

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**L-ASPARAGİNAZ İÇEREN BİYOBOZUNUR ŞEKİL HAFIZALI  
STENT-ENZİM İLAÇ FORMÜLASYONLARININ  
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**AHMET ULU**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**MALATYA**

**HAZİRAN 2019**

**Tezin Başlığı:** L-Asparaginaz İçeren Biyobozunur Şekil Hafızalı Stent-Enzim İlaç  
Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

**Tezi Hazırlayan:** Ahmet ULU

**Sınav Tarihi:** 19.06.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi yeleri

**Prof. Dr. Burhan ATEŞ** (Danışman) .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. İsmet YILMAZ** .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE** .....  
İnönü Üniversitesi

**Prof. Dr. Rana SANYAL** .....  
Boğaziçi Üniversitesi

**Prof. Dr. Meltem ASİLTÜRK** .....  
Akdeniz Üniversitesi

**Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL**

Enstitü Müdürü

## ONUR SÖZÜ

Doktora tezi olarak sunduğum ‘‘L-Asparaginaz İçeren Biyobozunur Őekil Hafızalı Stent-Enzim İlaç Formölasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu’’ baŐlıklı bu çalıŐmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dűŐecek bir yardıma baŐvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluŐtuđunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ahmet ULU

# ÖZET

Doktora Tezi

## L-ASPARAGİNAZ İÇEREN BİYOBOZUNUR ŞEKİL HAFIZALI STENT-ENZİM İLAÇ FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ahmet ULU

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

187+xx

2019

Danışman: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

L-asparaginaz (L-ASNaz), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hastalığının tedavisinde kullanılan birincil kemoterapötik ilaçtır. Hastalara immün yanıtın azaltılması için, L-ASNaz'ın polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş formu uygulanmaktadır. Ancak, bu enzim ilacın plazma yarı ömrünün kısa ve pahalı olması yüzünden kullanımı ve erişilebilirliği kısıtlıdır. Bu noktada ALL tedavisinde karşılaşılan sorunları çözmek için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Biyobozunur stentler son zamanlarda biyoyumlulukları ve zamanla bozunarak yok olmaları bakımından gelecek vaat eden uygulamalardır.

Tez kapsamında öncelikle kitosan (CHI), gliserol (GLY), polietilen glikol (PEG), polipropilen glikol (PPG) ve polivinil alkol (PVA) monomerlerinden yola çıkarak CHI/GLY/PEG, CHI/GLY/PPG ve CHI/GLY/PVA temelli hidrojel hazırlanmış ve çapraz bağlayıcı ajan (sodyum tripolifosfat) ile biyobozunur stent formuna dönüştürülmüştür. Stentlerin yapısal ve termal karakterizasyonları FTIR, DTA, TGA ve DSC ile belirlenmiştir. Bunun yanı sıra hazırlanan stentlerin şişme derecesi, su tutma kapasitesi, gaz geçirgenliği, *in vitro* biyobozunurluğu ve sıvı temas açıları belirlenmiştir. Daha sonra hazırlanan hidrojelere L-ASNaz enzimi *in situ* olarak immobilize edilmiş ve enzim konsantrasyonu, immobilizasyon süresi, çapraz bağlayıcı oranı ve çapraz bağlama süreleri incelenerek en uygun stent formülasyonu belirlenmiştir. Seçilen en uygun biyobozunur stentlerin *in vitro* biyoyumlulukları ASTM standartlarına göre L929 hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Ayrıca, protein adsorpsiyonu, porozitesi ve mekanik özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan bu stentlerdeki enzimin varlığı (FTIR, EDX, XRD) etkinliği ve optimum parametreleri (pH, sıcaklık, termal kararlılık, depo kararlılığı, yeniden kullanılabilirlik vb.) ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Son olarak, stent-enzim ilaç formülasyonunun *in vitro* damar akış koşullarında uygulanabilirliği mimetik olarak dizayn edilen biyoreaktör sisteminde test edilmiştir.

Sonuçlarımıza göre, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının damar akış koşullarında başlangıç aktivitelerinin yarısından fazlasını koruduğu görülmüştür. Ayrıca enzim içeren şekil hafızalı polimerik stent formülasyonlarının biyoyumluluk, biyobozunurluk ve yeterli mekanik karaktere sahip oldukları tespit edilmiştir. Buna ilaveten formülasyonların pH ve termal kararlılığı, yeniden kullanılabilirliği ve uzun süreli depolama kararlılığının umut verici düzeyde olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** L-asparaginaz, Biyobozunur stent, Enzim immobilizasyon, Enzim-ilac

## ABSTRACT

Ph.D Thesis

### THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIODEGRADABLE SHAPE-MEMORY STENT-ENZYME DRUG FORMULATION INCLUDING L-ASPARAGINASE

Ahmet ULU

İnönü University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Department

187+xx

2019

Supervisor: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

L-asparaginase (L-ASNase) is the primary chemotherapeutic drug used in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). To reduce the immune response in patients, the modified form of L-ASNase with polyethylene glycol (PEG) is applied. However, usage and accessibility of this enzyme has limited due to its short plasma half-life and expensive. At this point, it is needed novel approaches to solve the problems encountered in the treatment of ALL. Biodegradable stents are promising applications for their biocompatibility and degradation over time.

Within the scope of the thesis, firstly, hydrogels with CHI/GLY/PEG, CHI/GLY/PPG and CHI/GLY/PVA based on chitosan (CHI), glycerol (GLY), polyethylen glychol (PEG), polypropylene glychol (PPG) and polyvinyl alcohol (PVA) were prepared and biodegradable stents with cross-linking agent (sodium tripolyphosphate) were obtained. Structural and thermal characterizations of the stents were determined by FTIR, DTA, TGA and DSC. In addition, the degree of swelling, water uptake capacity, gas permeability, *in vitro* biodegradability and water contact angles of the prepared stents were determined. Then, L-ASNase enzyme was immobilized on the stents as *in situ* and the optimal stent formulations were determined by examining enzyme concentration, immobilization time, crosslinker ratio and crosslinking times. *In vitro* biocompatibility of the optimal biodegradable stents was investigated on L929 cells according to ASTM standards. In addition, protein adsorption, porosity and mechanical properties were investigated in these stents. Presence of enzyme in these prepared stents (FTIR, EDX, XRD) and optimum parameters (pH, temperature, thermostability, storage stability, re-usability etc.) were studied in detail. Finally, the applicability of the stent-enzyme drug formulation in *in vitro* vessel flow conditions was tested in a mimetic designed bioreactor system.

According to our results, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNase, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNase and CHI/GLY/PVA-4@L-ASNase stent formulations maintained more than half of their initial activity under vascular flow conditions. In addition, it has been found that the shape memory polymeric stent formulations containing enzyme have biocompatibility, biodegradability and sufficient mechanical character. Additionally, the pH and thermostability, reusability and long-term storage stability of the formulations were determined to be promising.

**Key Words:** L-asparaginase, Biodegradable stent, Enzyme immobilization, Enzyme-drug

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, doktora eğitimimin başından sonuna kadar tüm sorun ve taleplerime sabır, anlayış ve olağanüstü destekleriyle bana rehberlik eden ve sunmuş olduğum doktora tezimde karşılaştığım problemlere bilimsel bilgi birikimiyle farklı yaklaşım yollarını gösteren, hedefe ulaşmak için ısrarcı olmayı öğreten danışman hocam Prof. Dr. Burhan ATEŞ'e, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Daha sonra tezime verdikleri faydalı yorum ve katkılar için tez izleme komite üyelerim Prof. Dr. İsmet YILMAZ'a ve Prof. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca karakterizasyon kısımlarında desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım İmren ÖZCAN'a, hücre kültürü çalışmalarını yürüten sevgili arkadaşım Sevgi BALCIOĞLU'na ve laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü yardımı gösteren sevgili arkadaşlarım Samir Abbas Ali NOMA'ya ve Gamze DİK'e çok teşekkür ederim.

Her şeyden önce hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Ayrıca, tüm sevinç ve sıkıntılarında yanımda olan, beni koşulsuz destekleyen, ilgi alanlarımın peşinden gitme konusunda teşvik eden, bana inanan ve yaptığım her şeyde beni destekleyeceğini bildiğim sevgili eşim Öznur DOĞAN ULU'ya sonsuz minnettarım.

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde ihtiyaç duyduğum imkanları bana sağlayan İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne ve **FDK-2017-751** nolu ve "***L-Asparaginaz İçeren Biyobozunur Şekil Hafızalı Stent-Enzim İlaç Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu***" başlıklı proje ile finansal destek sunan, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>ONUR SÖZÜ</b> .....	i
<b>ÖZET</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xviii
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b> .....	xix
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	4
2.1. L-ASNaz.....	4
2.2. L-ASNaz'ın Yapısı.....	5
2.3. L-ASNaz'ın Etki Mekanizması.....	7
2.4. L-ASNaz Kaynakları.....	8
2.4.1. Bakteriyel kaynaklar.....	8
2.4.2. Fungal kaynaklar.....	9
2.4.3. Maya kaynakları.....	10
2.4.4. Aktinomiset kaynakları.....	11
2.4.5. Algal kaynaklar.....	11
2.5. L-ASNaz'ın İlaç Uygulaması.....	11
2.6. Enzim İlaç Olarak L-ASNaz'ın Yan Etkileri.....	12
2.6.1. Aşırı duyarlılık (Hipersensitivite).....	13
2.6.2. Koagülasyon bozukluğu.....	13
2.6.3. Pankreatit, Hiperglisemi, Hepatotoksisite.....	13
2.7. Ticari L-ASNaz formülasyonları.....	14
2.8. Enzim İmmobilizasyonu.....	16
2.8.1. Fiziksel Metotlar.....	17
2.8.2. Tutuklama (Entrapment).....	18
2.8.3. Kovalent bağ.....	19
2.8.4. Çapraz bağlama.....	20

2.9.	Enzim İmmobilizasyon İçin Kullanılan Taşıyıcı Matrisler.....	20
2.9.1.	Manyetik nanopartiküller.....	21
2.9.2.	Mezogözenekli malzemeler.....	22
2.9.3.	Nanopartiküller.....	23
2.9.4.	Seramik malzemeler.....	23
2.9.5.	Karbon nanotüpler.....	24
2.9.6.	Grafen ve grafen oksit.....	25
2.9.7.	Elektrospun malzemeler.....	25
2.9.8.	Hibrit ve kompozit malzemeler.....	26
2.10.	L-ASNaz'ın İmmobilizasyonu.....	31
2.11.	Stentler.....	34
2.12.	Biyobozunur Polimerik Stentler.....	36
2.12.1.	Doymuş alifatik poliesterler.....	39
2.12.2.	Poli glikolik asit (PGA).....	40
2.12.3.	Poli Laktik Asit (PLA).....	40
2.12.4.	Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL).....	43
2.12.5.	Poli (orto esterler) (POE).....	44
2.12.6.	Poli (3-hidroksibutirat) (PHB).....	45
2.12.7.	Polianhidritler.....	46
2.12.8.	Poli (propilen fumarat) (PPF).....	47
2.12.9.	Poli (etilen glikol) (PEG).....	47
2.12.10.	Tirozin türevli polikarbonatlar.....	49
2.12.11.	Kitosan.....	51
2.13.	Ticari Biyobozunur Polimerik Stentler.....	52
2.13.1.	Igaki-Tamai stent.....	53
2.13.2.	Poli karbonat stent: REVA.....	54
2.13.3.	Poli salisilik asit stent: IDEAL BRS.....	54
2.14.	Tez Çalışmasının Amacı	55
<b>3.</b>	<b>MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>56</b>
3.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	56
3.2.	Kullanılan Cihazlar.....	57
3.3.	CHI/GLY/PEG Hidrojellerinin Hazırlanması.....	58

3.4.	CHI/GLY/PPG Hidrojellerinin Hazırlanması.....	59
3.5.	CHI/GLY/PVA Hidrojellerinin Hazırlanması.....	60
3.6.	Şekil Hafızalı Stentlerin Hazırlanması.....	61
3.7.	Hazırlanan Şekil Hafızalı Stentlerin Karakterizasyonu.....	61
3.7.1.	FTIR analizi.....	61
3.7.2.	Termal analiz.....	62
3.7.3.	Sıvı temas açısı ölçümleri.....	62
3.7.4.	Dinamik şişme ve su tutma kapasitesi testleri.....	62
3.7.5.	Oksijen geçirgenliği.....	63
3.7.6.	<i>İn vitro</i> biyobozunurluk testi.....	63
3.8.	L-ASNaz İçeren Şekil Hafızalı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması.....	63
3.9.	L-ASNaz-Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu.....	64
3.9.1.	FTIR analizi.....	64
3.9.2.	XRD analizi.....	64
3.9.3.	SEM ve EDX analizi.....	64
3.9.4.	Protein adsorpsiyonu, porozite ve su buharı iletim hızı.....	64
3.9.5.	Mekanik özellikler.....	65
3.9.6.	<i>İn vitro</i> sitotoksosite.....	66
3.10.	L-ASNaz Aktivitesi.....	66
3.11.	İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu.....	67
3.11.1.	Optimum pH.....	67
3.11.2.	Optimum sıcaklık.....	67
3.11.3.	Aktivasyon enerjisi.....	67
3.11.4.	Termal kararlılık.....	68
3.11.5.	Tekrar kullanılabilirlik.....	68
3.11.6.	Depolama kararlılığı.....	68
3.11.7.	Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat özgüllüğü.....	68
3.11.8.	Tripsin direnci.....	69
3.11.9.	<i>İn vitro</i> akış koşullarında stent formülasyonlarının uygulanabilirliği.....	69
<b>4.</b>	<b>BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>70</b>

4.1.	CHI/GLY/PEG Hidrojellerinin Karakterizasyonu.....	70
4.1.1.	FTIR analizi.....	70
4.1.2.	Termal analiz.....	72
4.1.3.	Sıvı temas açısı ve şişme derecesi.....	78
4.1.4.	Su tutma kapasitesi ve gaz geçirgenliği.....	80
4.1.5	<i>İn vitro</i> biyobozunurluk testi.....	81
4.1.6	L-ASNaz içeren CHI/GLY/PEG formülasyonlarının hazırlanması.....	82
4.1.7	CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonunun karakterizasyonu.....	84
4.1.7.1.	FTIR analizi.....	84
4.1.7.2.	XRD analizi.....	85
4.1.7.3.	SEM analizi.....	87
4.1.7.4.	EDX analizi.....	89
4.2.	CHI/GLY/PPG Hidrojellerinin Karakterizasyonu.....	90
4.2.1.	FTIR analizi.....	90
4.2.2.	Termal analiz.....	92
4.2.3.	Sıvı temas açısı ve şişme derecesi.....	97
4.2.4.	Su tutma kapasitesi ve gaz geçirgenliği.....	97
4.2.5.	<i>İn vitro</i> biyobozunurluk testi.....	98
4.2.6.	L-ASNaz içeren CHI/GLY/PPG formülasyonlarının hazırlanması	99
4.2.7.	CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz formülasyonunun karakterizasyonu.....	101
4.2.7.1.	FTIR analizi.....	101
4.2.7.2.	XRD analizi.....	102
4.2.7.3.	SEM analizi.....	103
4.2.7.4.	EDX analizi.....	105
4.3.	CHI/GLY/PVA Hidrojellerinin Karakterizasyonu.....	106
4.3.1.	FTIR analizi.....	106
4.3.2.	Termal analiz.....	108
4.3.3.	Sıvı temas açısı ve şişme derecesi.....	114
4.3.4.	Su tutma kapasitesi ve gaz geçirgenliği.....	115

