

Araştırma / Research

Yara Kaplama Malzemesi olarak Kollajen Esaslı Hidrojel Filmleri

Mehtap Şahiner¹, Selin Sağbaş², Abdullah Turan³, Hüseyin Erduğan⁴, Nurettin Şahiner^{2*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Yüksek Okulu, Moda Tasarımı Bölümü

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

³Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

⁴Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

14.10.2018 Geliş/Received, 05.11.2018 Kabul/Accepted

Özet

Yara kaplama malzemesi olarak kullanılacak kollajen/kitosan (koll/kitosan) ve kollajen/kitosan/poli(N-izopropil akrilamid) (koll/kitosan/p(NIPAm)) iç içe geçmiş ağ yapılı (IPN) hidrojelleri glutraldehit ve poli(etilenglikol)diakrilat çapraz bağlayıcıları kullanılarak film şeklinde sentezlenmiştir. Hazırlanan hidrojellerin morfolojik karakterizasyonu optik mikroskop ile yapılmış ve hidrojel yüzeylerinde 1-20 µm boyutunda mikro gözenekler içerdiği belirlenmiştir. Hidrojellerin yapısal ve termal karakterizasyonu FT-IR spektroskopisi ve termal gravimetrik analiz (TGA) ölçümleri ile belirlenmiştir. Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin pH 5,4, 7,4 ve 9,0 da denge şişme kapasiteleri belirlenmiş ve koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojeli en yüksek pH 5,4 değerinde % 428±97 oranında şiştiği belirlenmiştir. Ayrıca hidrojellerin 25-50 °C aralığındaki denge şişme değerleri ölçülmüş ve koll/kitosan hidrojellerinin yaklaşık % 200 şişme değeri ile neredeyse bütün sıcaklıklarda aynı şişme derecesine sahip olduğu gözlemlenirken koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojelinin 25 °C sıcaklıkta % 312±14 oranında şişerken, yapısındaki sıcaklık duyarlı p(NIPAM) den dolayı 50 °C ısıtıldığında % 59±2 şişme değeri ile küçüldüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca, hazırlanan koll/kitosan esaslı IPN hidrojelleri deksametazon sodyum fosfat ilacının salımında kullanılmış ve koll/kitosan hidrojellerinin 114,6±2,9 mg/g ilacı 15 saatte salarken koll/kitosan/p(NIPAm) aynı sürede yaklaşık 51,3±1,2 mg/g saldığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: kollajen, kitosan, NIPAm, hidrojel, yara kaplama, ilaç salımı

*Sorumlu Yazar (Corresponding Author): Nurettin Şahiner

(e-posta: sahinert71@gmail.com)

Bu çalışma ÇOMÜ BAP Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje numarası: FBA-2015-525

Collagen based Hydrogel Films as Wound Dressing Materials

Abstract

Collagen/chitosan (coll/chitosan) and collagen/chitosan/poly(N-isopropylacrylamide) (coll/chitosan/p(NIPAm)) interpenetrating network (IPN) hydrogels were synthesized in film form using glutaraldehyde and poly(ethylene glycol)diacrylate as crosslinkers for the purpose of wound dressing materials. Morphological characterization of the prepared hydrogels were done by optic microscope images and it was found that the surface of the hydrogels possess microporous structure with the pore size of 1-20 μm . The structural and thermal characterizations of the hydrogels were evaluated by using FT-IR spectroscopy and thermal gravimetric analysis (TGA). The equilibrium swelling capacity of collagen/chitosan and collagen/chitosan/p(NIPAm) IPN hydrogels were measured at pH 5.4, 7.4 and 9.0 values and collagen/chitosan/p(NIPAm) hydrogels was found to have the highest equilibrium swelling capacity was found at pH 5.4 with 428 ± 97 % swelling ratio. In addition, the equilibrium swelling properties of the hydrogels between 25 and 50 $^{\circ}\text{C}$ were measured and observed that collagen/chitosan hydrogels have the almost same swelling capacity for all temperatures with nearly 200 % swelling ratio whereas collagen/chitosan/p(NIPAm) hydrogels have the swelling ratio of 312 ± 14 % at 25 $^{\circ}\text{C}$ and shrunk to 59 ± 2 % at 50 $^{\circ}\text{C}$ due to the thermo responsive p(NIPAm) in the structure. Moreover, the prepared collagen/chitosan based IPN hydrogels were used in release of drug and it was observed that collagen/chitosan hydrogels were released 114.06 ± 2.9 mg/g dexamethasone drug within 15 hours whereas coll/chitosan/p(NIPAm) were released about 51.3 ± 1.2 mg/g at the same time.

Keywords: collagen, chitosan, NIPAm, hydrogel, wound dressing, drug delivery

1. Giriş

Kollajen (koll), çok hücreli hayvanların deri, kıkırdak, tendon, kan damarları, kornea ve diş gibi yapılarında bulunan doğal bir polimerdir (Zhang ve ark., 2016). Hidroksiprolin amino asidi sadece kollajene has bir amino asittir ve yirmisekiz çeşit kollajen çeşidi vardır. Karboksil, hidroksil, amino, guanidil, sülfür ve imidazol olmak üzere altı tane fonksiyonel gruba sahiptir (Reich, 2007; Sahiner, 2015). Kollajen insan dokularındaki ekstrasellüler matrikste en yaygın bulunan proteindir (Sahiner, 2015) ve vücuttaki toplam proteinin % 25'i kollajenden oluşur. Aynı zamanda hücreler ile etkileşir ve hücrelerin sabitlenmesi, çoğalması, farklılaşması ve yaşamasını düzenlemeye yardımcı olur (Moura ve ark., 2013). Kollajen, biyobozunur, biyoyumlu, hemostatik (kan durdurucu) ve düşük antijenik özelliklere sahiptir ve hatta yara kaplama malzemelerinde kullanıldığında eksudayı çok iyi absorbladığı bilinmektedir (Sahiner ve ark., 2014; Sun ve ark., 2017).

Polisakkarit yapısındaki kitin, kabuklular, eklem bacaklılar ve çeşitli mantarların hücre duvarı kabuklarının ana yapısal bileşenidir ve deasetilasyonu ile 1→4 glukozamin ve N-asetil glukozamin birimlerinden oluşan kitosan formuna dönüştürülebilir (Elgadir ve ark., 2015; Kamat ve ark., 2015). Kitosan, biyobozunur, biyoyumlu, antibakteriyel (Costa ve ark., 2012), antifungal (Alburquenque ve ark., 2010), antioksidan (Zhang ve ark., 2018) ve hatta muko-yapışkanlık özelliklerine sahip doğal bir malzemedir. Hemostaz epidermal hücre büyümesini desteklemesi ve hatta geçirgenlik özelliklerini arttırmasından dolayı kitosan esaslı malzemeler ilaç taşıma sistemleri ve özellikle yara kaplama veya tedavi edici malzeme olarak tıbbi ve farmasötik alanda kullanım potansiyelleri oldukça yüksektir (Seon ve ark., 2018; Prabakaran, 2015; Zubareva ve ark., 2017).

