrilat / vinil eter bazlı iç içe girmiş polimerik ağ yapıların (IPN) sentezi ve karakterizasyonu", Yüksek Lisans Tezi, **Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, 38-41 (2003).
64. Kılıçaslan, M., "Verapamil HCl in kontrollü salım yapan çok birimli oral ilaç şeklinin hazırlanması", Doktora Tezi, **Ankara Üniversitesi Sağlık Birimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-13 (1999).
65. Lazarus, J., Cooper, J., "Absorption, testing, and clinical evaluation of oral prolonged-action drugs", **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 50: 715 (1961).

66. Robinson, J. R., Gauger, L. J., "Formulation of controlled-release products", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 78: 676 (1986).
67. Longer, M. A., Robinson, J. R., "Sustained-release drug delivery systems", Pharm. Sci., *Mack Printing Company*, Easton, 1676-1670, (1990).
68. Fix, J. A., "Oral controlled release technology for peptides: status and future prospects", *Pharmaceutical Research*, 13: 1760 (1996).
69. Ainaou, A., Vergnaud, J. M., "Assessment of blood level with controlled-release dosage forms: Effect of the rate constant of elimination of the drug", *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23: 383 (1998).
70. Morita, R., Honda, R., Takahashi, Y., "Development of oral controlled release preparations, a PVA swelling controlled released system (SCRS) I. design of SCRS and its release controlling factor", *Journal of Controlled Release*, 63: 297-304 (2000).
71. Korsmeyer, R.W., Peppas, N.A., "Macromolecular and modeling aspects of swelling controlled systems", Roseman, T.J., and Mansdorf, S.Z., (Eds.), *Controlled Release Delivery Systems*, New York, 77-90 (1983).
72. Edwards, D.A., "Non-fickian diffusion in thin polymer films", *Journal of Polymer Science : Part B: Polymer Physics*, 34: 981-997 (1996).
73. Peppas, N. A., Gurny, R., Doerler, E., Buri, P., "Modelling of diffusion through swellable polymeric systems", *Journal of Membrane Science*, 7: 241-250 (1980).
74. Peppas, N. A., "Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers", *Pharmaceutical Acta Helvetica*, 60: 110-115 (1985).
75. Tsuchida, E., Abe, K., "Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes", *Advances in Polymer Science*, 45: 1-119 (1982).
76. Peppas, N. A., Peppas, L. B., "Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods", *Journal of Food Engineering*, 22: 189-210 (1994).
77. Peppas N. A., Gurny R., Doelker E., Buri P., "Modelling of diffusion through swellable polymeric systems", *Journal of Membrane Sciences*, 7: 241-253 (1980).

78. Peppas N. A., Brannonpeppas L., "Water diffusion and sorption in amorphous macromolecular systems and foods", ***Journal of Food Engineering***, 22: 189-210 (1994).
79. Pulat, M., Eksi, H., Abbasoglu, U., "Fluconazole release from hydrogels including acrylamide-acrylic acid-itaconic acid, and their microbiological interactions", ***Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition***, 19(2):193–205 (2008).
80. Brazel, C. S., Peppas, N. A., "Modeling of drug release from swellable polymers", ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 49: 4-58 (2000).
81. Colombo, P., Bettini, R., Massimo, G., Catallani, P. L., Santi, P., Peppas, N. A., "Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets", ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, 84: 991-997 (1995).
82. Bajpai, A. K., Bajpai, J., Shukla, S., "Water sorption through a semi-interpenetrating polymer network (IPN) with hydrophilic and hydrophobic chains", ***Reactive and Functional Polymer***, 50: 9-21 (2001).
83. Ito, Y., "Surface micropatterning to regulate cell funstions", ***Biomaterials***, 20: 2333-2342 (1999).
84. Doğan, A. K., "Polisakkarit bazlı taşıyıcılardan neovaskülerizasyon ajanlarının kontrollü salımının in vitro ve in vivo koşullarda incelenmesi", Bilim Uzmanlığı Tezi, ***Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 11-37 (2003).
85. Aral, İ. L., "Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nin deri allogreftleri üzerine olan etkilerinin histopatolojik olarak araştırılması", Doktora Tezi, ***Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 3-11, (1993).
86. Internet : Human Epidermal Growth Factor  
[http://www.ust.hk/roundtable/hi-tech.series/1\\_b.html](http://www.ust.hk/roundtable/hi-tech.series/1_b.html)
87. Wells, A., Welsh, J. B., Lazar, C. S., Wiley, H. S., Gill, G. N., Rosenfeld, M. G., "Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor", ***Science***, 247 (4945): 962-964 (1990).
88. Cohen, S., Nobel Lecture Notes, Vanderbilt University, USA, 333-345 (1986).