4.3.5.	<i>In vitro</i> biyobozunurluk testi.....	116
4.3.6	L-ASNaz içeren CHI/GLY/PVA formülasyonlarının hazırlanması	117
4.3.7.	CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz formülasyonunun karakterizasyonu.....	119
4.3.7.1.	FTIR analizi.....	119
4.3.7.2.	XRD analizi.....	120
4.3.7.3.	SEM analizi.....	120
4.3.7.4.	EDX analizi.....	122
4.3.8.	Enzim aktivitesi sonucu seçilmiş örneklerin ileri karakterizasyonları.....	123
4.3.8.1.	Protein adsorbsiyonu.....	124
4.3.8.2.	Porozite ve su buharı geçirgenliği.....	125
4.3.8.3.	Mekanik özellikler.....	126
4.3.8.4.	<i>In vitro</i> sitotoksosite.....	127
4.3.9.	CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonunun immobilizasyon parametreleri.....	133
4.3.9.1.	Optimum pH ve optimum sıcaklık.....	133
4.3.9.2.	Termal kararlılık ve aktivasyon enerjisi.....	135
4.3.9.3.	Tekrar kullanılabilirlik.....	137
4.3.9.4.	Depolama kararlılığı.....	138
4.3.9.5.	Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat spesifikliğı.....	139
4.3.9.6.	Tripsin direnci.....	140
4.3.10.	CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz formülasyonunun immobilizasyon parametreleri.....	141
4.3.10.1.	Optimum pH ve optimum sıcaklık.....	141
4.3.10.2.	Termal kararlılık ve aktivasyon enerjisi.....	142
4.3.10.3.	Tekrar kullanılabilirlik.....	144
4.3.10.4.	Depolama kararlılığı.....	145
4.3.10.5.	Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat spesifikliğı.....	146
4.3.10.6.	Tripsin direnci.....	147
4.3.11.	CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz formülasyonunun immobilizasyon parametreleri.....	148

4.3.11.1.	Optimum pH ve optimum sıcaklık.....	148
4.3.11.2.	Termal kararlılık ve aktivasyon enerjisi.....	149
4.3.11.3.	Tekrar kullanılabilirlik.....	150
4.3.11.4.	Depolama kararlılığı.....	151
4.3.11.5.	Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat spesifikliği.....	152
4.3.11.6.	Tripsin direnci.....	153
4.3.12.	<i>İn vitro</i> akış koşullarında stent formülasyonlarının uygulanabilirliği.....	154
<b>5.</b>	<b>SONUÇ</b> .....	<b>156</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>159</b>
	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>180</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	<i>E. coli</i> L-ASNaz'ın sekonder yapı elemanlarını gösteren monomerinin bir şerit gösterimi.....	6
Şekil 2.2.	L-ASNaz enziminin reaksiyonunun genel hidroliz mekanizması.....	8
Şekil 2.3.	Kanserli hücrelerde L-ASNaz'ın kemoterapötik etkisinin şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.4.	L-ASNaz'ın pegilasyon işleminin gösterimi.....	16
Şekil 2.5.	Enzim immobilizasyon metotları.....	16
Şekil 2.6.	Klinik veya prelinik kullanımda olan ticari biyobozunur stentlerin tasarımı.....	42
Şekil 2.7.	Retina tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen PCL stenti.....	43
Şekil 2.8.	PU/PCL (70/30) 'dan yapılan vida stentinin görüntüleri.....	44
Şekil 2.9.	(a) PEG-PCL:6040 şekil hafızalı stentin yandan ve kesit alanının görünümü (b) 1 ve (c) 2 aylık yıkamadan sonra PEG-PCL:6040 stenti.....	49
Şekil 2.10.	CHI-GLY-PEG biyobozunur stentlerinin farklı pH'larda şekil hafıza karakteri ve şişme görüntüsü.....	52
Şekil 2.11.	Klinik veya prelinik kullanımda olan ticari biyobozunur stentlerin tasarımı.....	53
Şekil 3.1.	CHI temelli şekil hafızalı biyobozunur stent formülasyonlarının hazırlanma aşamaları.....	61
Şekil 3.2.	<i>İn vitro</i> biyomimetik reaktör sisteminin şematik gösterimi.....	69
Şekil 4.1.	Saf CHI (a), CHI/GLY (b) ve saf PEG (c) örneklerine ait FTIR spektrumları.....	71
Şekil 4.2.	Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait FTIR spektrumları; (a) CHI/GLY/PEG-1, (b) CHI/GLY/PEG-2, (c) CHI/GLY/PEG-3, (d) CHI/GLY/PEG-4 ve (e) CHI/GLY/PEG-5.....	72
Şekil 4.3.	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG malzemelerine ait TGA termogramları.....	73

<b>Şekil 4.4.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG malzemelerine ait DTA termogramları.....	74
<b>Şekil 4.5.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG malzemelerine ait DSC termogramları.....	75
<b>Şekil 4.6.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait TGA termogramları .....	76
<b>Şekil 4.7.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait DTA termogramları.....	77
<b>Şekil 4.8.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait DSC termogramları.....	78
<b>Şekil 4.9.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerinin (A) sıvı temas açıları ve (B) dinamik şişme testi sonuçları.....	79
<b>Şekil 4.10.</b>	CHI/GLY/PEG hidrojellerinin kuru (A), şişmiş haldeki (B) ve karşılaştırmalı (C) sonuçlarının fotoğraf görüntüleri.....	80
<b>Şekil 4.11.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerinin (A) su tutma kapasitesi ve (B) O <sub>2</sub> geçirgenlik testi sonuçları.....	81
<b>Şekil 4.12.</b>	CHI/GLY/PEG hidrojellerinin <i>in vitro</i> biyobozunurluk test sonuçları.....	82
<b>Şekil 4.13.</b>	L-ASNaz içeren CHI/GLY/PEG formülasyonlarının hazırlanması için optimum parametrelerin belirlenmesi: A) CHI/PEG oranı, B) Enzim miktarı, C) İmmobilizasyon süresi, D) Çapraz bağlama süresi ve E) TPP oranı.....	84
<b>Şekil 4.14.</b>	(a) CHI/GLY/PEG-3 ve (b) CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları.....	85
<b>Şekil 4.15.</b>	CHI, CHI/GLY, PEG10.000, CHI/GLY/PEG-3 ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneklerinin XRD spektrumları..	86
<b>Şekil 4.16.</b>	CHI (a, b), CHI/GLY (c, d), CHI/GLY/PEG-3 (e, f), CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz (g, h) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (i, j) SEM görüntüleri.....	88
<b>Şekil 4.17.</b>	CHI (a), CHI/GLY, CHI/GLY/PEG-3 (b), CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz (c) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (d) EDX spektrumları.....	89
<b>Şekil 4.18.</b>	Saf CHI (a), CHI/GLY (b) ve saf PPG (c) örneklerine ait FTIR spektrumları.....	90

<b>Şekil 4.19.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait FTIR spektrumları; (a) CHI/GLY/PPG-1, (b) CHI/GLY/PPG-2, (c) CHI/GLY/PPG-3, (d) CHI/GLY/PPG-4 ve (e) CHI/GLY/PPG-5.....	91
<b>Şekil 4.20.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait TGA termogramları.....	92
<b>Şekil 4.21.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait DTA termogramları.....	93
<b>Şekil 4.22.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait DSC termogramları.....	94
<b>Şekil 4.23.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait TGA termogramları.....	95
<b>Şekil 4.24.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait DTA termogramları.....	96
<b>Şekil 4.25.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait DSC termogramları.....	96
<b>Şekil 4.26.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerinin (A) sıvı temas açısı ve (B) şişme oranı sonuçları.....	97
<b>Şekil 4.27.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerinin (A) su tutma kapasitesi ve (B) O <sub>2</sub> geçirgenlik testi sonuçları.....	98
<b>Şekil 4.28.</b>	CHI/GLY/PPG hidrojellerinin <i>in vitro</i> biyobozunurluk test sonuçları.....	99
<b>Şekil 4.29.</b>	L-ASNaz içeren CHI/GLY/PPG formülasyonlarının hazırlanması için optimum parametrelerin belirlenmesi: A) CHI/PPG oranı, B) Enzim miktarı, C) İmmobilizasyon süresi, D) Çapraz bağlama süresi ve E) TPP oranı.....	101
<b>Şekil 4.30.</b>	(a) CHI/GLY/PPG-4 ve (b) CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları.....	102
<b>Şekil 4.31.</b>	CHI, CHI/GLY, CHI/GLY/PPG-4 ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneklerinin XRD spektrumları.....	103
<b>Şekil 4.32.</b>	CHI (a, b), CHI/GLY (c, d), CHI/GLY/PPG-4 (e, f), CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz (g, h) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (i, j) SEM görüntüleri.....	104

<b>Şekil 4.33.</b>	CHI (a) CHI/GLY/PPG-4 (b), CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz (c) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (d) EDX spektrumları.....	105
<b>Şekil 4.34.</b>	Saf CHI (a), CHI/GLY (b) ve saf PVA (c) örneklerine ait FTIR spektrumları.....	106
<b>Şekil 4.35.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait FTIR spektrumları; (a) CHI/GLY/PVA-1, (b) CHI/GLY/PVA-2, (c) CHI/GLY/PVA-3, (d) CHI/GLY/PVA-4 ve (e) CHI/GLY/PVA-5.....	107
<b>Şekil 4.36.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait TGA termogramları.....	109
<b>Şekil 4.37.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait DTA termogramları.....	110
<b>Şekil 4.38.</b>	Saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait DSC termogramları.....	111
<b>Şekil 4.39.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait TGA termogramları.....	112
<b>Şekil 4.40.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait DTA termogramları.....	113
<b>Şekil 4.41.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait DSC termogramları.....	114
<b>Şekil 4.42.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerinin (A) sıvı temas açısı ve (B) şişme sonuçları.....	115
<b>Şekil 4.43.</b>	Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerinin (A) su tutma kapasitesi ve (B) O <sub>2</sub> geçirgenlik testi sonuçları.....	116
<b>Şekil 4.44.</b>	CHI/GLY/PVA hidrojellerinin <i>in vitro</i> biyobozunurluk test sonuçları.....	117
<b>Şekil 4.45.</b>	L-ASNaz içeren CHI/GLY/PVA formülasyonlarının hazırlanması için optimum parametrelerin belirlenmesi: A) CHI/PVA oranı, B) Enzim miktarı, C) İmmobilizasyon süresi, D) Çapraz bağlama süresi ve E) TPP oranı.....	118
<b>Şekil 4.46.</b>	CHI/GLY/PVA-4 ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları.....	119
<b>Şekil 4.47.</b>	CHI, CHI/GLY, PVA, CHI/GLY/PVA-4 ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneklerinin XRD spektrumları.....	120

<b>Şekil 4.48.</b>	CHI (a, b), CHI/GLY (c, d), CHI/GLY/PVA-4 (e, f), CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz (g, h) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (i, j) SEM görüntüleri.....	122
<b>Şekil 4.49.</b>	CHI (a), CHI/GLY/PVA-4 (b), CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz (c) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (d) EDX spektrumları.....	123
<b>Şekil 4.50.</b>	Hazırlanan hidrojel örneklerinin protein (BSA ve fibrinojen) adsorpsiyon sonuçları.....	124
<b>Şekil 4.51.</b>	Hazırlanan hidrojellerin mekanik test sonuçları; (A) gerilme direnci, (B) % uzama.....	127
<b>Şekil 4.52.</b>	CHI, CHI/GLY, PEG 10.000 ve CHI/GLY/PEG-3 örneklerinin L929 fare hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları.....	128
<b>Şekil 4.53.</b>	L929 fibroblast hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (a) Kontrol, (b) CHI, (c) CHI/GLY, (d) PEG ve (e) CHI/GLY/PEG-3.....	129
<b>Şekil 4.54.</b>	CHI, CHI/GLY, PPG ve CHI/GLY/PPG-4 örneklerinin L929 fare hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları.....	130
<b>Şekil 4.55.</b>	L929 fibroblast hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (a) Kontrol, (b) CHI, (c) CHI/GLY, (d) PPG ve (e) CHI/GLY/PPG-4.....	131
<b>Şekil 4.56.</b>	CHI, CHI/GLY, PVA ve CHI/GLY/PVA-4 örneklerinin L929 fare hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları.....	132
<b>Şekil 4.57.</b>	L929 fibroblast hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (a) Kontrol, (b) CHI, (c) CHI/GLY, (d) PVA ve (e) CHI/GLY/PVA-4.....	133
<b>Şekil 4.58.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun (A) optimum pH ve (B) sıcaklık grafiği.....	135
<b>Şekil 4.59.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları.....	136
<b>Şekil 4.60.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun Arrhenius grafiği.....	137
<b>Şekil 4.61.</b>	CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun tekrar kullanılabilirliği.....	138
<b>Şekil 4.62.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun +4 °C ve oda koşullarında depolama kararlılığı grafiği.....	139

<b>Şekil 4.63.</b>	Kimyasal parametrelerin serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz'ın üzerindeki etkisi a) Metal iyonlarının (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; b) İnhibitörlerin (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; c) Substrat (10 mM) özgülüğü.....	140
<b>Şekil 4.64.</b>	Serbest ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direnci.....	141
<b>Şekil 4.65.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun (A) optimum pH ve (B) sıcaklık grafiği.....	142
<b>Şekil 4.66.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları.....	143
<b>Şekil 4.67.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun Arrhenius grafiği.....	144
<b>Şekil 4.68.</b>	CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun yeniden kullanılabilirliği.....	145
<b>Şekil 4.69.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun +4 °C ve oda koşullarında depolama kararlılığı grafiği.....	145
<b>Şekil 4.70.</b>	Kimyasal parametrelerin serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz'ın üzerindeki etkisi a) Metal iyonlarının (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; b) İnhibitörlerin (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; c) Substrat (10 mM) özgülüğü.....	147
<b>Şekil 4.71.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun tripsin direncinin grafiği.....	148
<b>Şekil 4.72.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun (A) optimum pH ve (B) sıcaklık grafiği.....	149
<b>Şekil 4.73.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları.....	150
<b>Şekil 4.74.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun Arrhenius grafiği.....	150
<b>Şekil 4.75.</b>	CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun yeniden kullanılabilirliği.....	151
<b>Şekil 4.76.</b>	Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun +4 °C ve oda koşullarında depolama kararlılığı grafiği.....	152