Hidrojelcer üç boyutlu ağ yapısına sahip çapraz bağlı polimerik ağ yapılarıdır ve yapısındaki fonksiyonel gruplara bağlı olarak uygun bir çözücü ortamında ağırlıklarının 1000 katına kadar şişebilmektedirler. Esnek, yumuşak, su ve nem tutma kapasitesi yüksek malzemeler olmalarından dolayı kontrollü ilaç taşınımı, yara kaplama malzemeleri ve hatta yapay deri olarak kullanım potansiyelleri oldukça yüksektir (Sahiner ve ark., 2017). Hidrojeller kollajen, kitosan gibi doğal moleküllerden sentezlenebileceği gibi, sentetik monomerlerden de hazırlanarak biyomedikal alanda farklı malzemeler hazırlanabilmektedir. Yapıya katılan bazı moleküller sayesinde sıcaklık, pH, iyonik kuvvet, elektrik ve manyetik alan duyarlı akıllı hidrojeller sentezlenebilir (Suner ve ark., 2018). Literatürde bilinen en yaygın sıcaklık duyarlı polimerik yapı N-izopropil akrilamid den hazırlanan poli(N-izopropil akrilamid) ((p(NIPAm))) esaslı hidrojellerdir. P(NIPAm) yaklaşık 32-34 °C sıcaklıkta hacim faz geçişine (LCST) sahip olarak düşük sıcaklıklarda hidrofilik özellik göstererek şişmekte, LCST üzerindeki sıcaklıklarda hidrofobik özellik göstererek büzülmemektedir (Shao ve ark., 2018). Kronik yaraların tedavisinde kullanılacak potansiyel yara kaplama malzemelerin antimikrobiyal, antioksidan ve anti-enflamatuar özellikler taşımanın yanı sıra, biyolojik olarak bozunabilir, su ve oksijen geçirgenliğine sahip, uygun nem tutma ve sızıntı emme kapasitesine sahip olmaları istenmektedir (Altıok ve ark., 2010; Harkins ve ark., 2014; Nyo ve Kim, 2014). Kronik yaralarda iyileşme süreci aylarca sürdüğü için pH değişimi yara kaplama malzemeleri için önemli bir parametredir (Schneider ve ark., 2007; Panzarasa ve ark., 2017). Yara kaplama malzemelerinin, yara ortamındaki sıvıyı absorblayarak şişebilmesi ve yüksek nem içeriğine sahip olması aranan önemli özelliklerdendir. Yara kaplama malzemelerinin yara sıvısını ve eksudayı absorblamasıyla yarada oluşan iltihaplar etkili bir şekilde uzaklaştırılabilecek ve yarayı nemli tutarak iyileşme sürecini hızlandıracaktır (Mohamad ve ark., 2014).

Bu çalışmada çapraz bağlı koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri sentezlenerek yara kaplama malzemesi olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Hazırlanan koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin karakterizasyonu optik mikroskop, FT-IR ve TGA ile yapılmış ve farklı pH ortamlarında ve sıcaklıklardaki şişme davranışları incelenmiştir. Ayrıca, koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerine deksametazon sodyum fosfat ilacı yüklenerek, pH 7,4 ve 37,5 °C olan fizyolojik koşullarda *in vitro* salımı araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyaller

Kollajen (bovin achilles tendonlarından elde edilmiştir, Sigma), kitosan (düşük molekül ağırlıklı 50000-190000 Da, % 75-85 deasetil derecesine sahip, Aldrich), N-izopropil akrilamid (NIPAm, % 97, Alfa Aesar), glutraldehit (% 50'lik sulu çözelti, Sigma-Aldrich), poli(etilen glikol)diakrilat (p(EGDA), Mn:700, Aldrich), amonyum persülfat (APS, 98%, Sigma Aldrich) ve asetik asit (%100, Sigma-Aldrich), kimyasalları hidrojellerin sentezinde kullanılmıştır. Model ilaç olarak kullanılan deksametazon sodyum fosfat yerli bir ilaç firmasından (Abdi İbrahim) temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan saf su iki kere distile edilmiş Millipore direct-Q3 UV (18,2 MΩ.cm) ultra saf su cihazı kullanılarak elde edilmiştir.

2.2. Koll/kitosan ve Koll/kitosan/p(NIPAm) IPN Hidrojellerinin Sentezi

Koll/kitosan IPN hidrojelleri glutraldehit çapraz bağlayıcısı kullanılarak sentezlenmiştir. Kollajeni süspanse etmek için 0,4 g kollajen 40 mL saf su içerisine eklenmiştir. Hazırlanan kollajen çözeltisi yaklaşık 80 °C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde konularak homojenizatör ile homojen bir karışım elde edene kadar 12000 rpm hızında 30 dk karıştırılmıştır. Ardından denatüre olmuş kollajen karışımına sırasıyla hacimce % 1'lik 0,4 mL asetik asit ve 0,4 g kitosan eklenerek 1000 rpm'de kitosan çözünene kadar karıştırılmıştır. Koll/kitosan çözeltisinden 6 mL alınarak üzerine 100 µL glutraldehit çapraz bağlayıcısı eklenerek hızlıca karıştırılmış ve karışım 2 mm yükseklik 17 cm çapındaki kaba dökülerek 12 saat reaksiyona bırakılmıştır. Koll ve kitosan zaten polimer oldukları için çapraz bağlanma reaksiyonunda başlatıcı kullanılmamıştır.

Koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin sentezinde ise koll/kitosan çözeltisinden 3 mL alınarak üzerine 1 M 2,7 mL su içerisinde çözünmüş NIPAm çözeltisi eklenerek 1000 rpm'de 10 dk karıştırılmıştır. Ardından karışıma kollajen ve kitosan'ı çapraz bağlamak için 50 µL glutraldehit, NIPAm'i çapraz bağlamak için monomere göre molce %2'lik yani 44 µL p(EGDA) çapraz bağlayıcısı eklenerek hızlıca karıştırılmış. Ortama hızlıca 6 mg amonyum persülfat (APS) başlatıcısı içeren 300 µL sulu çözeltiden eklenip karıştırılmıştır. Karışım 2 mm yükseklik 17 cm çapındaki kaba dökülerek 12 saat reaksiyona bırakılmıştır.