89. Carpenter, G., Cohen, S., "Epidermal growth factor", ***Annual Reviews Biochemistry***, 48: 193-216 (1979).
90. Dyer, M. I., "Mammalian epidermal growth factor promotes plant growth", ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA***, 77 (8): 4836-4837 (1980).
91. Türkyılmaz, A., "Epidermal büyüme faktörü (EGF)'nün gastrointestinal sistem ülserlerindeki etkisinin incelenmesi", Doktora Tezi, ***Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı***, Ankara, 48 (1998).
92. Noguchi, S., Ohba, Y., Oka, T., "Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice", ***American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism***, 260 (4): 620-625 (1991).
93. Gospodarowicz, D., Bialecki, H., Thakral, T. K., "The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor", ***Experimental Eye Research***, 28 (5): 501-514 (1979).
94. Ulubayram, K., Çakar, A. N., Korkusuz, P., Ertan, C., Hasırcı, N., "EGF containing gelatin-based wound dressing", ***Biomaterials***, 22: 1345-1356 (2001).
95. Hori K., Sotozona C., Hamuri J., Yamasaki K., Kimura K., Ozeki M., Yasuhiko T., Kinoshita S., "Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing", ***Journal of Controlled Release***, 118: 169-176 (2007).
96. Fadiloğlu Efeoğlu N., "Protetik restorasyonlarda kullanılan değişik metal alaşımlarından, in vitro biyolojik ortamlarda, hızlandırılmış yöntemle serbestleşen bazı elementlerin belirlenmesi ve sitotoksik etkilerinin hücre kültüründe incelenmesi", Doktora Tezi, ***Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, İzmir, (2004).
97. Başaran, A., "Tıbbi Biyoloji", ***Güneş & Nobel Tıp Kitabevi***, Bursa , 222 (1999).
98. Korkmaz, S., "Fibroblast hücre kültüründe yara iyileştirici etkinin araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, Eskişehir, 30-32 (1996).

99. Singh, V., Tiwari, A., Tripathi, D. N., Sanghi, R., "Microwave enhanced synthesis of chitosan-graft-polyacrylamide", **Polymer**, 47: 254-260 (2006).
100. Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., Gurny, R., "Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 57: 19-34 (2004).
101. Hamdine, M., Heuzey, M. C., Begin, A., "Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels", **International Journal of Biological Macromolecules**, 37: 134-142 (2005).
102. Tharanathan, R. N., Prashanth, K. V. H., "Crosslinked chitosan-preparation and characterization", **Carbohydrate Research**, 341: 169-173 (2006).
103. Cai, H., Zhang, Z. P., Sun, P. C., "Synthesis and characterization of thermo and pH sensitive hydrogels based on chitosan-grafted N-isopropylacrylamide via  $\gamma$ -radiation", **Radiation Physics and Chemistry**, 74: 26-30 (2005).
104. Seyyal, M., "Kitosan İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Üretimi Ve Karakterizasyonu", Yüksek Mühendislik Tezi, **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 9-19 (1998).
105. Amaral, I. F., Lamghari, M., Sousa, S. R., Sampaio, P., Barbosa, M. A., "Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation", **Journal of Biomedical Materials Research**, 7: 387-397 (2005).
106. Tıgılı, S., Karakeçili, A., Gümüşderelioglu, M., "In-vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree", **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 18 (9): 1665-1667 (2006).
107. Marsano, E., Bianchi, E., Vicini, S., "Stimuli responsive gels based on interpenetrating network of chitosan and poly(vinylpyrrolidone)", **Polymer**, 46: 1595-1600 (2005).
108. Vieira, I. C., "Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*)", **Enzyme Microbial Technology**, 38: 449-456 (2006).