<b>Şekil 4.77.</b> Kimyasal parametrelerin serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz'ın üzerindeki etkisi a) Metal iyonlarının (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; b) İnhibitörlerin (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; c) Substrat (10 mM) özgülüğü.....	153
<b>Şekil 4.78.</b> Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun tripsin direncinin grafiği.....	154
<b>Şekil 4.79.</b> CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının <i>in vitro</i> akış koşullarında uygulanabilirliği.....	155



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b>	L-ASNaz'ın kemoterapötik ilaç olarak kullanılmasının tarihsel gelişimi.....	5
<b>Tablo 2.2.</b>	L-ASNaz için bakteri kaynakları.....	9
<b>Tablo 2.3.</b>	L-ASNaz için fungus kaynakları.....	10
<b>Tablo 2.4.</b>	L-ASNaz için maya kaynakları.....	10
<b>Tablo 2.5.</b>	L-ASNaz için aktinomiset kaynakları.....	11
<b>Tablo 2.6.</b>	Yaygın olarak kullanılan üç L-ASNaz formülasyonu.....	14
<b>Tablo 2.7.</b>	Farklı ülkelerde tedavide kullanılan ticari L-ASNaz formülasyonları.....	15
<b>Tablo 2.8.</b>	Çeşitli malzemelerin gerilme direnci, basınç dayanımı, elastik modülü ve kırılma dayanımı.....	35
<b>Tablo 2.9.</b>	En yaygın kullanılan biyobozunur polimerlerin bazı özellikleri.....	37
<b>Tablo 2.10.</b>	Alifatik poliester stentler.....	39
<b>Tablo 3.1.</b>	Tez kapsamında kullanılan kimyasallar.....	56
<b>Tablo 3.2.</b>	Tez kapsamında kullanılan cihazlar.....	57
<b>Tablo 3.3.</b>	CHI/GLY/PEG formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan monomerlerin oranı ve örnek kodları.....	59
<b>Tablo 3.4.</b>	CHI/GLY/PPG formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan monomerlerin oranı ve örnek kodları.....	60
<b>Tablo 3.5.</b>	CHI/GLY/PVA formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan monomerlerin oranı ve örnek kodları.....	60
<b>Tablo 4.1.</b>	Hazırlanan hidrojellerin sıvı yer değiştirme yöntemiyle elde edilen porozite değerleri ve su buharı iletim hızı sonuçları.....	126

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ALL</b>	Akut Lenfoblastik Lösemi
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CA</b>	Kaproik asit
<b>CHI</b>	Kitosan
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DSC</b>	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
<b>DTA</b>	Diferansiyel Termal Analiz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Ea</b>	Aktivasyon enerjisi
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>EDX</b>	Enerji Dağılımı X- Işını Spektroskopisi
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FTIR/ATR</b>	Fourier Transform Infra-Red-Attenuated Total Reflection
<b>GA</b>	Glikolik asit
<b>GLY</b>	Gliserol
<b>GO</b>	Grafen oksit
<b>LA</b>	Laktik asit
<b>L-Asn</b>	L-Asparajin
<b>L-ASNaz</b>	L-asparaginaz
<b>L-Asp</b>	L-aspartik asit
<b>LBL</b>	Layer by layer
<b>L-Glu</b>	Glutamin
<b>MNP</b>	Manyetik nanopartikül
<b>mPEG</b>	Monometoksipolietilen glikol
<b>MTT</b>	[3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenilltetrazolyum bromür]
<b>PCL</b>	Poli-kaprolakton
<b>PEG</b>	Polietilen glikol
<b>PGA</b>	Poli glikolid
<b>PHB</b>	Polihidroksibütirat

<b>PHEMA</b>	Polihidroksietilmetakrilat
<b>PLGA</b>	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
<b>PLLA</b>	Poli L-laktit
<b>PMAA-ko-PMMA</b>	Polimetakrilikasit-ko- Polimetilmetakrilat
<b>PMMA</b>	Polimetilmetakrilat
<b>POE</b>	Poliorto ester
<b>Poli(HEMA-GMA)</b>	Poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidilmetakrilat)
<b>PPF</b>	Poli (propilen fumarat)
<b>PPG</b>	Poli(propilen glikol)
<b>PSMA</b>	Poli (stiren-ko-maleik asit)
<b>PVA</b>	Poli(vinil alkol)
<b>SDS</b>	Sodyumdodesilsülfat
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TCA</b>	Trikloroasetik asit
<b>TGA</b>	Termogravimetrik Analiz
<b>TPP</b>	Sodyum tripolifosfat
<b>XRD</b>	X-ışını kırınım

## 1. GİRİŞ

Bir ilacın taşınma yöntemi o ilacın biyolojik etkinliği üzerinde oldukça önemlidir. Birçok ilaç, maksimum yararın elde edilmesi için optimum konsantrasyon aralığında uygulanmalıdır. Bu aralığın üzerindeki konsantrasyonlarda toksik etki oluşabilir veya altındaki konsantrasyonlarda ise hiçbir terapötik fayda sağlanamaz. Bu nedenle ilaçlardan hastalıkların tedavisinde optimum yararın sağlanması ve uygulamada istenilen doz ayarlamasının yapılabilmesi oldukça önemli olup ilaç taşıyıcı sistemler bu alanda hayati öneme sahiptir.

İlaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi birçok bilimsel altyapı gerektirmekte olup multidisipliner yaklaşıma ihtiyaç duymaktadır. İlaçların farmakokinetiğini, farmakodinamiğini, toksisitesini, immünojenikliğini, biyobilişimini ve etkinliğini kontrol etmek için polimer bilimi, eczacılık, biyo-konjugat kimyası ve moleküler biyolojiyi birleştiren multidisipliner yaklaşımlara dayanan, ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesine yönelik stratejiler üretilmiştir. Bu bağlamda, ilaç bozulmasını ve kaybını en aza indirmek, zararlı yan etkilerini önlemek ve ilaç biyoyararlanımını ve istenen bölgede biriken ilacın fraksiyonunu arttırmak için, çeşitli ilaç taşıma ve ilaç hedefleme sistemleri şu anda geliştirilme aşamasındadır. Son zamanlarda, bilim insanları ve özel şirketler bu ilaç taşıma sistemleri alanında kapsamlı ve yoğun araştırmalar yapmaktadır. İlaç taşıyıcıları arasında, çözünebilir polimerler, çözünmeyen veya biyobozunur doğal ve sentetik polimerler, mikrokapsüller, hücreler, lipoproteinler, lipozomlar ve misellerden oluşan mikro partiküller ve bunun yanı sıra nanopartiküller yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Stentler, genellikle medikal alanda damar tıkanıklıklarının açılması için kullanılmaktadır. İlaçlı stent uygulamalarında temel amaç plak oluşumunu engelleyerek damarın daha uzun süre açık kalmasını sağlamaktır. Biyobozunur stentler ise son zamanlarda biyoyumlulukları ve zamanla bozularak yok olmaları bakımından gelecek vaat eden uygulamalardır. Bu bağlamda tez kapsamındaki temel amacımız, stentlerin hâlihazırdaki rutin uygulamalarının dışına çıkarak L-asparaginaz (L-ASNaz, E.C. 3.5.1.1, L-asparagin amidohidrolaz) içeren biyobozunur stent-enzim ilaç formülasyonlarını oluşturmak ve metabolik hastalıkların tedavisinde yeni ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktır. Bu ilaçlar arasında L-ASNaz bu amaç için uygun enzim-ilaç olarak seçilmiştir. Bunun nedeni L-ASNaz'ın belli bir dokuya hedeflendirilmekten ziyade antikanser etkisini dolaşım sisteminde

göstermesidir. L-ASNaz, Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) hastalığının başlangıç aşaması olan remisyon indüksiyonu tedavisinde kullanılan birincil kemoterapötik ilaç olup hastalığın tedavisinde oldukça önemlidir. L-ASNaz hastalara genellikle intravenöz (damar yoluyla) yolla haftada 2-3 kez enjeksiyon yapılarak uygulanır. Uygulama sırasında oluşan immün yanıtın azaltılması için polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiş L-ASNaz formu kullanılmaktadır. Ancak, enzimin yan etkileri sonucu oluşan organ hasarları, plazma yarı ömrünün kısa ve pahalı bir enzim-ilaç olması yüzünden kullanımı ve erişilebilirliği kısıtlıdır. Buna ilaveten kemoterapi sürecinde sürekli bir enjeksiyon uygulaması ve hastaneye bağımlılık, hastalarda manevi çöküntüye sebep olmaktadır. Bu noktada çocuklarda ve bazı yetişkinlerde son derece önemli olan bu hastalığın tedavisinde karşılaşılan sorunların çözülmesi ve yeni yaklaşımların sağlanması hayati öneme sahiptir.

Tez kapsamında öncelikle L-ASNaz enzimini taşıyabilecek, biyoyumlu ve biyobozunur ko-polimerik stent tasarımları gerçekleştirilmiştir. Bu tasarımlarda ko-polimer yapısı olarak, farklı monomer ve gözenek yapısına sahip çapraz bağlı CHI/GLY/PEG, CHI/GLY/PPG ve CHI/GLY/PVA içeren **15 adet** hidrojel hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak ve biyoyumluluğu arttırmak için sodyum tripolifosfat (TPP) kullanılarak şekil hafıza özelliğine sahip stent formu kazandırılmıştır. Formülasyonların kimyasal yapısı FTIR, termal davranışları TGA, DTA ve DSC yöntemleriyle karakterize edilmiştir. Yapısal ve termal karakterizasyonu tamamlanmış hidrojellerin hidrofilik/hidrofobik karakterini belirlemek için sıvı temas açısı ölçümleri, şişme testi, su tutma kapasitesi, gaz geçirgenliği ve *in vitro* biyobozunurluk ölçümleri yapılmıştır. Formülasyonlara L-ASNaz immobilizasyonu hazırlanma sırasında *in situ* olarak gerçekleştirilmiştir. En uygun immobilizasyon şartlarını belirlemek için enzim oranı, monomer oranı, immobilizasyon süresi, çapraz bağlama süresi ve TPP oranı gibi parametreler detaylı olarak araştırılmıştır. Bu aşamadan sonra seçilen **3 formülasyona** protein adsorpsiyonu, mekanik test, porozite *in vitro* sitotoksitesite testleri yapılmış ve seçilen örneklerin morfolojik özelliği SEM, kimyasal bileşimi EDX ve kristal veya amorf yapısı XRD ile belirlenmiştir. Ayrıca seçilen bu 3 formülasyondaki L-ASNaz enzimi için optimum pH, optimum sıcaklık, yeniden kullanılabilirlik, depolama kararlılığı gibi özellikler ortaya konmuş ve serbest L-ASNaz ile karşılaştırılmıştır. Son olarak, tez kapsamında hazırlanan **CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının** damar akış koşullarını taklit ettiğimiz

biyoreaktör sisteminde zamana karşı kararlılıkları ve kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Yapılan deney sonucunda her üç stent formülasyonun da başlangıç aktivitelerinin yarısından fazlasını koruduğu görülmüştür. Yapılan tüm çalışmalar ve elde edilen tüm sonuçlar ışığında, enzim içeren şekil hafızalı polimerik stent formülasyonlarının biyoyumluluk, biyobozunurluk ve yeterli mekanik karaktere sahip oldukları görülmüştür. Bu sonuçlar özellikle metabolik hastalıkların tedavisinde şekil hafızalı biyobozunur polimerik stentlerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılacakları konusunda oldukça önemlidir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. L-ASNaz

L-ASNaz, ALL ve diğer hematopoyetik kanser türlerinin tedavisi için önemli bir kemoterapötik ajandır. Antilösemik ilaç olarak L-ASNaz'ın gelişim süreci Tablo 2.1'de gösterilmiştir. 1950'li yılların başlarında Kidd, kobay (Ginepig) serumunun murin lenfomanın ilerlemesini durdurduğunu keşfetmiştir. Kidd önce lenfoma hücrelerini farelere transplante etmiştir. Sonra, onlara normal kobay serumunu belirli aralıklarla intraperitoneal enjeksiyonlar ile uygulamıştır. Bu tedavi, lenfoma gerilemesine ve tedavi edilen farelerin hayatta kalmasına yol açarken, kontrol farelerinde lenfomada giderek artmış ve 20-30 gün içinde ölmüşlerdir [1]. Ancak, kobay serumunun anti-lenfoma aktivitesinin keşfinden çok daha önce, Clementi 1922 yılında kobay serumunun zengin bir L-ASNaz kaynağı olduğunu rapor etmiştir [2]. Altmışlı yılların başlarında, kobay serum lenfoma hücreleri, L-Asparajin (L-Asn) amino asitinden yoksun bir şekilde hücre kültürü ortamında büyütülmüştür. Bu yoksunluk hücre popülasyonunu hızla azaltmış, fakat bazı hücreler hayatta kalmış ve hatta çoğalmaya başlamıştır. Bu nedenle, kobay serumunda bulunan L-ASNaz'ın antikanser aktivitesi gösterdiği sonucuna varılmıştır [3]. Bu gözlemler, başka araştırmacıların da ilgisini çekmiş ve tek kobay serumunun antikanser aktivitesine sahip olduğu, diğer hayvanlardan elde edilen serumların (at ve tavşan serumu gibi) bu etkiyi göstermediği bulunmuştur. Dahası, aynı serum birçok kanser türüne karşı test edilmiş ve sadece bazı kanserlere karşı etkili olduğu gözlemlenmiştir. *In vivo* çalışmalarda, kobay serumu belirli lenfoma hücre dizilerini inhibe edebilmiştir. Broome, antikanser aktivitesinde L-ASNaz'ın katkısını bulmak için araştırma yapmış ve L-ASNaz'ın kobay serumunda önemli bir antikanser ajanı olduğu sonucuna varmıştır. L-ASNaz üzerindeki ilk klinik çalışma 1966 yılında Dolowy tarafından yapılmıştır [4]. L-Asn'nin L-aspartik asit (L-Asp) ve amonyağa hidroliz edebilmesi nedeniyle L-ASNaz önemli bir kemoterapötik ajandır. ALL tedavisinde uzun zamandan beri mevcut L-ASNaz formülasyonları kullanılır, ancak bu formülasyonlar istenmeyen reaksiyonlara sebep olmaktadır. Bu nedenle, bu enzimin yan etkilere sebep olmayacak alternatif kaynaklarının araştırılması veya formülasyonlarının geliştirilmesi araştırmacılar için önemli bir alandır.