Reaksiyon sonunda çapraz bağlı koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri 5 mm çapında olacak şekilde küresel kesilip, saf su içerisine konularak 1 saat sürekli suyu değiştirilerek yıkanmıştır. Yıkanan hidrojel 50 °C sıcaklıktaki etüv içerisinde konularak kurutulmuştur. Kuru hidrojel kapalı kaplar içerisine konularak saklanmıştır.

2.3. Koll/kitosan ve Koll/kitosan/p(NIPAm) IPN Hidrojellerinin Karakterizasyonu

Hidrojellerin morfolojik yapıları optik mikroskop (Olympus BX-53) ile 4-20x objektif ile belirlenmiştir. Hidrojellerin fonksiyonel gruplarını belirlemek için FT-IR spektroskopisi

(Thermo Fisher Scientific NICOLET iS10) kullanılarak 4000-650 cm^{-1} aralığında 4 cm^{-1} çözünürlükte zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) tekniği kullanılarak yapılmıştır. Hidrojellerin termal bozunmaları termogravimetrik analizör (TGA, SII TG/DTA 6300) ile 100 mL/dk akış hızındaki azot atmosferinde 10 $^{\circ}\text{C}/\text{dakika}$ sıcaklık artışıyla 50-1000 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklık aralığında yapılmıştır.

2.4. Koll/kitosan ve Koll/kitosan/p(NIPAm) IPN Hidrojellerinin Karakterizasyonu

Hidrojellerin farklı pH koşullarında şişme davranışlarını incelemek için kütlesi bilinen bir parça hidrojel pH 5,4, pH 7,4 ve pH 9,0 değerlerindeki 0,01 M fosfat tampon çözeltileri içerisinde, oda sıcaklığında 12 saat şişirilmiştir. Şişmiş hidrojeller çözelti ortamından alınarak, filtre kağıdı ile yüzeyindeki fazla suyu alındıktan sonra tekrar tartılmıştır. Hidrojellerin farklı sıcaklık koşullarındaki şişme kapasitelerini belirlemek için kütlesi bilinen bir parça hidrojel 25 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki saf su içerisinde 12 saat şişirilmiştir ve şişmiş hidrojelin kütlesi tartılmıştır. Ardından çözelti ortamı sırasıyla 30, 35, 40, 45, 50 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklara ısıtılarak her bir sıcaklık değerinde ortam sıcaklığı sabitlendikten 1 saat sonra hidrojellerin kütleleri ölçülmüştür. Hidrojellerin yüzde (%) şişme ve nem kapasiteleri eşitlik 1 ve 2'ye göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Şişme} = [(M_{\text{şişmiş}} - M_{\text{kuru}}) / M_{\text{kuru}}] \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Nem} = [(M_{\text{şişmiş}} - M_{\text{kuru}}) / M_{\text{şişmiş}}] \times 100 \quad (2)$$

$M_{\text{şişmiş}}$ ve M_{kuru} sırasıyla şişmiş ve kuru hidrojellerin kütleleridir. Bütün şişme deneyleri üç tekrarlı olarak yapılarak ortalama değerler standart sapmaları hesaplanarak verilmiştir.

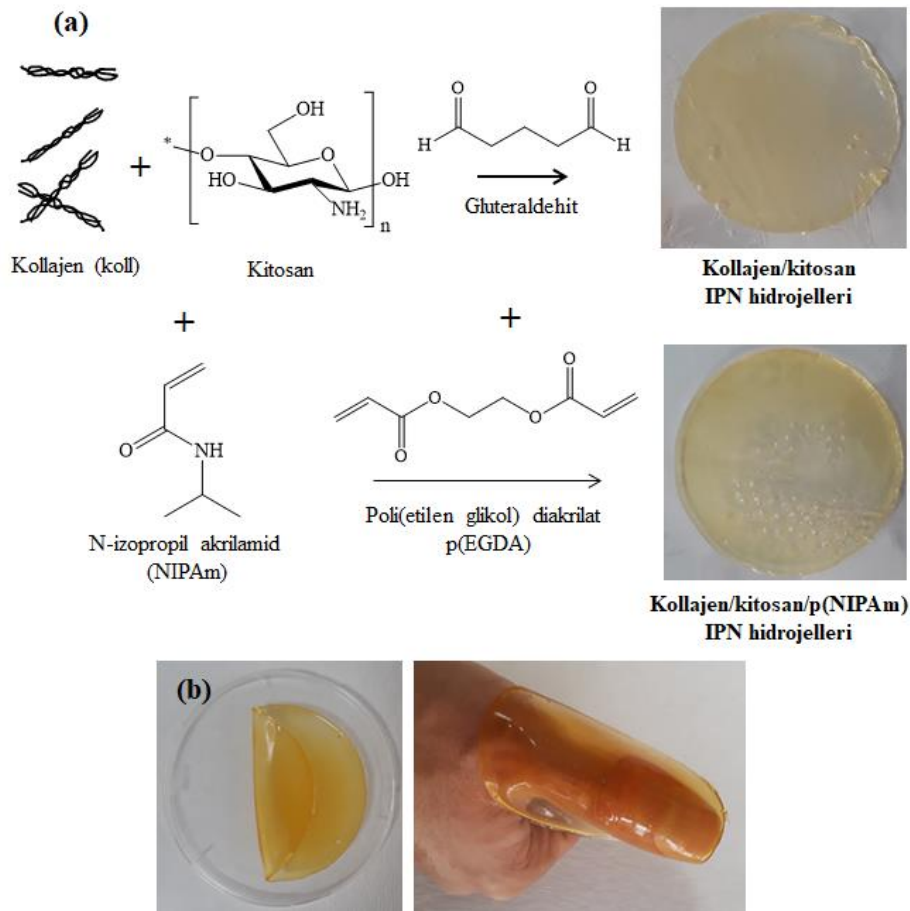
2.5. Koll/kitosan ve Koll/kitosan/p(NIPAm) IPN Hidrojellerine İlaç Yüklenmesi ve Salımı

Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin ilaç salım sistemi olarak kullanım potansiyellerini araştırmak için hidrojellere model ilaç olarak deksametazon sodyum fosfat yüklenmiştir. Yaklaşık 0,2 g koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri 1000 ppm 20 mL sulu deksametazon sodyum fosfat çözeltisine konularak 12 saat 250 rpm karışma hızında oda sıcaklığında karıştırılmıştır. İlaç yüklü hidrojeller 50 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki etüv içerisinde konularak kurutulmuştur. İlaç yüklü kuru hidrojellerden yaklaşık 0,02 g tartılarak 20 mL pH 7,4 olan fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde konularak 37,5 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki çalkalamalı su banyosu içerisinde konulmuştur. Zamana karşı ilaç salım miktarı 242 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometresinde ilacın önceden hazırlanan kalibrasyonu kullanılarak belirlenmiştir. İlaç salım çalışmaları üç tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçlar standart sapmaları hesaplanarak verilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Kollajen, insan derisinde dermis tabakasında bulunan en önemli fibriler proteindir ve üç polipeptit zincirinin birbiri etrafında sarılmasıyla oluşmuş lif yapısındadır. Bu lif fizyolojik ortamda çok kuvvetli bir mekanik mukavemet sağlamaktadır. Kollajen esaslı koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) iç içe geçmiş ağ yapılı (IPN) hidrojeller sentezlenerek, yapay deri veya yara kaplama malzemesi olarak kullanılma potansiyelleri incelenmiştir. Çapraz bağlı koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojel sentezinin şematik gösterimi Şekil 3.1'de verilmiştir. Şekilde gösterildiği gibi, amino asitlerden oluşan üçlü makromolekül zincirlerinin heliks yapısında bağlanmasından oluşan kollajen, 80 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta homojenizatör ile

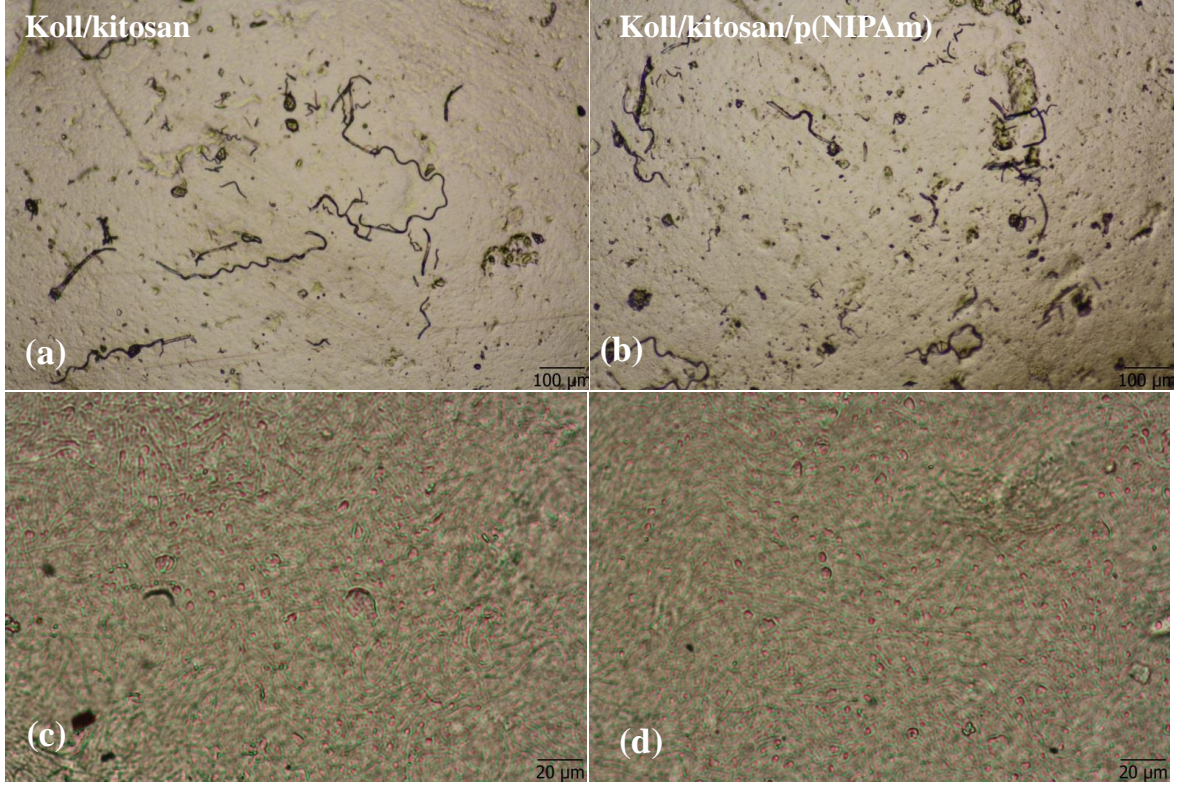
karıştırılarak denatüre edilmiş ve %1'lik asetik asit içerisinde çözülmüş kitosan ile karıştırılmıştır. Ortama eklenen gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile hem kollajen hem de kitosan birimlerini bağlanarak, iç içe geçmiş ağ yapısına sahip kollajen/kitosan IPN hidrojelleri hazırlanmıştır. Böylece p(NIPAm)'den kaynaklanan sıcaklık duyarlı, mekanik dayanımı kuvvetli ve esnek yapısı artırılmış koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri hazırlanmıştır. Koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri sentezlenirken, denatüre edilmiş kollajen ve %1'lik asetik asit içerisinde çözülmüş kitosan karışımına NIPAm eklenmiş ve ardından ortama doğal polimerlerin çapraz bağlayıcı olarak gluteraldehit ve NIPAm'ın çapraz bağlayıcısı olarak p(EGDA) eklenmesi ile koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri sentezlenmiştir. Yara kaplama malzemesi olarak hazırlanan kollajen esaslı hidrojeller 7,5 cm çapında 1 mm kalınlığında olacak şekilde hazırlanmış ve hidrojellerin dijital kamera görüntüleri Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. (a) Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin hazırlanmasının şematik gösterimi ve dijital kamera görüntüleri ve (b) koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin dijital kamera görüntüleri