109. Kim, S. J., Lee, K. J., Kim, S. I., Lee, K. B., Park, Y. D., "Sorption characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan interpenetrating polymer network hydrogels", **Journal of Applied Polymer Science**, 90: 86-90 (2003).
110. Khor, E., Lim, L. Y., "Implantable applications of chitin and chitosan", **Biomaterials**, 24: 2339 (2003).
111. Peter, M. G., "Applications and environmental aspects of chitin and chitosan", **Journal of Macromolecular Science: Part A**, 32: 629-635 (1995).
112. Muzzarelli, R. A. A., "Human enzymatic activities relayed to the therapeutic administration of chitin derivatives", **Cellular and Molecular Life Sciences**, 53: 131 (1997).
113. Gürsoy, A. Z., "Kontrollü salım sistemleri", **Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları**, İstanbul, 21-75, (2002).
114. Öztürk, E., "Preparation and characterization of polymeric carriers releasing growth factors to use in wound healing", **Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 25-38 (2002).
115. Montembault, A., Viton, C., Domard, A., "Rheometric study of the gelatin of chitosan in a hydroalcoholic medium", **Biomaterials**, 26: 1633-1643 (2005).
116. Internet: International Programme on Chemical Safety.  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc191.htm>
117. Robinson, J. R., "Ocular drug delivery mechanisms of corneal drug transport and mucoadhesive delivery systems", **S.T.P. Pharma Sciences**, 5: 839-846 (1989).
118. Internet: Acrylamide  
<http://www.nsc.org/ehc/chemical/Acrylamide.htm> (2006)
119. Hawley, G. G., "The condensed chemical dictionary", **Van Nostrand Reinhold**, USA, 75-95 (1977).
120. Şanlı, O., Pulat, E., "Solvent-assisted graft copolymerization of acrylamide PET films using benzoyl peroxide initiator", **Journal of Applied Polymer Science**, 47: 1-6 (1993).
121. Ghosh, P., Dev, D., Samanta, A. K., "Graft copolymerization of AAm on cotton cellulose in a limited aqueous system following pretreatment technique", **Journal of Applied Polymer Science**, 25: 1727 (1995).

122. Lim, Y., Kim, D., Lee, D. S., "Drug releasing characteristics of tyermo and pH-sensitive IPN based on poly(N-isopropylacrylamide)", **Journal of Applied Polymer Science**, 64: 2647 (1997).
123. Sanders, W. E., Sanders, C. C., "Piperacillin/tazobactam: a critical review of the evolving clinical literature", **Clinical Infectious Diseases**, 22:107-123 (1996).
124. Bryson, H. M., Brogden, R. N., "Piperacillin/tazobaktam: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential", **Drugs**, 47(3): 506-535 (1994).
125. Marsano, E., Bianchi, E., Vicini, S., "Stimuli responsive gels based on interpenetrating network of chitosan and poly(vinylpyrrolidone)", **Polymer**, 46: 1595-1600 (2005).
126. Burshe, M. C., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Pangarkar, V. G., "Dehydration of ethylene glycol by pervaporation using hydrophilic IPNs of PVA, PAA and PAAm membranes", **Separation and Purification Technology**, 13: 47-56 (1998).
127. Zhang, Y., Wu, F., Li, M., Wang, E., "pH switching on-off semi-IPN hydrogel based on cross-linked poly(acrylamide-co-acrylic acide) and linear polyallyamine", **Polymer**, 46: 7695-7700 (2005).
128. Mahdavinia G. R., Pourjavadi A., Hosseinzadeh H., Zohuriaan M. J., "Modified chitosan 4. superabsorbent hydrogels from poly (acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt and pH responsiveness properties", **European Polymer Journal**, 40: 1399-1407 (2004).
129. Herna'ndez, R., Pe'rez, E., Mijangos, C., Lo'pez, D., "Poly(vinyl alcohol)-poly(acrylic acid) interpenetrating networks. Study on phase separation and molecular motions", **Polymer**, 46: 7066-7071 (2005).
130. Abd El-Rehim, H. A., "Swelling of radiation crosslinked acrylamide-based microgels and their potential applications", **Radiation Physics and Chemistry**, 74: 111-117 (2005).
131. Chen, K. S., Ku, Y. A., Lin, H. R., Yan, T. R., Sheu, D. C., Chen , T. M., Lin, F. H., "Preparation and characterization of sensitive poly(N-vinly-2-pyrrolidone /itaconic acid) copolymer hydrogels", **Materials Chemistry and Physics**, 91 (1-2): 484-489 (2005).
132. Gudeman, L. F., Peppas, N. A., "Preparation and characterization of pH-sensitive, interpenetrating networks of poly(vinyl alcahol) and