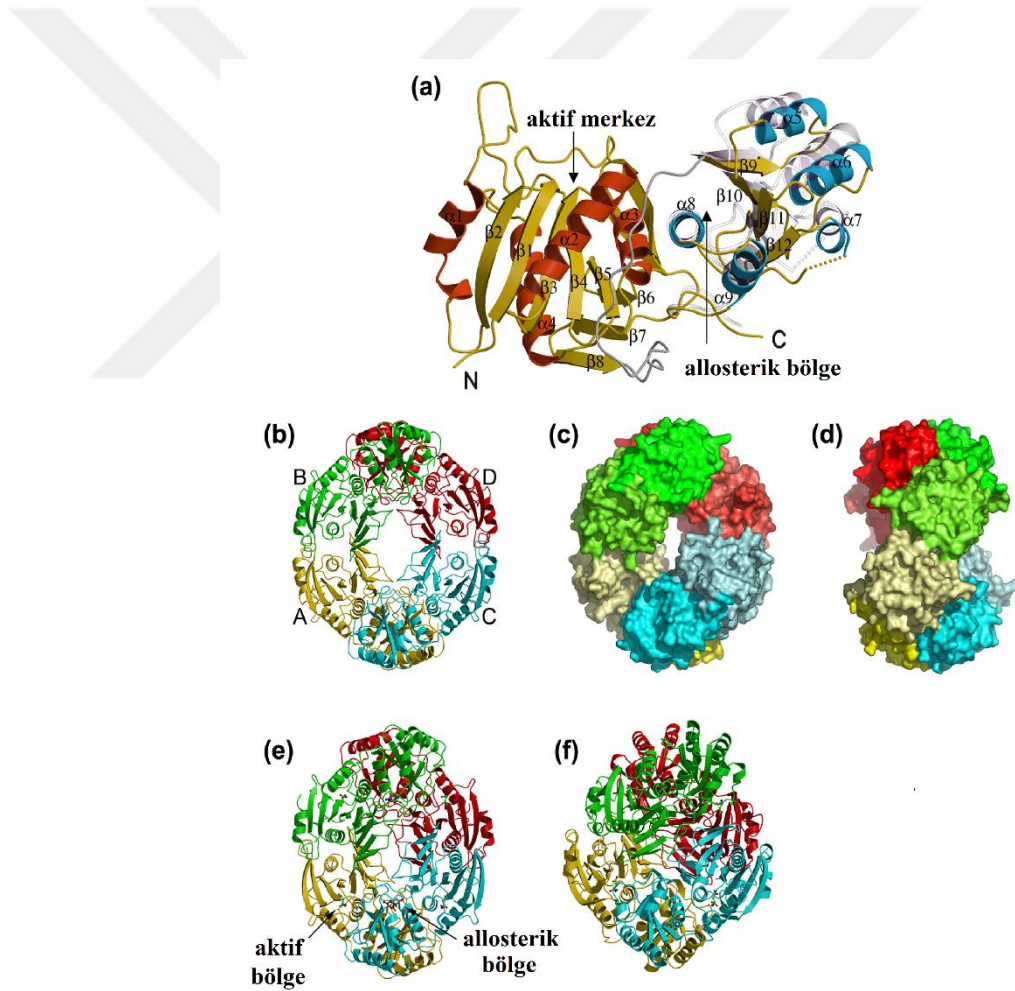
**Tablo 2.1.** L-ASNaz'ın kemoterapötik ilaç olarak kullanılmasının tarihsel gelişimi

Yıl	Gelişme
1953	Kidd: kobay serumunun antilösemik etkisinin keşfi
1963	Broome: Kobay serumunda L-ASNaz'ın antilösemik ajan olarak tanımlanması
1964–1967	<i>E. coli</i> türevli L-ASNaz ile tümör hücresi büyümesinin baskılanması; aktif <i>E. coli</i> izoformunun izolasyonu ve saflaştırılması
1966	Dolowy: L-ASNaz'ın ilk klinik kullanımı
1968	Wade: <i>Erwinia carotovora</i> 'dan ( <i>chrysanthemi</i> ) L-ASNaz izolasyonu
1978	Doğal <i>E. coli</i> L-ASNaz ALL tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından onaylandı
1981	Kamisaki: PEG- <i>E. coli</i> türevli L-ASNaz'ın başlangıç gelişimi
1985	<i>Erwinia</i> L-ASNaz ALL'yi tedavi etmek için İngiltere'de kullanıldı
1993	Asselin: L-ASNaz'ın farklı farmakokinetik özelliklerin belirlenmesi
1994	ALL'nin tedavisinde kullanılmak üzere FDA tarafından PEG- <i>E. coli</i> L-ASNaz (Oncaspar) onaylandı
2006	ALL'in tedavisinde ilk basamak kullanımı için FDA tarafından PEG- <i>E. coli</i> L-ASNaz onaylandı
2008	<i>Erwinia chrysanthemi</i> -ASNaz'ı değerlendirmek için denemeler başlatıldı
2011	<i>E. coli</i> türevli L-ASNaz'ın aşırı yan etkilerinden dolayı FDA tarafından <i>Erwinia chrysanthemi</i> -ASNaz onaylandı

## 2.2. L-ASNaz'ın Yapısı

L-ASNaz enziminin yapısını moleküler düzeyde aydınlatmak için birçok bilim adamı tarafından araştırma yapılmıştır. Genellikle, L-ASNaz tetramer olarak bulunur fakat farklı kaynaklardan izole edildiğinde heksamerik, dimerik ve monomerik formları da bulunmuştur. Çoğu bakteriyel L-ASNaz kuaterner ve üçüncül yapılar sergiler [5]. Özellikle *E. coli* ve *Erwinia* sp. L-ASNaz çok iyi araştırılmıştır ve yapısal bilgileri kolayca elde edilebilir [6,7]. Hem *E. coli* hem de *Erwinia* sp. L-ASNaz benzer üç boyutlu yapıya sahiptir [8]. *E. coli*'den klinik olarak kullanılan L-ASNaz enzimi, her biri X-ışını kristalografik verisine göre 35.6 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip özdeş alt ünitelere sahip tetramerik bir proteindir [7]. Her bir alt birim için moleküler

formülü  $C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17}$ 'dir. *Erwinia carotovora* kökenli enzim, her biri dört özdeş monomerden (A'dan H'ye) oluşan iki tetramerden (ABCD ve EFGH) oluşur (Şekil 2.1). 14  $\alpha$ -iplikli, sekiz  $\beta$ -heliksli [9] ve iki alanlı, büyük bir N-terminal alanı ve küçük bir C-terminal alanı olan monomerin her birinde üç yüz yirmi yedi amino asit toplanır [8]. Aktif bölge iki bitişik monomer (A ve C: B ve D) arasında konumlandırılmıştır. Tetramer dört özdeş alt birimden oluşur. Bütün molekül dimerlerin dimeri olarak kabul edilir [10,11]. Her aktif bölge, iki bitişik monomerdeki amino asitlerin taşınmasıyla şekillendirilir. Aktif merkezde yer alan amino asitler Thr15, Tyr29, Ser62, Glu63, Thr95, Asp96, Ala120 ve Lys168'dir ve bitişik monomerde sadece bir rezidüde Ser254 bulunur [5,10,12–15]. Thr15 ve Thr95, enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu rezidülerdir.

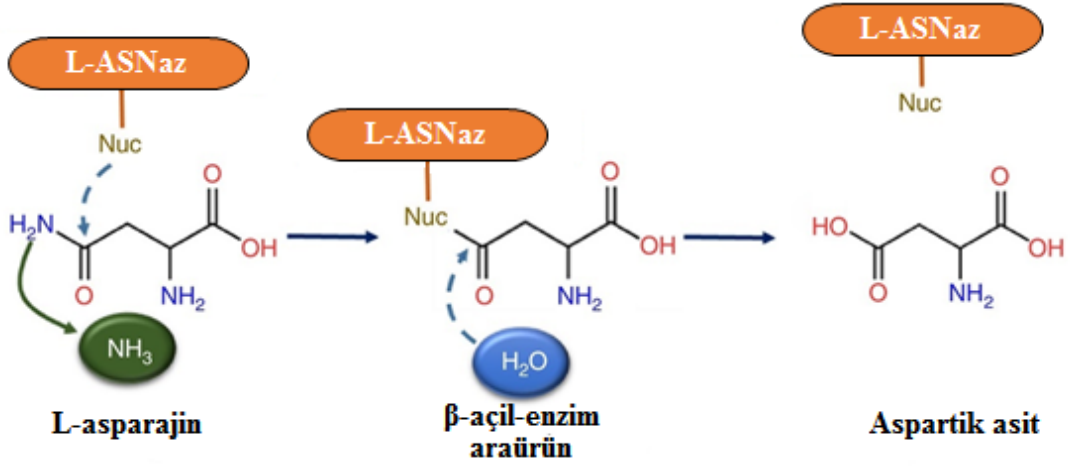


**Şekil 2.1.** *E. coli* L-ASNaz'ın sekonder yapı elemanlarını gösteren monomerinin bir şerit gösterimi [16]

### 2.3. L-ASNaz'ın Etki Mekanizması

Hidrolitik katalizleme özelliği nedeniyle, L-ASNaz ALL tedavisi için önemli bir ilaçtır. Hem normal hem de lösemik hücreler metabolik ihtiyaçlarını sağlamak için L-Asn amino asitine ihtiyaç duyarlar. Sağlıklı hücreler asparajin sentetaz enzimi yardımıyla aspartatı asparajine dönüştürürler. Neoplastik hücrelerde L-ASNaz sentetaz enzimi olmadığından L-Asn amino asitini sentezleyemezler ve dolayısıyla yaşamlarını ve reproduksiyonu sağlamak için bu amino asiti dış kaynaklardan (kan dolaşımı) almak zorundadırlar. L-ASNaz'ın tümör hücrelerine uygulanması, tüm dolaşımdaki L-Asn amino asitini yıkar, bu da kanser hücrelerinin açlıklarına yol açar ve sonuçta ölürlür. Hidroliz işlemi, bir ara ürün olan beta-açıl-enzimin oluşmasıyla iki adımda gerçekleşir (Şekil 2.2). Birinci işlem basamağında, enzimin nükleofilik kalıntısı güçlü bir baz ile aktive edilir ve L-Asn'nin (substrat) amid karbon atomuna saldırması sonucu beta-açıl-enzim ara ürünü oluşur. İkinci reaksiyon basamağı, bir su molekülü tarafından aktive edilen bir nükleofilin ester karbonuna yapılan bir saldırıdır. Bu mekanizma, aktiviteleri katalitik triadlar olarak sınıflandırılan bir amino asit grubuna bağlı olan serin-proteazların klasik mekanizmasına benzerdir. Bu katalitik triadlar, hepsi hidrojen bağları ile bağlanmış bir nükleofilik amino asit, serin (Ser), bir baz, histidin (His) ve asit karakteristiği olan bir amino asit, aspartik asit (Asp) tarafından oluşturulur [17].

L-ASNaz'ın başka katalizlediği reaksiyonlar da vardır. Örneğin, *Serratia marcescens* tarafından üretilen L-ASNaz enzimi, L-Asn hidrolizine kıyasla L-Glutamin (L-Glu)'nin %5'ini hidrolizleyebilir. Aynı etki *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemi* tarafından üretilen L-ASNazda da görülür. *Pseudomonas* sp. ve *Acinetobacter glutaminasificans* gibi diğer mikroorganizmalar eşit L-ASNaz aktivitesine sahiptirler. Bazı durumlarda, L-ASNaz L-Glu hidrolizini ancak L-Asn'nin L-Asp'ye tamamen dönüşmesinden sonra başlatır. Aslında, L-Glu L-Asn'nin yarışmalı inhibitörüdür. Her iki amino asidin yapısal benzerliğinden dolayı hidrolitik olayına benzerlik gösterir. Ayrıca, L-ASNaz  $\beta$ -aspartil peptid amid bağını da hidrolizleyebilir, ancak reaksiyon verimi oldukça düşüktür [1,18]. L-ASNaz'ın çok yönlü katalizleme özelliğinden dolayı son yirmi yılda yayınlanan klinik veriler, L-ASNaz'ın ALL tedavisi için çok önemli bir bileşeni olduğunu göstermektedir [19].



Şekil 2.2. L-ASNaz reaksiyonunun genel hidroliz mekanizması [20]

## 2.4. L-ASNaz Kaynakları

L-ASNaz insanlar hariç, hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar (bakteri, mantar, alg, maya ve aktinomisetler) dahil olmak üzere çeşitli organizmalardan izole edilebilmektedir. L-ASNaz, çeşitli hayvan ve bitki gruplarında mevcut olmasına rağmen, bakteriler, mantarlar, algler, mayalar ve aktinomisetler araştırmacılar tarafından daha çok ilgi görmektedir.

### 2.4.1. Bakteri kaynakları

L-ASNaz karasal ve deniz ortamındaki hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriyel türlerden izole edilmektedir [21]. Gram-pozitif bakteriler Gram-negatif ile karşılaştırıldığında daha az dikkate değer bulunmuştur [22]. Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerden elde edilen L-ASNaz türleri Tablo 2.2'de listelenmiştir. Gram-negatif bakterilerden elde edilen L-ASNaz iki ana tipe ayrılır: Tip I ve tip II L-ASNaz. Tip I L-ASNaz nicel olarak ifade edilir ve hem L-Glu ve L-Asn amino asitleri üzerinde enzimatik aktiviteye sahipken, tip II L-ASNaz L-Asn üzerinde yüksek spesifik aktiviteye sahiptir ve sadece anaerobik koşulda indüklenir [19]. Bakteriler içinde, en iyi L-ASNaz üreticileri *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleridir. 30 yıldan fazladır *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den üretilen Tip II L-ASNaz ALL için etkili bir tedavi için antitümör ajan olarak kullanılmaktadır [23]. *E. carotovora* bakteriyel kaynağından elde edilen L-ASNaz ise ALL tedavisi için klinik kullanımdadır [24].

**Tablo 2.2.** L-ASNaz için bakteri kaynakları

<b>Gram-negatif</b>	<b>Referans</b>	<b>Gram-pozitif</b>	<b>Referans</b>
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	[25]	<i>Bacillus circulans</i>	[26,27]
<i>Azotobacter agilis</i>	[28]	<i>B. coagulans</i>	[19]
<i>Brevibacillus brevis</i>	[29]	<i>Bacillus</i> sp.	[30]
<i>Citrobacter</i> sp.	[31]	<i>B. mesentericus</i>	[32]
<i>Escherichia coli</i>	[33]	<i>B. polymyxa</i>	[34]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	[35]	<i>B. subtilis</i>	[36]
<i>E. cloacae</i>	[37]	<i>B. licheniformis</i>	[38,39]
<i>Erwinia aroideae</i>	[19]	<i>B. circulans</i> MTCC 8574	[26]
<i>E. cartovora</i>	[40]	<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i>	[41]
<i>E. chrysanthemi</i>	[42]	<i>Mycobacterium bovis</i>	[28]
<i>Helicobacter pylori</i>	[43]	<i>M. phlei</i>	[44]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	[19]	<i>Staphylococcus</i> sp.	[45]
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	[46]	<i>S. aureus</i>	[47]
<i>Pseudomonas</i> sp.	[48]	<i>Streptococcus albus</i>	[19]
<i>P. fluorescens</i> AG	[49]		
<i>P. geniculata</i>	[19]		
<i>P. ovalis</i>	[19]		
<i>P. stutzeri</i>	[50]		
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	[51]		
<i>Serratia marcescens</i>	[19]		
<i>Thermus thermophiles</i>	[52]		
<i>T. aquaticus</i>	[53]		
<i>Vibrio succinogenes</i>	[54]		
<i>Citrobacter freundii</i>	[55]		
<i>Proteus vulgaris</i>	[56]		
<i>Zymomonas mobilis</i>	[19]		

#### 2.4.2. Fungal kaynaklar

Funguslar (mantarlar), bakterilerle birlikte başka bir potansiyel L-ASNaz kaynağıdır. Bakteriyel L-ASNaz'da olduğu gibi çeşitli yan etkiler kullanımını kısıtlamaktadır. Ancak, bakterilerle karşılaştırıldığında funguslar insanlarla daha

yakından ilişkilidir. Bu nedenle, fungal L-ASNaz'lara karşı immünolojik reaksiyon olma ihtimali daha azdır [57]. Ayrıca, fungal L-ASNaz, hücre dışı olarak üretildiği için ekstraselüler enzimi saflaştırmak çok kolaydır. Bundan dolayı, son zamanlarda L-ASNaz kaynağı olarak önem kazanmıştır ve birkaç L-ASNaz üreten fungal kaynaklar Tablo 2.3'te listelenmiştir.