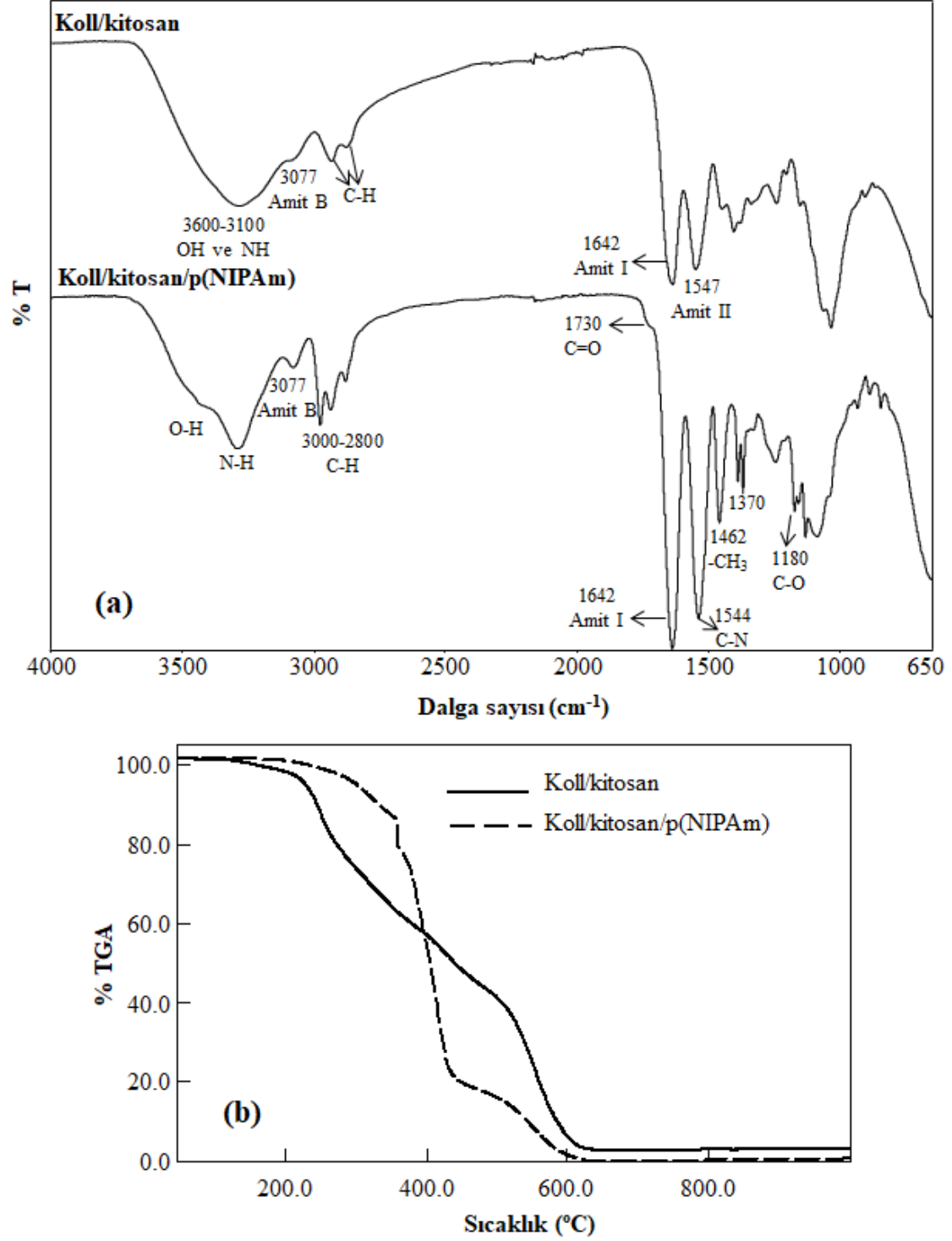
P(NIPAm) içeren koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri koll/kitosan hidrojellerine kıyasla mekanik olarak daha dayanıklı ve yumuşak yapıdadır. Şekil 3.1(b)'de gösterildiği gibi, suda şişmiş koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri yumuşak yapıda, yaranın ve cildin görülebilmesi için şeffaf ve üzerine konuldukları bölgenin şeklini alabilen ve esnek bükülebilen bir yapıdadır. İçeriğindeki kitosandan dolayı muko-yapışkanlık özelliği göstermesi ile cilt üzerine kolayca yapışabilmektedir. Ayrıca hidrojel yapısından dolayı cilde

oksijen giriş çıkışına olanak verebilecek yapıda ve yüksek su tutma özelliklerinden dolayı yaranın su ihtiyacını karşılayabilmektedir. Hazırlanan koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin kuru ve suda şişmiş optik mikroskop görüntüleri Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, her iki hidrojelin yapısındaki fibriler kollajenler belirgin olarak görülmektedir. Şekil 3.2(c,d)’de gösterilen şişmiş hidrojel yüzeylerinde 1-20 μm boyutlarında küresel yapıda gözenek yapısına sahip oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 3.2. Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin (a,b) kuru ve (c,d) suda şişmiş formdaki optik mikroskop görüntüleri

Sentezlenen koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin FT-IR spektrumları Şekil 3.3(a)’da verilmiştir. Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin FT-IR spektrumu incelendiğinde, $3600-3100\text{ cm}^{-1}$ geniş gerilme bandının kollajen, kitosan ve NIPAm moleküllerinin yapısındaki O-H ve N-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.3. Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin (a) FT-IR spektrumları ve (b) termogravimetrik analizleri (TGA)