- poly(acrylic acid)", *Journal of Applied Polymer Science*, 55: 919-928 (1995).
133. Kim, S. J., Park, S. J., Kim, S. I., "Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan", *Reactive and Functional Polymer*, 55: 53-59 (2003).
  134. Pulat, M., Cetin, M., "Pantoprazole-Na release from poly(acrylamide-co-crotonic acid) and poly(acrylic acid-co-crotonic acid) hydrogels", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23: 305-318 (2008).
  135. Hernandez, R., Pe´rez, E., Mijangos, C., Lo´pez, D., "Poly(vinyl alcohol)-poly(acrylic acid) interpenetrating networks. Study on phase separation and molecular motions", *Polymer*, 46: 7066-7071 (2005).
  136. Jin, L., Bai, R., "Mechanisms of lead adsorption chitosan/PVA hydrogel beads", *Langmuir*, 18: 9765-9770 (2002).
  137. Vieira R.S., Beppu M.M., "Interaction of natural and crosslinked chitosan membranes with Hg(II) ions", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 279: 196-207 (2006).
  138. Saraydın, D., Ünver-Saraydın, S., Karadağ, E., Koptagel, E., Güven, O., "In vivo biocompatibility of radiation crosslinked acrylamide copolymers", *Nuclear Instruments and Methods Physics Research B*, 217: 281-292 (2004).
  139. Warren, S.J., Kellaway, I.W., "The synthesis and in vitro characterization of the mucoadhesion and swelling of poly(acrylic acid) hydrogels", *Pharmaceutical Development and Technology*, 3(2): 199-208 (1998).
  140. Pulat M., Eksi H., "Determination of swelling behavior and morphological properties of poly(acrylamide-co-itaconic acid) and poly(acrylic acid-co-itaconic acid) copolymeric hydrogels", *Journal of Applied Polymer Science*, 102: 5994-5999 (2006).
  141. Rodriguez, D.E., Garcia, J.R., Vargos, E.R., "Synthesis and swelling characteristics of semi-interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(acrylamide) and poly( $\gamma$ -glutamic acid)", *Materials Letters*, 60: 1390-1393 (2006).
  142. Xiao, X.C., Chu, L.Y., Chen, W.M., Zhu, J.H., "Monodispersed thermoresponsive hydrogel microspheres with a volume phase transition driven by hydrogen bonding", *Polymer*, 46: 3199-3209 (2005).

143. Jabbari, E., Nozari, S., "Swelling behavior of acrylic acid hydrogels prepared by  $\gamma$ -radiation crosslinking of polyacrylic acid in aqueous solution" , ***European Polymer Journal***, 36: 2685-2692 (2000).
144. Handbook of tables for organic compound identification 3<sup>rd</sup> ed. , ***Crc Pres***, Israel, 432-433 (1967).
145. Bajpai, S.K., Sonkusley, J., "Hydrogels for oral drug delivery of peptides: synthesis and characterization" , ***Journa of Applied Polymer Science***, 83: 1717-1799 (2002).
146. Jin, X., Hsieh, Y., "pH-responsive swelling behavior of poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) bi-component fibrous hydrogel membranes" , ***Polymer***, 46: 5149-5160 (2005).
147. Gudeman, L.F., Peppas, N.A., "pH-sensitive membranes from poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) interpenetrating Networks", ***Journal of Membrane Science***, 107: 239-248 (1995).
148. Bajpai, S. K., "Swelling-deswelling behaviour of poly(acrylamide-co-maleic acid) hydrogels", ***J. Appl. Polymer. Sci.***, 80: 2782-2789 (2001).

## EKLER

EK- 1 pH= 2,0; 4,0; 6,0; 7,4; 8,0; 10,0; 12,0; Britton–Robinson Tampon (BRT) çözeltilerinin hazırlanması

2,3 mL asetik asit, 2,7 mL %85 lik fosforik asit ve 2,5 g Borik asit karıştırılıp saf su ile 1L ye tamamlandı. Bu işlem ile pH yaklaşık 2,5 olan tampon çözelti hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltinin pH=2,0 oluncaya kadar ayarlama derişik HCl ile yapıldı.

pH=2,0 çözeltisinden yeterli miktarlarda alınarak ve ayarlama için 2,0 M NaOH çözeltisi kullanılarak pH=4,0, pH=6,0, pH=7,4, pH=8,0, pH=10,0 ve pH=12,0 tampon çözeltileri hazırlandı.

Tüm ayarlamalar pH metre eşliğinde yürütüldü.