**Tablo 2.3.** L-ASNaz için fungus kaynakları

<b>Fungus</b>	<b>Referans</b>
<i>Alternaria</i> sp.	[58]
<i>Aspergillus nidulans</i>	[19]
<i>A. niger</i>	[59]
<i>A. oryzae</i>	[60]
<i>A. tamarii</i>	[61]
<i>A. terreus</i>	[62]
<i>Cylindrocapsa obtusisporum</i>	[63]
<i>Mucor</i> sp.	[64]
<i>Fusarium roseum</i>	[65]

#### 2.4.3. Maya kaynakları

Mayalardan elde edilen L-ASNaz'ın daha az zararlı olduğu bildirilmiştir. *Saccharomyces* sp., *Candida* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Hansenula* sp. ve *Spobolomyces* sp. gibi mayalardan elde edilen L-ASNaz enzimi antitümör aktivitesi sergilemektedir [66]. Bunların dışındaki, L-ASNaz üreten mayalar Tablo 2.4'de listelenmiştir.

**Tablo 2.4.** L-ASNaz için maya kaynakları

<b>Maya</b>	<b>Referans</b>
<i>Candida utilis</i>	[67]
<i>C. guilliermondii</i>	[19]
<i>C. bombicola</i>	[68]
<i>Pichia polymorpha</i>	[69]
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	[70]
<i>Rhodotorula</i> sp.	[68]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[71]

#### 2.4.4. Aktinomiset kaynakları

L-ASNaz üretimi için kaynak olarak aktinomisetler kullanılmaktadır [19]. Aktinomisetler toprak, su ve doğada dünya çapında bolca bulunur, ancak özellikle balıklarda yaşayan türlerinden elde edilen enzimin yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [72]. Dahası, aktinomisetler bakteriler ve mantarlarla karşılaştırıldığında daha iyi bir L-ASNaz kaynağıdır [73]. Tablo 2.5 L-ASNaz üreten aktinomisetleri göstermektedir.

**Tablo 2.5.** L-ASNaz için aktinomiset kaynakları

<b>Aktinomiset</b>	<b>Referans</b>
<i>Actinomyces</i> sp.	[24]
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	[74]
<i>S. aurantiacus</i>	[74]
<i>S. collinus</i>	[75]
<i>S. griseus</i>	[76]
<i>S. gulbargensis</i>	[77]
<i>S. karnatakensis</i>	[78]
<i>S. longsporusflavus</i>	[79]
<i>S. tendae</i>	[80]
<i>S. venezuelae</i>	[81]
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	[82]
<i>Nocardia</i> sp.	[83]

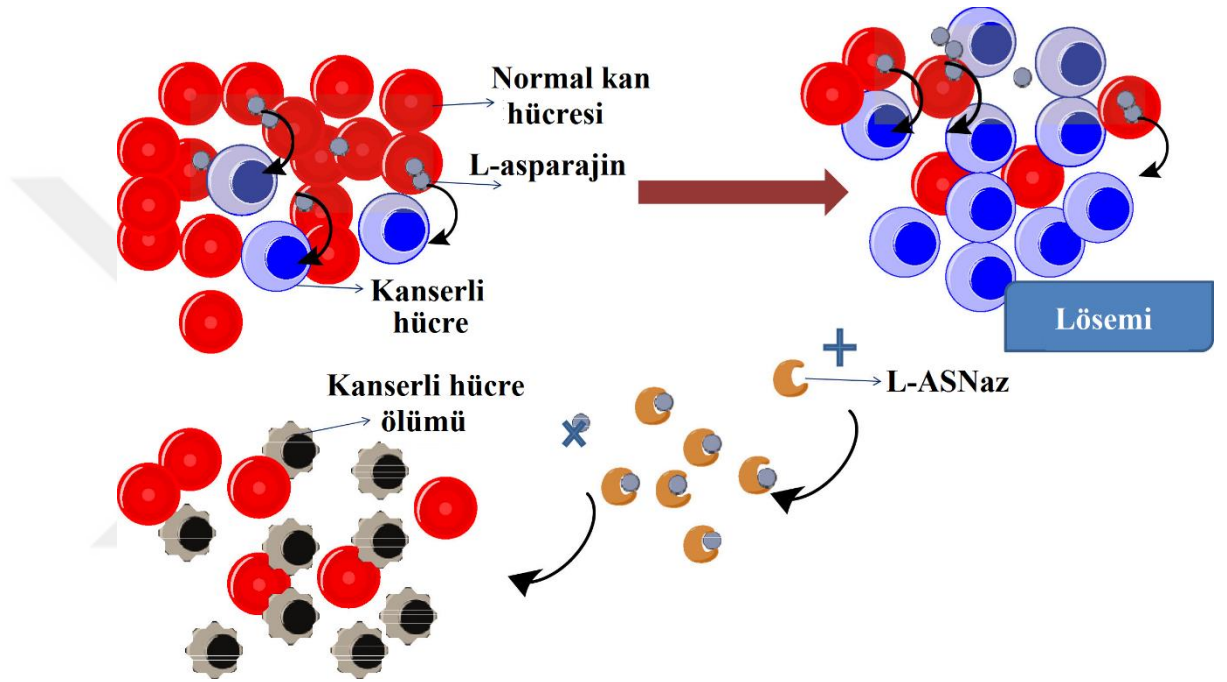
#### 2.4.5. Algal kaynaklar

Son zamanlarda *Chlamydomonas* sp. ve sarı yeşil bir alg olan *Vaucheria uncinata* tip alglerden de L-ASNaz üretimi üzerinde çalışmalar vardır [19].

### 2.5. L-ASNaz'ın İlaç Uygulaması

L-ASNaz, vinkristin ve bir glukokortikoid ile (örneğin deksametazon) kombinasyon halinde ALL hastalığını tedavi etmek için kullanılmaktadır [84]. Antilösemik özelliklerinden dolayı L-ASNaz terapötik olarak önemli bir antitümör ilaç olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, ALL hastalığının yanı sıra Hodgkin hastalığı, akut miyelositik lösemi, akut myelomonositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, lenfosarkom gibi bazı malignitelerin tedavisinde de kullanılmaktadır [3]. L-Asn,

protein sentezi ve hücre büyümesinde tümör hücresi için esansiyel bir amino asittir; L-ASNaz ise L-Asn'yi L-Asp'ye katalizler. Bu nedenle, L-ASNaz varlığında, malign hücreler, asparajin tükenmesiyle sonuçlanan önemli bir büyüme faktöründen yoksun kalır ve sonuçta tümör hücreleri ölür (Şekil 2.3) [85]. L-ASNaz hayvanlarda, bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda bulunur, ancak sadece *E. coli* ve *E. chrysanthemi*'den saflaştırılan L-ASNaz'ın ALL tedavisinde kemoterapinin bir parçası olarak kullanılması onaylanmıştır [19].



**Şekil 2.3.** Kanserli hücrelerde L-ASNaz'ın kemoterapötik etkisinin şematik gösterimi [86]

## 2.6. Enzim İlaç Olarak L-ASNaz'ın Yan Etkileri

L-ASNaz, potansiyel antilösemik aktivitesine rağmen, bazı yan etkileri de mevcuttur [19]. L-ASNaz kullanımı sonrası ödem, deri döküntüleri, ateş, karaciğer fonksiyon bozukluğu, diyabet, lökopeni, pankreatit, nörolojik nöbetler ve hemoraji gibi bir çok semptom görülebilir [87,88]. Moola vd. L-ASNaz bazlı ilaçların kullanıldığında bazı hipersensitif reaksiyonlarının, hafif alerjik reaksiyonların ve anafilaktik şokun görüldüğünü rapor etmişlerdir [42]. Pochedly ise ergenlerin, depresyon, yorgunluk, uyuşukluk, baş dönmesi ve ajitasyon ile sonuçlanan L-ASNaz'ın neden olduğu nörotoksisite risklerinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir

[89]. L-ASNaz toksisitesinin, glutaminaz etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir [90].

### **2.6.1. Aşırı duyarlılık (Hipersensitivite)**

Bakteriyel proteinler, enjeksiyon bölgesinde ürtiker, solunum sıkıntısı ve akut yaşamı tehdit eden anaflaksiye lokalize, geçici eritem ve döküntüye yol açan immünolojik reaksiyonları indükler. Bu hipersensitif yan etkiler; alerjik reaksiyonlar, anaflaksi (nadir), serum hastalığı, ekstremitelerin kaşıntı ve şişmesi, ödem, ürtiker, döküntü ve bronkospazm, lokalize veya genelleştirilmiş eritem ve diğer klinik olarak ilişkili reaksiyonlar olabilir. Ayrıca, L-ASNaz tedavisi organ toksisiteleri, karaciğer fonksiyon bozukluğu, pankreatit ve ilgili hiperglisemi, ketoasidoz, glukozüri, serebral disfonksiyon, azalmış protein sentezi, hipofibrinonemi, hiper pıhtılaşabilir durum-koagülopati, hipoalbuminemiye yol açabilir [91]. *E. coli* L-ASNaz tedavisi sırasında hastaların yaklaşık %60'ında hipersensitif reaksiyonlar gözlemlenmiştir. *E. Coli*'den türetilmiş polietilen glikol (PEG)-ASNaz bile, hipersensitif reaksiyonlara neden olduğu rapor edilmiştir [92]. Bu nedenle başka bir L-ASNaz formuna gerek vardır.

### **2.6.2. Koagülasyon bozukluğu**

L-ASNaz tedavisi ayrıca serin proteaz enzim eksikliğinden dolayı anormalliklerle ilişkili çeşitli koagülasyonlara yol açabilir. Bu proteinler antitrombin ve  $\alpha 1$  antitripsin içerir. Bu tür komplikasyonların görülme oranı serbest L-ASNaz için %2.1-15 iken, PEG-ASNaz için %1.1-4 olarak rapor edilmiştir [93,94]. Araştırmacılar, L-ASNaz tarafından indüklenen antitrombin molekülündeki konformasyonel değişikliklerin, enzimde aktivite kaybına ve endoplazmik retikulum sarnıçlarında protein agregatlarının oluşumuna yol açabileceğini belirlemişlerdir [95]. Ayrıca, L-ASNaz tedavisi trombin düzeyini, kanama ve tromboz riskini arttırdığı için protein C ve S eksikliğine yol açabilir [96,97]. Genel olarak, hastaların %15-65'inde L-ASNaz tedavisi sonrası hipofibrinojenemi görülmektedir.

### **2.6.3. Pankreatit, Hiperglisemi, Hepatotoksisite**

Her ne kadar L-ASNaz enzim ilacının olumsuz yan etkilerinin arkasındaki sebep iyi tanımlanmamış olsa da protein sentezindeki bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. L-ASNaz tedavisinin karaciğer toksisitesi, oksidatif stres, glutamin eksikliği, hepatik protein sentezinin azalması ve mitokondride beta-oksidasyon bozukluğunu gibi yan etkileri rapor edilmiştir [98–100]. Ayrıca, L-ASNaz tedavisi

pankreatik amilaz ve lipaz düzeyini de arttırabilir. Bu enzimlerin sentez inhibisyonu, L-Asn tarafından düzenlenir. L-Asn'nin eksikliğinde, bu enzimler pankreasta ciddi komplikasyonlar oluşturur [101,102]. L-ASNaz tedavisinin, bazı hastalarda hem endokrin (insülin salgılayan) hem de pankreasın ekzokrin (sindirim enzimi salgılayan) hücrelerini etkileyerek azalan insülin sentezine bağlı olarak diyabeti indükleyebildiği bildirilmiştir [1].

Yukarıda anlatılan dezavantajların üstesinden gelmek için enzim immobilizasyonu en çok kullanılan stratejilerden biridir. Enzim immobilizasyonu, enzimin hareketliliğinin azalması veya kaybıyla sonuçlanan farklı katı taşıyıcı matrislere doğal enzimlerin eklenmesi olarak kabul edilebilir. L-ASNaz'ın immobilize edilmiş versiyonları geliştirilmiştir. İmmobilizasyon sayesinde, immobilize L-ASNaz, serbest enzimle karşılaştırıldığında, yarı ömrü artar ve alerjik reaksiyonlara karşı daha yüksek stabilite göstermektedir. Şimdiye kadar, L-ASNaz doğal, sentetik ve hibrit birçok taşıyıcı matrislere çeşitli kimyasal/fiziksel yöntemler kullanılarak immobilize edilmiştir.

## 2.7. Ticari L-ASNaz Formülasyonları

ABD'de, ALL tedavisi için üç L-ASNaz formülasyonu yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.6). Bunlar; doğal *E. coli* ASNase (Elspar®; Merck & Co., Inc., West Point, PA, ABD), bunun Pegile edilmiş formu Oncaspar® (Enzon, Inc. Bridgewater, NJ, ABD) ve *Erwinia chrysanthemi* (Ipsen-Speywood Pharmaceuticals Ltd, UK) kültürlerinden elde edilen ürün Erwinase®'dir [1].