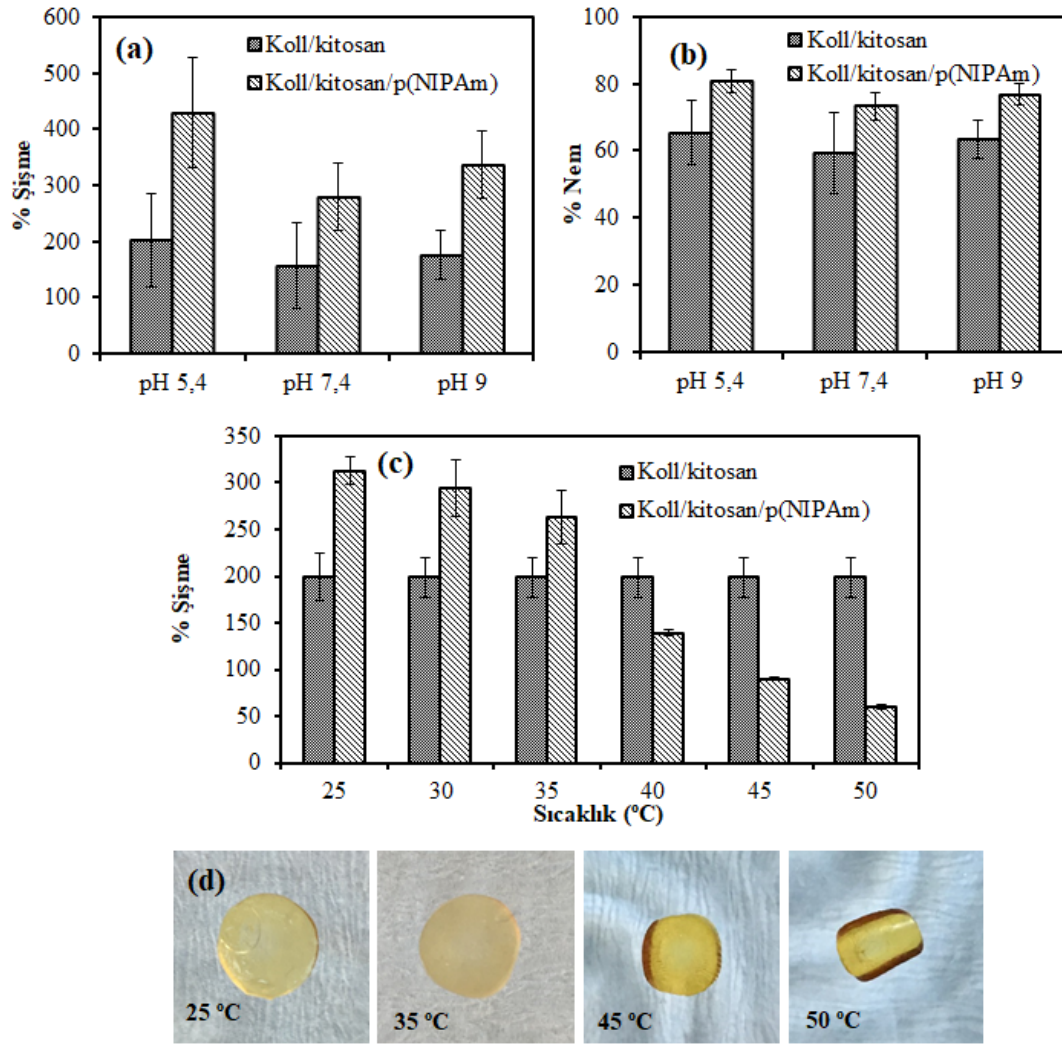
Yine iki malzemede de bulunan 3077 cm^{-1} 'deki pik kollajen ve NIPAm'de bulunan amit B bağlarından gelen N-H gerilmelerinden, $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki spesifik piklerin C-H gerilme titreşimlerine aittir. Hidrojel yapısındaki kollajen, kitosan ve NIPAm moleküllerindeki C=O, N-H ve C-N gerilim titreşimlerinden gelen Amit I bandı 1642 cm^{-1} görülmüştür. Ayrıca, koll/kitosan hidrojellerinde N-H ve C-N gerilimlerinin oluşturduğu Amit II bandı 1547 cm^{-1} 'de görülmüştür. Ayrıca, koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin yapıya katılan çapraz bağlı NIPAm'den dolayı 1730 cm^{-1} 'de C=O gerilmesi, 1544 cm^{-1} 'de C-N

gerilmesi, 1394 ve 1370 cm^{-1} 'de ise $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ grubundan gelen C-H düzlem içi eğilmesi görülmüştür. NIPAm'i çapraz bağlamak için kullanılan p(EGDA)'nın spesifik pikleri ise $-\text{CH}_3$ ve C-O gruplarından gelen 1462 ve 1180 cm^{-1} 'deki gerilmelerinde görülmektedir. Dolayısı ile koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin başarılı bir şekilde hazırlandığı görülmektedir.

Hazırlanan koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin termal bozunma davranışları incelenmiş ve bunlara ait termogramlar Şekil 3.3(b)'de verilmiştir. Koll/kitosan IPN hidrojelinin termal bozunması incelendiğinde, hidrojel yapısındaki bağlı sudan kaynaklı % 2'lik ilk bozunmanın yaklaşık 200 °C başladığı ve 240-400 °C'de % 40, 420-610 °C aralığında ise % 97 bozunma ile iki basamakta bozunduğu görülmüştür. Buna karşın koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri 200-400 °C sıcaklık aralığında % 20 bozunurken, 440-610 °C sıcaklık aralığında % 99'u bozunmuştur. TGA sonuçlarından da görüldüğü gibi koll/kitosan IPN hidrojellerinin koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin her ikisinde daha farklı termal bozunma profillerine sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

Yara kaplama malzemelerinin su ve nem tutma kapasitelerinin bilinmesi ve cilt pH değeri üzerine etkisi önemli birer parametredir. İnsan cildinin pH değeri yaklaşık pH 5,4 değerindedir. Bu değer açık yaraların iyileşme sürecinde ise 5,4 ile pH 9,0 arasında değişkenlik göstermektedir (Ono ve ark., 2015; Panzarasa ve ark., 2017). Yara kaplama malzemesi olarak kullanımı araştırılan koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin farklı pH tamponlarında ve sıcaklıklardaki denge şişme davranışları belirlenmiştir ve sonuçlar Şekil 3.4'te verilmiştir. Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerinin pH 5,4, pH 7,4 ve pH 9,0 değerlerindeki % şişme ve % nem kapasiteleri Şekil 3.4(a) ve 3.4(b)'de verilmiştir. Sonuçlara göre, pH 5,4 değerinde koll/kitosan hidrojelleri % 201 ± 84 şişme ve % $65,5 \pm 9,6$ nem tutma kapasitesine sahipken, koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojelleri 428 ± 97 şişme ve % $80,7 \pm 3,5$ nem tutma kapasitelerine sahiptir. Ayrıca, koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojelleri pH 5,4, pH 7,4 ve pH 9,0 değerlerinde sırasıyla % 428 ± 97 , % 279 ± 59 ve % 336 ± 59 şişme kapasitesine sahiptir. Böylece koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojellerinin, koll/kitosan hidrojellerine oranla yaklaşık iki kat daha fazla şiştiği ve daha fazla nem tutma kapasitesine sahip olduğu ve bu hidrojellerin en çok pH 5,4 olan cilt pH değerinde şiştiği bulunmuştur.

Hazırlanan hidrojellerin farklı sıcaklık koşullarındaki denge şişme davranışları incelenmiş ve sonuçlar Şekil 3.4(c) ve 3.4(d) verilmiştir. Sonuçlara göre koll/kitosan hidrojellerinin şişme özellikleri sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik göstermez iken, sıcaklık duyarlı olarak bilinen p(NIPAm) içeren koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri 25, 35, 45 ve 50 °C sıcaklıklarda sırasıyla % 312 ± 14 , % 262 ± 28 , % 89 ± 1 ve % 59 ± 2 şişme kapasitelerine sahiptir. Şekil 3.4(c) ve 3.4(d)'den de açıkça anlaşılacağı gibi, koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri 25 °C gibi düşük sıcaklık değerlerinde şişerken, sıcaklık arttıkça büzüşmektedir. Bu sonuçlarda yapıya p(NIPAm) katılmasıyla yapısının sıcaklık duyarlı olduğunu göstermektedir.