EK- 2 Hidrojellerin zamana karşı ortalama % Ş değerleri

| Zaman (Saat) | (CS-PAA) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-1</sub> | (CS-PAA) <sub>T-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-3</sub> |
|--------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0            | 0                       | 0                       | 0                        | 0                        | 0                       | 0                       | 0                       |
| 1            | 232,2                   | 209,5                   | 366,7                    | 340                      | 391,7                   | 360                     | 281,8                   |
| 2            | 496,7                   | 415,1                   | 580                      | 553,3                    | 796,7                   | 740                     | 619,2                   |
| 3            | 741                     | 615,9                   | 746,7                    | 706,7                    | 1156,1                  | 1086,7                  | 917,9                   |
| 4            | 947,8                   | 788,3                   | 866,7                    | 833,3                    | 1482,8                  | 1386,7                  | 1168,6                  |
| 5            | 1141,1                  | 956                     | 966,7                    | 933,3                    | 1770                    | 1660                    | 1411,1                  |
| 6            | 1308,9                  | 1115,3                  | 1060                     | 1026,7                   | 2014,4                  | 1913,3                  | 1620                    |
| 7            | 1477,8                  | 1249,8                  | 1133,3                   | 1106,7                   | 2245                    | 2140                    | 1829,4                  |
| 8            | 1640                    | 1374                    | 1213,3                   | 1173,3                   | 2455                    | 2340                    | 2020,9                  |
| 9            | 1783,3                  | 1494,6                  | 1260                     | 1240                     | 2625                    | 2540                    | 2198,4                  |
| 10           | 1908,9                  | 1604,9                  | 1320                     | 1300                     | 2814,4                  | 2720                    | 2380,5                  |
| 11           | 2033,3                  | 1706,3                  | 1380                     | 1353,3                   | 2980,6                  | 2893,3                  | 2520                    |
| 12           | 2146,7                  | 1800,8                  | 1420                     | 1400                     | 3156,7                  | 3026,7                  | 2630                    |
| 13           | 2200                    | 1870                    | 1420                     | 1408,9                   | 3260                    | 3140                    | 2740                    |
| 14           | 2280                    | 1935,7                  | 1440                     | 1450                     | 3400                    | 3220                    | 2840                    |
| 15           | 2350                    | 2025,4                  | 1500                     | 1486,7                   | 3540                    | 3310                    | 2920                    |
| 16           | 2400                    | 2099,2                  | 1530                     | 1527,8                   | 3680                    | 3430                    | 3020                    |
| 17           | 2480                    | 2167,4                  | 1560                     | 1563,3                   | 3800                    | 3550                    | 3130                    |
| 18           | 2550                    | 2215,1                  | 1570                     | 1610                     | 3920                    | 3660                    | 3220                    |
| 19           | 2600                    | 2277,8                  | 1630                     | 1622,2                   | 4040                    | 3740                    | 3330                    |
| 20           | 2650                    | 2319,9                  | 1630                     | 1640                     | 4110                    | 3860                    | 3400                    |
| 21           | 2680                    | 2350                    | 1650                     | 1700                     | 4210                    | 3970                    | 3510                    |
| 22           | 2740                    | 2382,6                  | 1700                     | 1710                     | 4290                    | 4070                    | 3620                    |
| 23           | 2800                    | 2390,1                  | 1740                     | 1780                     | 4390                    | 4190                    | 3720                    |
| 24           | 2825,6                  | 2400                    | 1773,3                   | 1766,7                   | 4481,7                  | 4306,7                  | 3831,3                  |
| 25           | 2863,3                  | 2428,6                  | 1800                     | 1793,3                   | 4545,3                  | 4366,7                  | 3903,2                  |
| 26           | 2894,4                  | 2460,9                  | 1820                     | 1820                     | 4610,6                  | 4440                    | 3975,9                  |
| 27           | 2925,6                  | 2484,3                  | 1840                     | 1833,3                   | 4644,4                  | 4466,7                  | 4037,1                  |
| 28           | 2920                    | 2502,9                  | 1860                     | 1846,7                   | 4660                    | 4526,7                  | 4073                    |
| 29           | 2938,9                  | 2526,4                  | 1866,7                   | 1870                     | 4700                    | 4560                    | 4132,4                  |
| 30           | 2963,3                  | 2540,9                  | 1886,7                   | 1860                     | 4720                    | 4593,3                  | 4190,8                  |
| 31           | 2988,9                  | 2558,1                  | 1904,7                   | 1870                     | 4770                    | 4640                    | 4232,4                  |
| 32           | 3002,2                  | 2577,4                  | 1920                     | 1890                     | 4840                    | 4670                    | 4259,7                  |
| 33           | 3007,8                  | 2591,9                  | 1933,3                   | 1904,7                   | 4860                    | 4720                    | 4302,9                  |