**Tablo 2.6.** Yaygın olarak kullanılan üç L-ASNaz formülasyonu [1]

Formülasyon	Yarı-ömür	Doz
<i>E. coli</i> L-ASNaz	26-30 saat	6000 IU/m <sup>2</sup> 3 kez/hafta
<i>Erwinia</i> L-ASNaz	16 saat	6000 IU/m <sup>2</sup> günlük×10 doz, daha sonra haftalık olarak 3 doz veya indüksiyonda günlük 30000 IU/m <sup>2</sup> günlük doz
PEG-ASNaz	5.5-7 gün	2000–2500 IU/m <sup>2</sup> her 2 veya 4 haftada bir

İkinci formülasyon, eski iki forma aşırı duyarlılığı olan hastalarda ikinci sıra tedavi olarak İngiltere'de onaylanmıştır. Bu doğal L-ASNaz formülasyonları farklı marka isimleri altında sunulmaktadır; Avrupa ve Asya'da Medac® (Kyowa Hako,

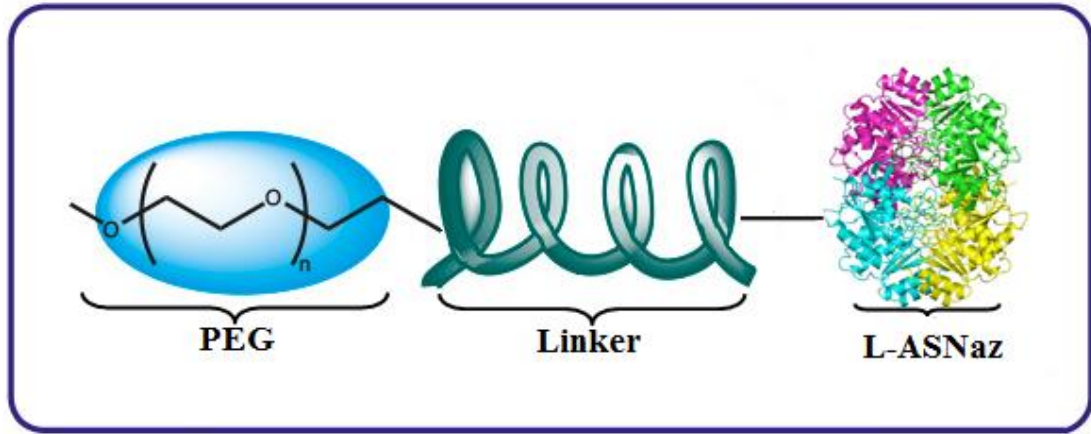
Kogyo, Japonya), Crasnitin® (Bayer AG, Leverkusen, Almanya), Leunase® (Sanofi-Aventis, Paris, Fransa) Paronal® ve Kidrolase® vb. Ancak bunların bazıları artık mevcut değildir ve sadece literatürde yer almaktadır [1,92] (Tablo 2.7).

**Tablo 2.7.** Farklı ülkelerde tedavide kullanılan ticari L-ASNaz formülasyonları

Bölge	İlk aşama	İkinci aşama
Kuzey Amerika, İngiltere	<i>E. coli</i> -ASNaz veya	<i>Erwinia</i> L-ASNaz veya
Avustralya, Yeni Zelanda	PEG-ASNaz	PEG-ASNaz
Avrupa	<i>E. coli</i> -ASNaz veya PEG-ASNaz	<i>Erwinia</i> L-ASNaz
Diğer ülkeler	<i>E. coli</i> -ASNaz	<i>Erwinia</i> L-ASNaz veya PEG-ASNaz

Günümüzde, plazma yarı ömrünü arttırmak ve birçok terapötik ajanın immünojenisitesini ve antijenliğini azaltmak için en uygun yaklaşım, bu ajanların polietilen-glikol (PEG) ile kovalent bağlanmasıdır. Bu işlem PEGilasyon olarak bilinir (Şekil 2.4) [103]. PEG-asparaginaz, *E. coli*'den izole edilmiş L-ASNaz'ın monometoksi polietilen glikol (mPEG) ile kovalent konjügasyonu ile oluşturulan modifiye edilmiş formu olup doğal *E. coli* formülasyonları ile karşılaştırıldığında önemli farmakokinetik varyasyonlara yol açmıştır [104]. Proteinlerin ve enzimlerin PEGilasyonu, yüzey alanının kaplanmasıyla sonuçlanır, böylece moleküler büyüklüğünü artırır ve sterik engellemeyi artırır [1]. PEG-ASNaz, doğal *E. coli* L-ASNaz ile benzer kimyasal özelliklere sahiptir (optimum sıcaklık:50 °C, optimum pH:7.0, izoelektrik nokta:5.0) [105]. Dünya ülkelerinin çoğunda mevcut olan PEG-ASNaz formülasyonu, *E. coli*'den türetilmiş olan Oncaspar®'dir [18]. PEG-ASNaz ürünleri içinde farklı ülkelerden küçük farklılıklar bulunabilir. Merck, Sharp ve Dohme'den elde edilen *E. coli* L-ASNaz'dan elde edilen PEG-ASNaz, ABD'de Sigma-Tau tarafından üretilmekte ve Avrupa'daki Kyowa Hakko doğal ASNaz proteinden türetilirken, Oncaspar® olarak pazarlanmaktadır [106].

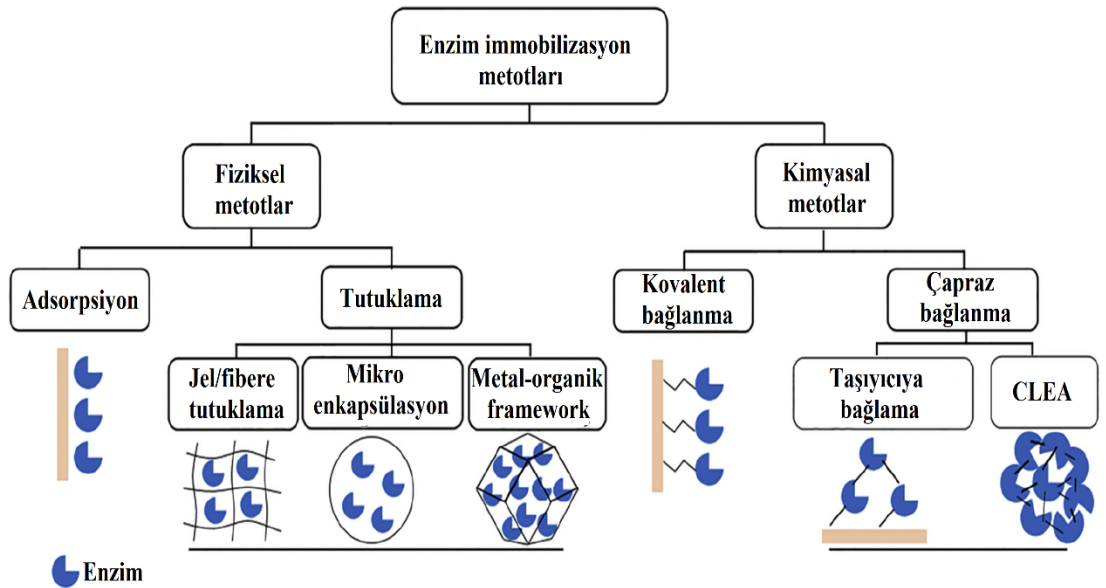
PEG-ASNaz'ın eliminasyon yarı ömrü, *E. coli* formülasyonlarından beş kat ve *Erwinia*'ninkinden dokuz kat daha uzundur. Bu, hastalarda terapötik etkinliğe ulaşmak için gerekli olan enjeksiyon sayısının azaltılması anlamına gelir ve tedavide önemli bir gelişmedir [107].



Şekil 2.4. L-ASNaz'ın pegilasyon işleminin gösterimi [103]

## 2.8. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler ve destek taşıyıcıları arasındaki etkileşim modlarına göre, enzim-immobilizasyon yöntemleri fiziksel ve kimyasal yöntemlere ayrılmaktadır (Şekil 2.5). Adsorpsiyon ve yakalama, enzim ve destek taşıyıcıları arasında kovalent etkileşimlerin olmadığı fiziksel yöntemlere atanabilirken, kovalent bağlanma ve çapraz bağlama kimyasal yöntemlere aittir. Bazı durumlarda, enzimlerin immobilizasyonu için çoklu enzim-destek etkileşimleri kullanılır.



Şekil 2.5. Enzim immobilizasyon metotları [108]

### 2.8.1. Fiziksel metotlar

Adsorpsiyon enzim immobilizasyonu için basit ve kullanışlı bir yöntemdir. Bu immobilizasyon metodunda, yaygın olarak kullanılan taşıyıcılar katyon ve anyon değiştirici reçineler, aktif kömür, silika jel, alümina, gözenekli cam ve seramiklerdir. H-bağları, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler veya hidrofobik etkileşimlerle, enzimler destek taşıyıcıların yüzeylerine tutunur veya mezogözenekli malzemelerin gözeneklerinde hareketsiz hale getirilir [108]. Enzimlerin destek taşıyıcıları üzerine adsorpsiyonu, belirli bir inkübasyon süresi içinde karıştırılarak gerçekleştirilir. İmmobilize olmayan enzim molekülleri daha sonra tampon ile yıkayarak yüzeyden uzaklaştırılır. Bu yöntemde, enzim immobilizasyonu için ilave bağlama ajanları ve modifikasyon aşamaları gerekli değildir. Aynı zamanda, destek taşıyıcılar enzimin uzaklaştırılmasıyla yeniden kullanılabilir. Bundan dolayı düşük maliyetlidir ve uygulanması kolaydır. Ayrıca, immobilizasyon koşulları hafif olduğundan dolayı enzimler başlangıçtaki katalitik aktivitelerini korurlar. Ancak, fiziksel adsorpsiyonda, enzimler ve immobilizasyon destek taşıyıcıları arasındaki etkileşimler zayıf ve geri dönüşümlüdür. Bağlanma kuvvetleri, pH, sıcaklık ve iyonik mukavemet değişikliklerine duyarlıdır, bu da immobilize enzimlerin kararlılıklarını zayıf olmasına neden olur. Özellikle, adsorbe edilen enzime dayanan biyosensör uygulamalarında, enzimin sızması (liç olması), kontaminasyona ve sinyal girişimine neden olabilir. Fiziksel adsorpsiyon, elektrostatik bağlanma ve hidrofobik adsorpsiyonu olmak üzere çeşitlenir ancak, bunlar arasında en yaygın olanı fiziksel adsorpsiyondur [109].

Fiziksel adsorpsiyon stratejisi, enzimatik biyosensörler geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fiziksel adsorpsiyon, taşıyıcı matriksin bir enzim solüsyonuna daldırılmasını ve fiziksel adsorpsiyonun gerçekleşmesini sağlamak için belirli bir süre boyunca inkübe edilmesini gerektirir. Enzimler, hidrojen bağı, Van der Waals kuvvetleri veya hidrofobik etkileşimler gibi zayıf spesifik olmayan kuvvetler aracılığıyla taşıyıcı matriksine immobilize edilir. Ancak, bu nispeten zayıf nonspesifik kuvvetlerin etkileşim kuvvetini (örneğin, pH, iyonik güç, sıcaklık veya çözücünün polaritesi) etkileyen koşullar değiştirilirse taşıyıcı matriksinden enzim sızmasına yol açabilir. Genel olarak, bu yöntemin basitlik, yüzey yenileme ve maliyet tasarrufu gibi avantajları vardır ancak zaman ve reaktif tüketir. Ayrıca, enzim taşıyıcı matriksine homojen bir şekilde immobilize edilemediğinden substratın enzimin aktif bölgelerine ulaşımını engellenebilir [109].

Enzim immobilizasyonunda elektrostatik kuvvetleri kullanmak için, reaksiyon çözeltisinin pH'ı ve enzimin izoelektrik noktası iki temel parametredir. Enzim moleküllerinin yüzeyi, enzimin izoelektrik noktası ile çözeltinin pH değeri arasındaki karşılaştırmalı farka bağlı olarak pozitif veya negatif yük taşıyabilir, böylece enzim iyonik ve kuvvetli polar etkileşimler vasıtasıyla zıt yüklü taşıyıcı matrikse immobilize edilebilir. Elektrostatik bağlanma immobilizasyonunda katman-katman biriktirme (layer by layer (LBL)) ve elektrokimyasal doping iki önemli tekniktir [109].

Diğer bir adsorpsiyon immobilizasyon yaklaşımı, destek ve enzim molekülleri arasında hidrofobik etkileşimlerin kullanılmasıdır. Bu hidrofobik etkileşimler entropi kazanımının bir sonucu olarak immobilizasyon sırasında taşıyıcı matriks ve enzim moleküllerinden çıkan su moleküllerinin yer değiştirmesiyle oluşur [110]. Etkileşim kuvveti hem adsorban ve hem de enzimin hidrofobikliğine bağlıdır. Enzim immobilizasyonu veya hidrofobik ligand molekülünün boyutu sırasında pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu gibi deneysel parametreler enzim ve destek arasındaki hidrofobik etkileşimleri düzenlemek için ayarlanabilir [111]. Heksil-agaroz taşıyıcı matrikslerine hidrofobik adsorpsiyon ile tersinir immobilizasyonun başarılı bir örneği  $\beta$ -amilaz ve amiloglukozidaz için rapor edilmiştir [109,112].

### **2.8.2. Tutuklama (Entrapment)**

Tutuklama immobilizasyonunda, enzim doğrudan taşıyıcı matriks yüzeyine bağlı değildir. Enzim, ancak sadece substrat ve ürünlerin çıkmasına izin veren, fakat enzimi tutan ve enzim difüzyonunu kısıtlayan bir polimerik ağ içinde hapsedilir. Tutuklama immobilizasyon işlemi iki aşamada gerçekleştirilir: Öncelikle, enzim bir monomer solüsyonuna karıştırılır, ardından monomer çözeltisi bir kimyasal reaksiyonla polimerize edilir. Enzim, bir polimer kafes ağı içinde fiziksel olarak sınırlı olduğundan, polimer ile kimyasal olarak etkileşmez. Bu yöntem, enzim stabilitesini artırır ve enzimin sızma ve denatürasyonunu en aza indirebilir. Yöntemin bir başka avantajı, kapsülleyici malzemenin optimal pH, polarite veya amplitite sahip olacak şekilde modifiye edilmesiyle enzim için mikro-çevreyi optimize etme özelliğidir. Ancak, yöntemin önemli bir dezavantajı, polimerizasyon zincirinin aşırı uzaması sonucu meydana gelen kütle aktarım direncidir. Bu direnç substratın enzim aktif bölgesine tamamen ulaşmasını engeller. Ayrıca, tutulan enzimlerin, taşıyıcı matriksinin gözenek boyutu çok büyük olması durumunda sızıntıya maruz kalması

muhtemeldir. Bu yöntemde immobilizasyon verimi düşüktür ve taşıyıcı matriks polimerizasyonun etkileri sonucu bozulabilir. Elektropolimerizasyon, fotopolimerizasyon, kafes veya fiber tipi için sol-jel işlemi ve mikrokapsül tipi mikrokapsülleme gibi türüne bağlı olarak tutuklama immobilizasyonunda kullanılan çeşitli prosedürler vardır [109].