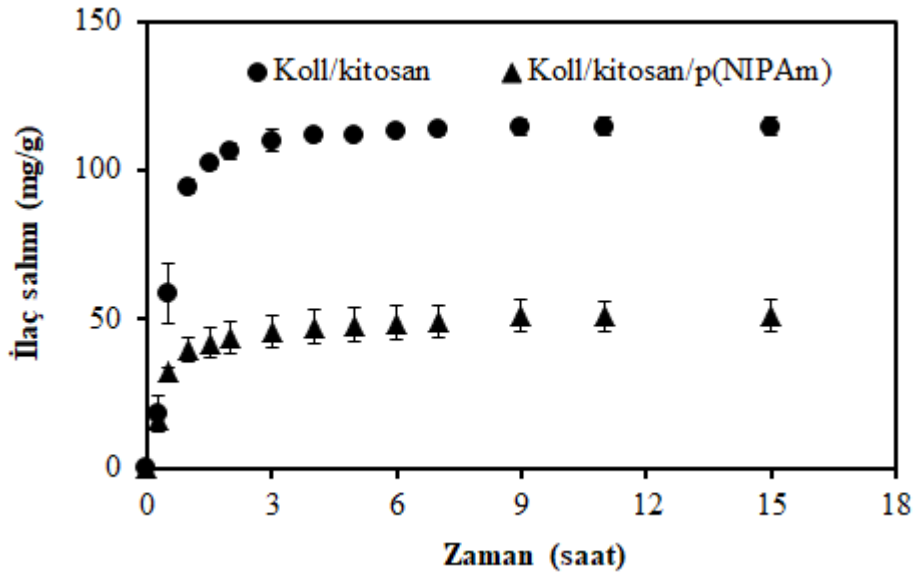
Şekil 3.4. Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojenlerinin (a) farklı pH değerlerindeki % Şişme ve (b) % Nem kapasiteleri ve (c) farklı sıcaklıklardaki % Şişme kapasiteleri. (d) Farklı sıcaklıklarda şişmiş koll/kitosan/NIPAm IPN hidrojenlerinin dijital kamera görüntüleri.

Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojenlerinin yara kaplama malzemesi olarak kullanım potansiyelini araştırmak için bu hidrojenlere deksametazon sodyum fosfat model ilacı yükleyerek, kontrollü ilaç salımında kullanılmıştır. Çizelge 3.1’de koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojenlerinin ilaç yükleme ve salma miktarları verilmiştir. Koll/kitosan hidrojeni yaklaşık 124,5 mg/g ilaç yüklerken, koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojenleri 60,1 mg/g ilaç yüklemiştir. İlaç yüklü hidrojenlerin pH 7,4 ve 37,5 °C olan fizyolojik koşullarda salım profili Şekil 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.1. Koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojjellerinin deksametazon sodyum fosfat ilacını yükleme ve salma miktarları

Hidrojjeller	Yüklenen ilaç (mg/g)	Salınan ilaç (mg/g)	Salınan ilaç (%)
Koll/kitosan	124,5	114,6±2,9	92,0±2,29
Koll/kitosan/p(NIPAm)	60,1	51,3±5,1	85,3±8,48

İlaç salım grafiği incelendiğinde, koll/kitosan hidrojjellerinin 109±3 mg/g ilacı yaklaşık 3 saat gibi kısa bir sürede saldı ve yaklaşık 5 saatte 114,6±2,9 mg/g ilacı saldı bulunmuştur. Buna karşın koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojjellerinin 51,3±5,1 mg/g ilacı benzer şekilde saldı görülmektedir.



Şekil 3.5. Deksa metazon sodyum fosfat ilacı yüklü koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojjellerinin pH 7,4 ve 37,5 °C fizyolojik koşullarda salımı

Sonuçlara göre koll/kitosan hidrojjellerinin yapısındaki fonksiyonel gruplarından dolayı p(NIPAm) içeren hidrojele kıyasla yaklaşık iki katı fazla deksametazon sodyum fosfat yüklediği ve saldı bulunmuştur.

4. Sonuç

Doğal polimerik hidrojjeller, ekstra selüler matriks benzeri yapılar olmalarından dolayı doku mühendisliği alanında geniş kullanım alanına sahiptirler. Bu çalışma ile doku mühendisliğinde de kullanılabilecek iç içe geçmiş ağ yapısındaki (IPN) koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAM) hidrojjelleri sentezlenmiş ve bunların yara kaplama malzemesi olarak kullanım potansiyelleri araştırılmıştır. Doğal bir polisakkarit olan kitosanın antimikrobiyal, mukozal yüzeylere iyi yapışma ve epidermal hücre büyümesini destekleyici (Grenha, 2012) özelliklerinden dolayı kollajen ile birlikte çapraz bağlanarak koll/kitosan hidrojjelleri hazırlanmıştır. Ayrıca koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojjellerinin hazırlanması ile yapıdaki

p(NIPAm) sayesinde sıcaklık duyarlı bir yara örtü materyali hazırlanmıştır. Sonuç olarak kollajen ve kitosanın gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile NIPAm ise p(EGDA) çapraz bağlayıcısı ile başarılı bir şekilde bağlanarak, koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojelleri sentezlenmiştir. Hazırlanan koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojellerinin şişmesi, dokulara ya da deriye kolayca yapışabilmesi, yenilenen dokulara zarar vermeden kolayca çıkarılabilmesi ve şekil verilebilir yapıda olması ile bir yara kaplama malzemelerinde aranan bütün önemli fiziksel özelliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojellerinin optik mikroskop, FT-IR ve TGA analizleri ile karakterizasyonları yapılarak, hidrojellerin başarılı bir şekilde sentezlendiği gösterilmiştir. Optik mikroskop sonuçlarına göre denatüre olmuş koll fibrilleri hidrojel matriksinde açıkça gösterilerek, hidrojellerin yüzeyinin mikro gözenekli yapıda olduğu gösterilmiştir. Böylece bu malzemelerin yara örtü materyali olarak kullanıldıklarında gözenekli yapıları sayesinde yaraya hızlı ve kolay difüzyon, oksijen ve su buharı geçirgenliği sağlayabileceği öngörülmüştür.

Hazırlanan koll/kitosan hidrojellerinin pH 5,4-9,0 arasındaki değerlerde yaklaşık % 200 şişme kapasitesi ve % 60 nem tutma kapasitesi ile potansiyel bir yara örtü materyali hazırlandığı gösterilmiştir. Koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojellerinin hazırlanması ile ise sıcaklık duyarlı hidrojel sentezlenmiş ve böylece soğukta şişerek ortamdaki sıvıyı absorbe eden, sıcakta ise büzülerek içerisindeki sıvıyı bırakabilecek bir malzeme hazırlanmıştır. Ayrıca koll/kitosan ve koll/kitosan/p(NIPAm) IPN hidrojellerine deksametazon sodyum fosfat ilacı 25 °C oda sıcaklığında yüklenerek, pH 7,4 ve 37,5 °C olan fizyolojik koşullarda salımı incelenmiştir. Soğukta şişerek deksametazon sodyum fosfat ilacı yükleyen koll/kitosan/p(NIPAm) hidrojelleri, sıcak ortama konulduğunda büzülerek yapısındaki bu ilacı salmış ve 51,3±5,1 mg/g ilaç 15 saatte içinde ortama salmıştır.