EK- 2 (Devam) Hidrojellerin zamana karşı ortalama % Ş değerleri

| Zaman (Saat) | (CS-PAA) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-1</sub> | (CS-PAA) <sub>T-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-3</sub> |
|--------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 34           | 3000                    | 2603,2                  | 1940                     | 1930                     | 4880                    | 4740                    | 4300                    |
| 35           | 3040                    | 2620,6                  | 1940                     | 1930                     | 4930                    | 4790                    | 4340                    |
| 36           | 3060                    | 2640,3                  | 1940                     | 1960                     | 4970                    | 4830                    | 4350                    |
| 37           | 3060                    | 2670                    | 1980                     | 1970                     | 5035                    | 4890                    | 4370                    |
| 38           | 3090                    | 2690                    | 1980                     | 2000                     | 5030                    | 4920                    | 4400                    |
| 39           | 3120                    | 2700,2                  | 2000                     | 2000                     | 5050                    | 4950                    | 4440                    |
| 40           | 3140                    | 2710,5                  | 2000                     | 2000                     | 5060                    | 4950                    | 4440                    |
| 41           | 3160,2                  | 2720                    | 2010                     | 2000                     | 5070                    | 4970                    | 4460                    |
| 42           | 3180,3                  | 2720,6                  | 2010                     | 2000                     | 5070                    | 4980                    | 4460                    |
| 43           | 3160                    | 2730,1                  | 2030                     | 2000                     | 5100                    | 4980                    | 4490                    |
| 44           | 3180                    | 2730,8                  | 2030                     | 2000                     | 5140                    | 5000                    | 4520                    |
| 45           | 3180,5                  | 2750,4                  | 2060                     | 2010                     | 5140                    | 5030                    | 4530                    |
| 46           | 3180                    | 2750,7                  | 2060                     | 2030                     | 5180                    | 5040                    | 4560                    |
| 47           | 3181                    | 2760,1                  | 2040                     | 2030                     | 5180                    | 5040                    | 4550                    |
| 48           | 3220                    | 2760,9                  | 2070                     | 2030                     | 5210                    | 5060                    | 4570                    |
| 49           | 3200                    | 2750                    | 2110                     | 2070                     | 5230                    | 5090                    | 4590                    |
| 50           | 3200                    | 2750                    | 2133                     | 2086                     | 5265,4                  | 5126,7                  | 4620                    |

EK- 3 Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin sıcaklıkla değişimi sonuçları

| Sıcaklık (°C) | (CS-PAA) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-1</sub> | (CS-PAA) <sub>T-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-3</sub> |
|---------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 4             | 2270                    | 1553,3                  | 1032,3                   | 1075                     | 2527,8                  | 2360                    | 1044,4                  |
| 10            | 2720                    | 1978,9                  | 1120                     | 1286,1                   | 3780                    | 3430                    | 3140                    |
| 20            | 2830                    | 2250                    | 1366,7                   | 1490,4                   | 4338,9                  | 4060                    | 3833,3                  |
| 30            | 2910                    | 2490                    | 1610                     | 1843,3                   | 4520                    | 4300                    | 4060                    |
| 37            | 2963,3                  | 2540,9                  | 1886,7                   | 1860                     | 4720                    | 4593,3                  | 4190,8                  |
| 40            | 3020                    | 2610                    | 1950                     | 2100                     | 4846,7                  | 4670                    | 4290                    |
| 50            | 3263,3                  | 2850                    | 2010                     | 2186                     | 5120                    | 5010                    | 4630                    |
| 60            | 3373,3                  | 3000                    |                          |                          | 5675                    | 5450                    | 4881,1                  |

EK- 4 Hidrojellerin ortalama % Ş değerlerinin pH ile değişim sonuçları

| pH  | (CS-PAA) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAA) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-1</sub> | (CS-PAAm) <sub>Y-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-1</sub> | (CS-PAA) <sub>T-2</sub> | (CS-PAA) <sub>T-3</sub> |
|-----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 2   | 502,2                   | 475,4                   | 1473,3                   | 1661,3                   | 716,7                   | 726,7                   | 736,7                   |
| 4   | 1700                    | 1230                    | 1730                     | 1869,4                   | 2220                    | 2160                    | 2010                    |
| 6   | 2680                    | 2240                    | 1700                     | 1820                     | 4300                    | 4090                    | 3760                    |
| 7,4 | 2963,3                  | 2540,9                  | 1886,7                   | 1860                     | 4720                    | 4593,3                  | 4190,8                  |
| 8   | 3080                    | 2640                    |                          | 1910                     | 4850                    | 4710                    | 4290                    |
| 10  | 3340                    | 2840                    |                          |                          | 5230                    | 5040                    | 4600                    |
| 12  | 3600                    | 2980                    |                          |                          | 5500                    | 5300                    | 4800                    |

#### EK- 5 Hücre Sayımında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

##### %0.4 (w/v) Tripan Mavisi Solüsyonu:

0.4 g tripan mavisi alınır ve fizyolojik tuzlu su ile 100 mL'ye tamamlanır. Tripan mavisi tamamen çözündükten sonra sırasıyla süzgeç kağıdı, 0.45  $\mu\text{m}$  ve 0.22  $\mu\text{m}$  filtrelerden geçirilir ve küçük hacimlerdeki steril şişelere paylaştırılır.

##### Fizyolojik Tuzlu Su:

8.5 g NaCl alınarak bidistile su ile 1 L'ye tamamlanır.