### 2.8.3. Kovalent bağ

Enzim moleküllerinin fonksiyonel grupları ile taşıyıcı matriksi arasındaki kovalent bağlanmalarla oluşan enzim immobilizasyonu en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Kovalent bağlanmada kullanılabilen enzimin fonksiyonel grupları amino grubu, karboksilik grup, fenolik grup, sülfidril grubu, tiyol grubu, imidazol grubu, indol grubu ve hidroksil grubudur. Enzimin taşıyıcı desteğe bağlanma prosedüründe öncelikle glutaraldehit veya karbodiimid gibi bağlayıcı moleküller ile yüzeyin aktivasyonu sağlanır daha sonra aktifleştirilmiş taşıyıcı matriksine enzim kovalent olarak immobilize edilir. Bağlayıcı moleküller, kovalent bağlanma yoluyla taşıyıcı matriks ve enzim arasında köprü görevi gören çok fonksiyonlu reaktifler (glutaraldehid veya karbodiimid) olmalıdır. Farklı yüzeyler (inorganik malzeme, doğal veya sentetik polimer, membranlar) ve immobilizasyon yöntemleri için disikloheksilkarbodiimit, diazotizasyon, siyanojen bromür gibi farklı bağlayıcılar kullanılmaktadır [108,109]. Karbodiimid ( $RN=C=NR$ ), taşıyıcı matrikslerin karboksil grupları ( $-COOH$ ) ile bir enzimin amino grupları ( $-NH_2$ ) arasında bağlanmayı sağlayan fonksiyonel bir gruptur. Immobilizasyon verimliliğini arttırmak için, *N*-hidroksisüksinimit enzimin kovalent bağlanma aşamasından önce karbodiimit ile türevlendirilebilir. Amin fonksiyonelleştirilmiş taşıyıcı matriks ve karboksil fonksiyonelleştirilmiş enzim arasındaki bağlanma, aynı zamanda karbodiimidlerle de yapılabilir. Alternatif olarak, glutaraldehit enzim immobilizasyonu için aktive edici ajan olarak kullanılabilir. İlk olarak, amin fonksiyonelleştirilmiş taşıyıcı matriks ve glutaraldehitin aldehit grubu arasında Schiff-baz reaksiyonu oluşur ve daha sonra glutaraldehitin ikinci aldehit grubu, amin fonksiyonelleştirilmiş enzime kovalent olarak bağlanır. Bu immobilizasyon yönteminin prensibi tiyol grubu ( $-SH$ ) ve altın substratlar (Au) arasında güçlü bir afiniteye ve yarı kovalent bağa dayanmaktadır. Çift-katalitik bölge sistein rezidüleri içeren oksidoredüktazlar ve izomerazlar gibi tiyol içeren enzimler, amino asit rezidülerinde bulunan tiyol grupları aracılığıyla altın yüzeyinde immobilize edilebilir. Bu tiyol içeren enzimler ya doğal formdadır ya da

reaktif tiyol gruplarını sağlamak için kimyasal olarak modifikasyon ya da genetik mühendisliği teknikleri ile elde edilir. Alternatif olarak, tiyol içeren enzimler disülfür bağları (S-S) yaparak tiyol fonksiyonel taşıyıcı matriksler üzerine immobilize edilebilir [109].

#### **2.8.4. Çapraz bağlama**

Çapraz bağlama ile immobilizasyon, kovalent bağlarla enzim moleküllerini moleküller arası çapraz bağların oluşumuyla gerçekleştirilen geri dönüşümsüz bir yöntemdir. İşlem, enzim moleküllerini üç boyutlu çapraz bağlı agregatlara bağlamak için bağlayıcılar olarak işlev gören bir reaktifin yardımıyla gerçekleştirilir. Enzim, reaksiyon karışımında bulunur ve herhangi bir taşıyıcı matrikse immobilize edilmemiştir. Çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit kullanılır. Çapraz bağlanma ile immobilizasyon, enzim biyomoleküllerinin güçlü kimyasal bağlanmasına dayanan ve böylece enzim sızıntısının minimum olduğu basit bir yöntemdir. Yöntemin bir başka avantajı, stabiliteyi arttırmaya yardımcı olan yüzey tamamlayıcılığı yoluyla uygun stabilizasyon ajanları kullanılarak enzim için mikro çevrenin ayarlanmasıdır. Bununla birlikte, glutaraldehit kullanımı ciddi enzim modifikasyonları ile sonuçlanabilir ve muhtemelen enzim konformasyonel değişikliklerine ve aktivite kaybına yol açabilir. Bu nedenle enzimlerin bu zorlu modifikasyonunu en aza indirmek için immobilizasyon işlemi sırasında jelatin, sığır serum albümini gibi inert proteinler eklenebilir [109].

### **2.9. Enzim İmmobilizasyon İçin Kullanılan Taşıyıcı Matriksler**

Taşıyıcı veya destek matriksleri adı verilen enzimlerin immobilizasyonu için kullanılan malzemeler enzim immobilizasyon başarısını ve sonucunu belirlemede çok önemlidir. İdeal bir taşıyıcı matriks aşağıdaki özellikleri içermelidir.

- Düşük maliyetli ve çevre dostu olmalıdır.
- Hareketsiz hale getirildikten sonra tamamen inert olmalı ve katalitik reaksiyonu engellememelidir.
- İmmobilize enzimin çeşitli çalışma koşullarında kullanılmasını sağlayan termal ve mekanik dirence sahip olmalıdır.
- Kararlı olmalıdır.
- İmmobilize enzimin yüksek oranda yeniden kullanılabilirliğe sahip olmasını sağlamalıdır.

- Enzim özgüllüğünü arttırmalıdır.
- Çok miktarda enzimin immobilizasyonuna izin vermelidir. Burada, gözeneklilik önemli bir rol oynar. Büyük gözenek boyutu, yüzey alanında kayda değer bir düşüşe neden olurken, küçük gözenek boyutu proteinin geçişine izin vermeyecektir. Bundan dolayı, gözenek çapı uygun aralıkta olmalıdır [113–115].
- İstenmeyen protein adsorpsiyonunu ve denatürasyonunu önlemek için, taşıyıcı matriksi yüzeyinin hidrofobikliği en aza indirilmelidir [113,116]. Bu nedenle, immobilize enzim katalitik özelliklerini arttırmak için, destek matriksi gerekli optimum ortama sahip olmalıdır [117].
- Taşıyıcı matriks, enzimin optimum pH değerini istenen değere kaydırılabilmelidir.
- Antimikrobiyal ve spesifik olmayan adsorpsiyon özelliklerine sahip olmalıdır.
- Taşıyıcı matrikslerinin çoğu, yukarıda belirtilen özelliklerin birkaçına sahiptir.

Bu nedenle, uygun taşıyıcı matriks malzemelerini seçerken dikkatlerini ve özelliklerini akılda tutarak dikkatli olunmalıdır [116].

İmmobilize enzimlerin pratik uygulamaları için araştırmalar artmaya devam etmektedir. Bu nedenle, istenilen özelliklere sahip yeni malzemelerin keşfi ve kullanımı son zamanlarda son derece önemli hale gelmiştir. Hem organik hem de inorganik kaynaklı malzemeler, olağanüstü termal ve kimyasal kararlılık ve çok iyi mekanik özellikler sergilemektedir. Dahası, bu destek materyalleri, genellikle nano ölçekte, kontrol edilebilir partikül boyutlarına sahip çeşitli morfolojik şekillerde üretilebilir, bu da bunları enzimlerle kullanım için uygun hale getirir. Bu materyaller, enzimlerin bağlanması ve yüzey modifikasyonunu arttıran çeşitli fonksiyonel gruplara sahiptir. Özellikle son on yılda, birçok avantajlı özelliği içeren hibrit ve kompozit materyallere olan bilimsel dikkat artmıştır. Bundan dolayı son zamanlarda enzim immobilizasyonunda kullanılan yeni materyaller aşağıda anlatılmıştır.

### **2.9.1. Manyetik nanopartiküller**

Katalitik işlemde sonra reaksiyon karışımından enzimlerin ayrılması, en önemli problemlerden biridir. Bu sorun, enzim moleküllerinin manyetik demir oksit nanopartiküllerine (MNP) bağlanması ve bir dış manyetik alanın kullanılmasıyla çözülmektedir. MNP'ler aynı zamanda geniş yüzey alanı ve yüzeylerinde hidroksil gruplarının bolluğu ile tanınmakta olup, bunların modifikasyonu kolaydır ve enzimin

güçlü (kovalent) bağlanmasını mümkün kılmaktadır. Bununla birlikte, sterik engelleri en aza indiren yüksek mekanik stabilite ve düşük gözeneklilik, kararlı bir enzim-matriks biyokatalitik sistemin oluşturulması için de önemlidir [118]. Netto vd. oksidoredüktazlar, hidrolazlar veya transferazlar gibi birçok enzimin, yüksek oranda tekrar kullanılabilirlik ve reaksiyon karışımından kolay ayrılma gibi avantajlar sunan MNP'lere immobilize edildiğini rapor etmişlerdir [119]. Mehrasbi vd. 3-glisidoksipropiltrimetoksisilan ile fonksiyonel hale getirilmiş manyetik nanopartiküllere lipaz enzimini immobilize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, immobilize enzim, altı reaksiyon döngüsünden sonra bile ilk aktivitesinin %100'ünü korumuştur [120]. Başka bir çalışmada, Aber vd. modifiye edilmemiş MNP'lere adsorpsiyon yöntemi ile glukoz oksidaz immobilize etmişlerdir. 15 katalitik döngüden sonra immobilize glukoz oksidaz başlangıçtaki aktivitesinin %90'ından fazlasını korumuştur [121]. Atacan vd. tripsin kovalent immobilizasyonu için, gallik asit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartikülleri kullanmışlardır. Elde edilen sonuçlar, immobilize tripsinin, sığır serumu albümini yüksek verimlilik ile katalizlediğini göstermiştir [122].

### 2.9.2. Mezogözenekli malzemeler

Enzim immobilizasyonu için kullanılan diğer materyallerden mezogözenekli destekleri ayıran bir özellik, sentez koşullarını ayarlayarak ve istenen gözenek yapısıyla taşıyıcı matriksleri elde ederek desteğin özelliklerini biyomoleküllere uyarlama olanağıdır [123,124]. Bu tip taşıyıcıların çapları genellikle 2 ile 50 nm arasında değişir, 1500 m<sup>2</sup>/g kadar yüksek yüzey alanları ve 1.5 cm<sup>3</sup>/g'luk gözenek hacimlerine sahiplerdir [113]. Enzimler mezogözenekli materyallere kovalent bağlanma veya kapsülleme ile immobilize edilebilirler. Bununla birlikte, her iki immobilizasyon tekniğinde, enzim desteğin gözeneklerine yerleştirilir, bu da proteinin yapısının ve katalitik özelliklerin korunması anlamına gelir. Ancak, enzim taşıyıcının gözeneklerinde olduğundan, substrat ve ürünlerin taşınması kısıtlanır ve buda yayılma problemlerine neden olur [125]. Buna rağmen mezogözenekli malzemeler suda çözünmezler, termal ve kimyasal kararlılığa sahiptirler ve enzimlerin bağlanması için fonksiyonel grupların varlığı, mezogözenekli materyalleri, enzim immobilizasyonu için vazgeçilmez yapmaktadır [126].

Mezogözenekli grupta zeolitler, karbonlar ve sol-jel matriksleri gibi materyallerin yanı sıra çökelmiş ve sıralı mezogözenekli oksitler bulunur. *Candida*

*antarctica* ve *Candida rugosa*'dan elde edilen lipazlar, SBA-15 ve MCM-41 mezogözenekli silikaya herhangi bir ara madde olmaksızın spesifik olmayan etkileşimlerle immobilize edilmiş ve organik sentezde katalizörler olarak kullanılmıştır. Böylelikle, immobilize enzimlerin yeniden kullanılabilirliği önemli ölçüde iyileşmiştir [127]. Başka bir çalışmada, SBA-15 ve MCM-41 silisleri de alkali proteazın adsorpsiyon immobilizasyonu için kullanılmıştır [128]. İmmobilize enzimler iyi pH ve sıcaklık kararlılığı göstermişlerdir. Wang ve Caruso, katalaz, proteaz ve peroksidazın immobilizasyonu için mezogözenekli silika küreleri kullanmışlar ve immobilizasyondan sonra test edilen tüm enzimlerin ömürlerinin serbest formlarına göre daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir [129].

### **2.9.3. Nanopartiküller**

İnorganik ve organik kökenli nanopartiküller son yıllarda, enzim immobilizasyonu için taşıyıcı matriks olarak kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Nanopartikülle geniş bir yüzey alanına sahip olduklarından dolayı, enzimin daha fazla yüklenmesine yol açar ve immobilizasyon verimini artırır. Ancak, nanopartiküllerin diğerlerine göre en büyük avantajı enzimin difüzyon sınırlarını en aza indirmesidir. Altın nanopartikülleri [130] ve grafen [131] gibi çeşitli inorganik nanomateryaller enzim immobilizasyonu için taşıyıcı matriks olarak kullanılmaktadır. Örneğin, Hou vd. karbonik anhidraz enziminin immobilizasyonu için titanyum nanopartiküllerini kullanmışlardır [132]. Başka bir çalışmada ise, *Rhizomucor miehei* lipaz çeşitli fonksiyonel gruplarla modifiye edilen silika nanopartiküllerine kovalent olarak immobilize edilmiştir [133].

### **2.9.4. Seramik malzemeler**

Seramik malzemeler, sıcaklık, basınç ve kimyasallara (organik çözücüler, bazlar, asitler) karşı son derece yüksek dirençlerinden dolayı immobilize enzimlerin endüstriyel uygulamaları için taşıyıcı matriks olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Seramik malzemeler ayrıca iyi mekanik kararlılığa sahiptirler. Bu nedenle, enzimler katalitik olarak inaktif hale geldiklerinde, nispeten kolay bir şekilde yeniden üretilebilirler ve yeni bir biyokatalizörün immobilizasyonu için kullanılabilirler. Hidroksil grupları esas olarak bu malzemelerin yüzeyinde bulunur. Bu, spesifik olmayan etkileşimlere dayanan enzimlerin esas olarak adsorpsiyon immobilizasyonunu desteklemektedir. Biyomoleküllerin kovalent bağlanması için ek

yüzey modifikasyonu gereklidir. Alümina, zirkonyum, titanyum, silika, demir oksit ve kalsiyum fosfat gibi seramik malzemeler biyomolekül taşıyıcı olarak kullanılmıştır [127]. Ebrahimi vd.  $\beta$ -galaktosidazı fiziksel olarak seramik malzemelere immobilize etmişlerdir ve immobilize enzimin etkinliği optimum parametreler altında %40'a ulaşmıştır [134]. Wang vd. yabanturpu peroksidaz enzimini kovalent bağlanma ile *N*- $\beta$ -amino-etil- $\gamma$ -aminopropil-trimetoksisilan ile modifiye edilmiş bir seramik malzemeye immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği yüksek ve verimliliği %92'ye yakın olduğu rapor edilmiştir [135].