Sonuç olarak kollajen esaslı iki farklı hidrojel yapıya 1) kitosan ve 2) kitosan/p(NIPAm) katılarak IPN yapısında esnek ve yaralara yapışabilecek ve hatta sıcaklı duyarlı olan ve yara kaplama potansiyeli bulunan hidrojel film hazırlanmıştır.

Teşekkür

Bu araştırma ÇOMÜ BAP Birimi tarafından FBA-2015-525 Nolu proje ile desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma teşekkür ederiz.

Kaynakça

- Alburquenque C., Bucarey S.A., Neira-Carrillo A., Urzúa B., Hermosilla G., Tapia C.V., 2010. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. *Medical Mycology* 48: 1018–1023.
- Altıok D., Altıok E., Tihminlioglu F., 2010. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Material Science Material in Medicine* 21: 2227-2236.
- Costa E.M., Silva S., Pina C., Tavaría F.K., Pintado M.M., 2012. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. *Anaerobe* 18: 305–309.
- Grenha A., 2012. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *Journal of Targeting* 20: 291–300.
- Elgadir M.A., Uddin M.S., Ferdosh S., Adam A., Chowdhury A.J.K., Sarker M.Z.I., 2015. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: a review. *Journal of Food and Drug Analysis* 23: 619–629.
- Harkins A.L., Duri S., Kloth L.C., Tran C. D., 2014. Chitosan- cellulose composite for wound dressing material. Part 2. Antimicrobial activity, blood absorption ability, and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 102(6): 1199-1206.
- Kamat V., Marathe I., Ghormade V., Bodas D., Paknikar K., 2015. Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles and in situ drug loading using active microreactor. *ACS Applied Materials and Interfaces* 7: 22839–22847.
- Mohamad N., Amin M.C.I.M., Pandey M., Ahmad N., Rajab N.F. 2014. Bacterial cellulose/acrylic acid hydrogel synthesized via electron beam irradiation: Accelerated burn wound healing in an animal model. *Carbohydrate Polymers* 114: 312–320.
- Moura L.I.F., Dias A.M.A., Carvalho E., de Sousa H. C., 2013. Review Recent advances on the Development of Wound Dressings for Diabetic Foot Ulcer Treatment—A review. *Acta Biomaterialia* 9: 7093–7114.
- Nyo D.H., Kim S.K., 2014. Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. *Advances in Food and Nutrition Research* 73:15-31.
- Ono S., Imai R., Ida Y., Shibata D., Komiya T., Matsumura H., 2015 Increased Wound pH as an Indicator of Local Wound Infection in Second Degree Burns. *Burns* 41: 820-824.
- Panzarasa G., Osypovaa A., Toncelli C., Buhmann M.T., Rottmar M., Ren Q., Maniura-Weber K., Rossi R.M., Boesel L.F., 2017. The Pyranine-Benzalkonium Ion Pair: A Promising Fluorescent System for the Ratiometric Detection of Wound pH. *Sensors and Actuators B* 249 : 156–160.
- Prabaharan M., 2015. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 72: 1313–1322.
- Reich G., 2007. From Collagen To Leather-The Theoretical Background, Basf, (Ludwigshafen) 329.

- Sahiner M., Alparslan D., Bitlisli B.O., 2014. Collagen-Based Hydrogel Films As Drug-Delivery Devices With Antimicrobial Properties. *Polymer Bulletin* 71: 3017–3033.
- Sahiner M., 2015. Kollajen Esaslı Polimerik Kompozit Malzeme Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyomalzeme olarak Değerlendirilebilirliği. FBE, Ege Üniversitesi, Bornova, Türkiye (Doktora Tezi).
- Sahiner N., Sagbasa S., Sahiner M., Silan C, Aktas N., Turk M., 2017. Agar/Chitosan IPN Thin Hydrogel Films with Antimicrobial and Antioxidant Properties for Potential Dressing Applications Current. *Applied Polymer Science* 1: 52-62.
- Schneider L.A., Korber A., Grabbe S., Dissemond J. 2007. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy. *Archives of Dermatological Research* 298: 413-420.
- Seon G. M., Lee M. H., Kwon B.-J., Kim M.S., Koo M.-A., Seomun Y., Kim J.-T., Kim T. H., Park J.-C., 2018. Recombinant Batroxobin-Coated Nonwoven Chitosan as Hemostatic Dressing for initial Hemorrhage Control. *International Journal of Biological Macromolecules* 113: 757–763.
- Shao L., Cao Y., Li Z., Hu W., Li S., Lu L., 2018. Dual Responsive Aerogel Made From Thermo/Ph Sensitive Graft Copolymer Alginate-G-P(NIPAM-co-NHMAM) For Drug Controlled Release. *International Journal of Biological Macromolecules* 114: 1338–1344.
- Sun L., Li B., Song W., Si L., Hou H., 2017. Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) Skin Collagen and Fabrication of Collagen Sponge as a Good Biocompatible Biomedical Material. *Process Biochemistry* 63: 229–235.
- Suner S. S., Sahiner M., Sengel S.B., Ress D.J., Redd W. F., Sahiner N., 2018. Chapter 17: Responsive Biopolymer-Based Microgels/Nanogels for Drug Delivery Applications. In: Makhoulouf A.S.H., Abu-Thabit N.Y. Ed. *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*. Woodhead Elsevier 453-500.
- Ward M.A., Georgiou T.K., 2011. Georgiou, Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications, *Polymers* 3: 1215.
- Zhang Q., Wang Q., Lv S., Lu J., Jiang S., Regenstein J.M., Lin L., 2016. Comparison of Collagen and Gelatin Extracted from the Skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Bioscience*. 13: 41–48.
- Zhang J., Tan W., Wang G., Yin X., Li Q., Dong F. Guo Z., 2018. Synthesis, characterization, and the antioxidant activity of N,N,N-trimethyl chitosan salts. *International Journal of Biological Macromolecules* 118: 9–14.
- Zubareva A., Shagdarova B., Varlamova V., Kashirina E., Svirshchevskaya E., 2017. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives. *European Polymer Journal* 93: 743–749.