## EK- 6 MTT analizi sonuçları

Çizelge 6.1. Serbest EGF için MTT analizi sonuçları

|          | 1. gün | 2. gün | 3. gün | 5. gün |
|----------|--------|--------|--------|--------|
| kontrol  | 0,536  | 1,103  | 1,181  | 0,08   |
| 1 µg EGF | 0,597  | 0,819  | 0,899  | 0,59   |
| 2 µg EGF | 0,631  | 0,999  | 1,258  | 0,952  |
| 4 µg EGF | 0,808  | 0,994  | 1,374  | 1,421  |

Çizelge 6.2. EGF yüklü (PAAm-CS)<sub>γ</sub>-2 hidrojelini için MTT analizi sonuçları

|          | 1. gün | 2. gün | 3. gün | 5. gün |
|----------|--------|--------|--------|--------|
| kontrol  | 0,536  | 1,103  | 1,181  | 0,08   |
| 1 µg EGF | 0,605  | 0,987  | 1,255  | 1,351  |
| 2 µg EGF | 0,644  | 1,046  | 1,276  | 1,445  |
| 4 µg EGF | 0,606  | 1,028  | 1,399  | 1,619  |

Çizelge 6.3. 1 µg EGF içeren (PAAm-CS)<sub>γ</sub>-2 hidrojelini serbest EGF'ye karşı yapılan MTT analizi sonuçları

|                           | 1. gün | 2. gün | 3. gün | 5. gün |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Serbest EGF               | 0,597  | 0,819  | 0,899  | 0,59   |
| (PAAm-CS) <sub>γ</sub> -2 | 0,605  | 0,987  | 1,255  | 1,351  |

Çizelge 6.4. 2 µg EGF içeren (PAAm-CS)<sub>γ</sub>-2 hidrojelini serbest EGF'ye karşı yapılan MTT analizi sonuçları

|                           | 1. gün | 2. gün | 3. gün | 5. gün |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Serbest EGF               | 0,631  | 0,999  | 1,258  | 0,952  |
| (PAAm-CS) <sub>γ</sub> -2 | 0,644  | 1,046  | 1,276  | 1,445  |

Çizelge 6.5. 4 µg EGF içeren (PAAm-CS)<sub>γ</sub>-2 hidrojelini serbest EGF'ye karşı yapılan MTT analizi sonuçları

|                           | 1. gün | 2. gün | 3. gün | 5. gün |
|---------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Serbest EGF               | 0,808  | 0,999  | 1,374  | 1,421  |
| (PAAm-CS) <sub>γ</sub> -2 | 0,606  | 1,028  | 1,399  | 1,719  |

EK- 7 Piperasilin/Tazobactam yükleme ortamına ait derişim (mg/mL) verileri

| Zaman (Saat) | (PAA-CS) <sub>T-2</sub> | (PAA-CS) <sub>Y-2</sub> | (PAAm-CS) <sub>Y-2</sub> |
|--------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0            | 10,35                   | 10,243                  | 10,4                     |
| 2            | 10,332                  | 10,3                    | 10,463                   |
| 4            | 10,433                  | 10,267                  | 10,48                    |
| 5            | 10,473                  | 10,354                  | 10,48                    |
| 24           | 10,504                  | 10,42                   | 10,591                   |
| 27           | 10,545                  | 10,45                   | 10,62                    |
| 29           | 10,574                  | 10,432                  | 10,631                   |
| 48           | 10,505                  | 10,463                  | 10,56                    |

EK- 8 Piperasilinin (1g /100 mL yüklü) zamanla salım verileri

| Zaman (Saat) | (PAA-CS) <sub>T-2</sub> | (PAA-CS) <sub>Y-2</sub> | (PAAm-CS) <sub>Y-2</sub> |
|--------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0            | 0                       | 0                       | 0                        |
| 0,25         | 0,0106                  | 0,00486                 | 0,003035                 |
| 1            | 0,0635                  | 0,025                   | 0,0125                   |
| 2            | 0,1094                  | 0,0548                  | 0,0279                   |
| 3            | 0,143                   | 0,079                   | 0,0452                   |
| 4            | 0,166                   | 0,0952                  | 0,0606                   |
| 5            | 0,1837                  | 0,1106                  | 0,075                    |
| 6            | 0,190                   | 0,12                    | 0,0865                   |
| 7            | 0,194                   | 0,125                   | 0,0923                   |
| 8            | 0,196                   | 0,1288                  | 0,101                    |
| 9            | 0,196                   | 0,1308                  | 0,1058                   |
| 11           | 0,197                   | 0,1327                  | 0,108                    |
| 13           | 0,198                   | 0,1365                  | 0,11                     |
| 15           | 0,199                   | 0,138                   | 0,108                    |
| 16           | 0,1933                  | 0,1385                  | 0,11                     |
| 18           | 0,1891                  | 0,1394                  | 0,108                    |
| 19           | 0,1941                  | 0,1394                  | 0,1087                   |
| 20           | 0,1924                  | 0,1308                  | 0,1077                   |
| 21           | 0,193                   | 0,1356                  | 0,1077                   |
| 24           | 0,199                   | 0,1327                  | 0,107                    |

EK-9 Piperasilin/Tazobactam yüklü (CS-PAA)<sub>Y</sub>-2, (CS-PAAm)<sub>Y</sub>-2  
(CS-PAA)<sub>T</sub>-2 hidrojelere ait yüzde salım

| Zaman (Saat) | (PAA-CS) <sub>T</sub> -2 | (PAA-CS) <sub>Y</sub> -2 | (PAAm-CS) <sub>Y</sub> -2 |
|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 0            | 0                        | 0                        | 0                         |
| 0,25         | 3,533                    | 2,859                    | 2,686                     |
| 1            | 21,167                   | 14,706                   | 11,062                    |
| 2            | 36,467                   | 32,235                   | 24,690                    |
| 3            | 47,667                   | 46,470                   | 40                        |
| 4            | 55,333                   | 56                       | 53,628                    |
| 5            | 61,233                   | 65,059                   | 66,372                    |
| 6            | 63,333                   | 70,588                   | 76,549                    |
| 7            | 64,667                   | 73,529                   | 81,681                    |
| 8            | 64                       | 75,765                   | 89,380                    |
| 9            | 65,333                   | 76,941                   | 93,628                    |
| 11           | 65,667                   | 78,059                   | 95,575                    |
| 13           | 66                       | 80,294                   | 97,345                    |
| 15           | 66,333                   | 81,176                   | 95,575                    |
| 16           | 64,433                   | 81,470                   | 97,345                    |
| 18           | 63,033                   | 82                       | 95,575                    |
| 19           | 64,7                     | 82                       | 96,195                    |
| 20           | 61,133                   | 76,941                   | 95,310                    |
| 21           | 64,333                   | 79,765                   | 95,310                    |
| 24           | 66,333                   | 78,059                   | 94,690                    |

EK- 10 (PAA-CS)<sub>Y</sub>-2 hidrojeline yüklenmiş Piperasilinin (1 g/100 mL) zamana karşı salım kinetik değerleri

|                |        | (PAA-CS) <sub>T</sub> -2             | (PAA-CS) <sub>Y</sub> -2             | (PAAm-CS) <sub>Y</sub> -2            |
|----------------|--------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Zaman (dakika) | ln (t) | ln (M <sub>t</sub> /M <sub>∞</sub> ) | ln (M <sub>t</sub> /M <sub>∞</sub> ) | ln (M <sub>t</sub> /M <sub>∞</sub> ) |
| 15             | 2,71   | -2,92                                | -3,34                                | -3,63                                |
| 60             | 4,09   | -1,127                               | -1,708                               | -2,222                               |
| 120            | 4,78   | -0,583                               | -0,923                               | -1,419                               |
| 180            | 5,19   | -0,314                               | -0,557                               | -0,936                               |
| 240            | 5,48   | -0,166                               | -0,371                               | -0,643                               |
| 300            | 5,7    |                                      | -0,221                               | -0,43                                |
| 360            | 5,89   |                                      |                                      | -0,287                               |

## ÖZGEÇMİŞ

### ***Kişisel Bilgiler***

Soyadı, adı : TAN, Nur  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 07.09.1984 İstanbul  
Medeni hali : Bekâr  
Telefon : 0 (212) 615 69 88  
e-mail : [nurtan34@hotmail.com](mailto:nurtan34@hotmail.com)

### ***Eğitim***

| <b><i>Derece</i></b> | <b><i>Eğitim Birimi</i></b>     | <b><i>Mezuniyet tarihi</i></b> |
|----------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Yüksek lisans        | Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü | 2008                           |
| Lisans               | Gazi Üniversitesi/ Kimya Bölümü | 2006                           |
| Lise                 | Çemberlitaş Kız Lisesi          | 2002                           |

### ***İş Deneyimi***

| <b><i>Yıl</i></b> | <b><i>Yer</i></b>     | <b><i>Görev</i></b> |
|-------------------|-----------------------|---------------------|
| 2004              | Abdiibrahim İlaç A.Ş. | Stajyer             |
| 2004              | Unilever Gıda A.Ş.    | Stajyer             |

### ***Yabancı Dil***

İngilizce

### ***Hobiler***

Müzik dinlemek, internet ve bilgisayar,