### **2.9.5. Karbon nanotüpler**

Karbon nanotüpler, son yıllarda daha yaygın olarak kullanılan yeni bir destek malzemesi türüdür. Hem tek katmanlı hem de çok katmanlı karbon nanotüpler, düzenli, gözeneksiz bir yapı, geniş yüzey alanı ve biyoyuymululuk gibi özelliklere sahiptirler. Dahası, üstün termal, kimyasal ve mekanik direnç sergilerler. Karbon nanotüpleri, enzimlere olan afinitelerini daha da arttırmak ve güçlü enzim-matriks etkileşimlerinin oluşmasını desteklemek için fonksiyonelleşmeye de uygundur. Diğer materyallerden farklı olarak, karbon nanotüpler, substrat ve immobilize enzim arasındaki elektron transferini artırır. Bu nedenle bu malzemeler en çok oksidoredüktazların immobilizasyonunda kullanılır ve fenol ve onun mono- ve çok değişkenli türevleri, bisfenoller veya farmasötikler, yani diklofenak veya tetrasiklin gibi çeşitli bileşiklerin saptanması için biyosensörlerde uygulanır. Diğer enzim grupları (transferazlar ve hidrolazlar) da karbon nanotüplerin kullanımı ile immobilize edilmiştir [127]. Bir çalışmada, glikoz oksidaz karbon nanotüplerle immobilize edilmiş ve CHI ile çapraz bağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar elektron transfer oranının büyük ölçüde arttığını doğrulamıştır [136]. Bir başka çalışmada,  $\alpha$ -glukosidaz, amin grupları tarafından işlevselleştirilmiş çok-katmanlı karbon nanotüplere kovalent olarak immobilize edilmiştir. Bu şekilde elde edilen sistem, tıbbi bitkilerin antidiyabetik potansiyelini ölçmek için bir biyosensörde kullanılmıştır. Her iki biyosensörde kullanılan immobilize enzimler, büyük ölçüde gelişmiş duyarlılık ve tepki süresi sergilemişlerdir. Biyosensörler ayrıca, 30 gün boyunca neredeyse değişmeden kalan aktiviteleri ile nispeten iyi bir depolama stabilitesi sunmuşlardır [137].

### 2.9.6. Grafen ve grafen oksit

Karbon bazlı malzemeler arasında grafen ve grafen oksit (GO), enzimler için destek malzemeleri olarak da büyük ilgi çekmiştir. Bu ilgi, biyobozunabilirlik, iki boyutlu yapı, yüksek yüzey alanı ve gözenek hacminin yanı sıra iyi termal ve kimyasal stabilite gibi benzersiz özelliklerinden dolayıdır. Dahası, karboksilik (COOH), hidroksil (-OH) veya epoksi grupları gibi birçok çeşitli fonksiyonel grubun varlığı, bağlayıcı maddeler veya grafen yüzeyin modifikasyonu olmaksızın güçlü enzim-matriks etkileşimlerinin oluşturulmasını kolaylaştırır. Bu özelliklerden dolayı, lipazlar veya peroksidazlar gibi enzimler, adsorpsiyon, kovalent bağlanma veya tutuklama ile GO yüzeylerine immobilize edilmiştir. Grafen bazlı materyallerin enzimin biyokatalitik aktivitesini bile arttırabileceği de belirtilmelidir. Ayrıca, grafen bazlı destekler antioksidan özellikleri ile bilinir ve serbest radikallerin (diğer bir deyişle hidroksil veya ditiyosiyanat) reaksiyon karışımlarından süpürülmesini arttırabilir [127]. Örneğin, yabanciturpu peroksidaz glutaraldehit ile fonksiyonelleştirilmiş indirgenmiş grafen oksit nanopartiküllerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilize enzimin kinetik parametreleri (devir sayısı (kcat) ve katalitik verim (kcat/K<sub>M</sub>)), bağlandıktan sonra artmıştır. Bu immobilize enzimin katalitik özelliklerinin geliştiğini göstermektedir. Üstelik immobilize 10 katalitik devirden sonra bile ilk aktivitesinin %70'inden fazlasını sürdürmüştür [138]. Başka bir çalışmada, D-psikoz 3-epimeraz, modifiye olmayan grafen oksit malzemesine immobilize edilmiş ve D-fruktozun bir epimeri olan nadir şeker D-psikozun üretimi için uygulanmıştır. Immobilizasyondan sonra, D-fruktozun D-psikoza dönüşümünün biyokatalitik dönüşümü iyileştirilmiştir. Immobilize enzimin termal stabilitesi de önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, yarı ömrü 4 dakika olan serbest D-psikoz 3-epimerazın immobilizasyondan sonra yarı ömrünün 180 kat arttığı (720 dakika) bildirilmiştir [139].

### 2.9.7. Elektrospun malzemeler

Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı matriks olarak elektrospun materyallerin kullanılma potansiyeli birçok fonksiyonel ve yapısal avantajından kaynaklanmaktadır. Özellikle yüksek enzim immobilizasyon verimine yol açan gözeneklilik ve yüzey alanlarına sahiptirler. Bu malzemelerin nanometre boyutları, kütle transferinin düşük engellenmesi ve azaltılmış difüzyon sınırlamaları gibi faydalar da sağlar. Sonuç olarak, immobilize enzimin etkinliği arttırılabilir. Elektrospun destek malzemeler

biyoyumluluk, biyobozunabilirlik, yüksek mekanik mukavemet ve hidrofilitiklik gibi başka avantajlara da sahiptir, bu da onları çeşitli enzimler için uygun taşıyıcı matrisler haline getirir. Elektrospun nanomateryalleri, yüzeylerindeki çeşitli fonksiyonel grupların bulunmasından dolayı enzim bağlanmasını desteklemek ve enzimin aktivitesini arttırmak için kolayca modifiye edilebilirler. PVA, polistiren, poliakrilamid ve poliüretan gibi çok çeşitli sentetik polimerlerin yanı sıra kitin, CHI, aljinat ve selüloz gibi biyopolimerler, elektrospun taşıyıcıları üretmek için kullanılabilir. Enzimler bu malzemelere adsorpsiyon, kapsülasyon ve kovalent bağlanma ile immobilize edilebilir [127].

Örneğin, Canbolat vd. enkapsülasyon yöntemini kullanarak katalazı immobilize etmek için poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) kullanmışlardır. Yazarlar enzimin katalitik aktivitesini arttırmak için, polimeri immobilizasyondan önce siklodekstrin ile modifiye etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, siklik oligosakkaritlerin ilave edilmesinin, biyo katalizörün katalitik özellikleri üzerinde pozitif bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Kapsülleme ile immobilizasyon prosedürü katalazın kararlılığını arttırmıştır [140]. Weiser vd. beş farklı tipte lipazın immobilizasyonu için PVA nanofiberlerini kullanmışlardır. Çalışma, test edilen tüm lipazların aktivitesinin, enzimin aktif konformasyonunun stabilizasyonu ile artırıldığını kanıtlamıştır. Dahası, enzimlerin immobilizasyonu sonrasında, polimerik nanofiberlerin yapısal özellikleriyle doğrudan ilişkili olan kütle aktarım kısıtlamalarında azalma nedeniyle reaksiyonun devir sıklığı artmıştır [141]. Bir başka çalışmada, PVA veya polilaktik asit nanofiberler membranları, *Candida antarctica* lipaz B'nin adsorpsiyon immobilizasyonu için kullanılmıştır. Immobilize lipaz içeren PVA membranı hem organik hem de su ortamında kullanılmıştır. Polilaktik asit nanofiberlerine immobilize edilen lipaz daha yüksek aktivite göstermiş ve daha yüksek enantiyomer seçiciliği sergilemiştir. Bununla birlikte, nanofiberlerin sağladığı korumadan dolayı, her iki immobilize sistem, 10 reaksiyon döngüsünde bile mükemmel stabilite göstermiştir [142].

### **2.9.8. Hibrit ve kompozit malzemeler**

İnorganik ve organik matrislerin avantajlı özelliklerini bir araya getirip yeni malzemeler üretmek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Hibrit ve kompozit malzemeler genellikle bir enzim ve bir taşıyıcı materyal arasındaki etkileşimlerin dengelenmesini mümkün kılar ve reaksiyon koşullarında biyokatalizörleri mekanik olarak daha dayanıklı ve stabil hale getirir. Ayrıca, biyokatalitik sistemi tekrar

kullanılabilir hale getiren ve depolama sırasında konformasyonel değişikliklere karşı koruyan biyomoleküller için uygun bir ortam sağlaması da bu malzemelerin diğer bir avantajıdır. Kompozit desteklerin kullanımının ek bir yararı ise, bu malzemelerin tüm katalitik sınıflara ait enzimler için uygun olmasıdır [127]. Bu nedenle, enzim immobilizasyonu için destek materyalleri arasında hibrit veya kompozit materyallere özel dikkat gösterilmiştir.

Yukarıda anlatıldığı gibi, enzimler için taşıyıcı malzeme olarak birçok sentetik ve doğal kökenli polimer türü kullanılabilir. Bununla birlikte, kullanılabilirliklerini arttırmak için, enzime ve teknolojik sürece daha iyi uyan gelişmiş özelliklere sahip ürünler elde etmek için birleştirilebilirler.

- İki sentetik materyalden (örneğin polianilin ve poliakrilonitril, polietilenimin, epoksi ile akrilat kopolimer veya poli (akrilik asit) ve PVA),
- Poli (akrilik asit) ve selüloz, PVA ve CHI veya polianilin ve CHI gibi biyopolimer ve sentetik bir polimerden,
- CHI ve aljinat, kitin ve lignin veya selüloz ve dekstran gibi iki biyopolimerden oluşabilir.

Örneğin, pH ve termal direnç ve sentetik stabiliteye sahip olan bir sentetik polimerin, biyoyumluluk ve biyo-katalizörlere yüksek afinitesi ile bilinen bir biyopolimer ile birleştirilmesi ve elde edilen hibrit malzemenin bir enzim immobilizasyon taşıyıcı malzemesi olarak kullanılması, iyi katalitik özelliklere sahip, stabil, yeniden kullanılabilir bir biyokatalitik sistemin ortaya çıkmasına neden olabilir. Ek olarak, uygun prekürsör seçimi yoluyla, matriksin hidrofobik/hidrofilik karakteri, enzim ve destek arasında oluşturulan etkileşimlerin kuvvetini arttırmak ve biyomolekülün katalitik aktivitesini arttırmak için kontrol edilebilir. Bu malzemelerin en büyük avantajı, onları çeşitli şekil ve boyutlarda oluşturma imkânıdır. Malzemeler, parçacıklar, lifler, tüpler, boncuklar, membranlar veya tabakalar şeklinde enzim destekleri olarak kullanılabilir. Çok çeşitli dizayn edilebilen organik-organik hibrit malzemeler, tüm katalitik sınıflara ait enzimlerin adsorpsiyon, kovalent bağlanma ve ayrıca tuzaklanma veya enkapsülasyon yoluyla immobilizasyonu için uygun hale getirir. Örneğin, Kumar vd. polilaktik asit ve polietilen glikol kullanarak, elektrospinning tekniği ile mikro veya nano lifler üretmiştir. Bu şekilde üretilen malzeme, yüksek gözenekliliğe, geniş bir yüzey alanına, enzim eklenmesi için bir matriks olarak mükemmel özelliklere sahip olan fonksiyonel bir malzemedir.

Çalışmada, alkalın fosfataz enzimi, matriksin yüzeyindeki biotin-streptavidin etkileşimleri ile immobilize edilmiştir. İmmobilize enzim, uzun bir depolama süresi boyunca iyi bir stabilite ve yeniden kullanılabilirlik göstermiştir. Bu nedenle yazarlar bu hibrit malzemelerin biyosensörlerin gelişimi için umut verici bir platform olabileceğini rapor etmişlerdir [143].

PVA-hipromelloz, bir sentetik polimer ve inert bir metilselüloz türevidir olan bir yarı sentetik biyopolimerle birleştirilerek üretilen organik bir hibrit malzeme örneğidir. Bu materyal, *Burkholderia cepacia*'dan izole edilen lipazın immobilizasyonu için herhangi bir çapraz bağlayıcı olmadan kullanılmıştır. Elde edilen biyokatalitik sistem, polar olmayan ortamda fenetil butiratın sentezi için kullanılmış ve substrat olarak kullanılan fenetil alkol ve vinil bütiratın dönüşümünü %99 oranında katalizlemiştir. Polimerik hibrit desteğin koruyucu etkisi, immobilize edilmiş lipaz tarafından yüksek katalitik aktivitenin tutulmasıyla sonuçlanmış ve immobilize edilmiş enzim kullanıldığında reaksiyonun aktivasyon enerjisinin daha düşük olduğu bulunmuştur [144].

Matto ve Husain, peroksidazın adsorpsiyon ve hapsedme yöntemiyle immobilizasyonu için taşıyıcı olarak kalsiyum aljinat nişasta hibrit jeli kullanmışlardır. Nişasta yapısındaki birçok hidroksil grubunun varlığı, enzimin yüzey yapışmasını arttırırken, jelasyon için aljinat kapasitesi, peroksidazın immobilizasyonunu desteklemiştir. Hapsedilen enzimin, yüzeyde immobilize edilmiş enzime kıyasla pH, sıcaklık, çözücüler ve üre veya ağır metaller gibi inhibitörlere karşı önemli ölçüde daha kararlı olduğu bulunmuştur. Üstelik bu immobilize peroksidazın, yedi kez tekrarlanan reaksiyon döngüsünden sonra bile orijinal aktivitesinin %70'inden fazlasını koruduğu rapor edilmiştir [145].

Abdulla ve Ravindra tarafından yapılan bir çalışmada, hapsedme yöntemiyle lipaz immobilizasyonu için yeni bir biyopolimerik hibrit üretmek için eşit oranlarda aljinat ve k-karrajenan kullanılmıştır. Elde edilen biyo katalizör, *Jatropha* yağı ve etanolden biyodizel üretiminde kullanılmıştır. Optimum koşullar altında, trigliseritlerin yağ asidi etil esterlerine toplam transesterifikasyonu sağlanmıştır. Bu biyokatalitik sistem, altı döngüden sonra başlangıç aktivitesinin %75'inden fazlasını koruduğundan iyi bir yeniden kullanılabilirlik göstermiştir. Sonuçlar, bir aljinat-k-karrajenan hibrit üzerinde immobilize edilmiş lipazın, biyodizel üretimi için etkili ve çevre dostu bir biyokatalizör olabileceğini göstermektedir [146].

İki biyopolimerden yapılmış bir kompozitin başka bir uygulaması olarak CHI ve kalsiyum aljinatın birleştirilmesiyle oluşan hibrit malzeme penisilin G amidazin immobilizasyonu için kullanılması gösterilebilir. Immobilize enzim, yüksek termal ve depolama kararlılığı ve iyi tekrar kullanılabilirlik göstermiştir. Aljinat-CHI hibrit boncuklarında immobilize olan enzimin birkaç avantaja sahip olduğu ve 6-aminoopenikillanik asidin organik sentezinde yüksek verimde kullanılabileceği bulunmuştur [147].

Enzimlerin immobilizasyonu için hibrit veya kompozit destekler oluşturmada hem organik hem de inorganik kökenli çok çeşitli malzemeler birleştirilebilir. En sık kullanılan inorganik malzemeler arasında silika, çinko ve titanyum oksitler gibi inorganik oksitler, ayrıca mineraller, karbon malzemeler ve manyetik nanopartiküller bulunur. Bu malzemeler ayrıca sentetik kökenli polimerlerle (örneğin poliakrilonitril, polietilenimin ve PVA) veya CHI, lignin ve aljinat gibi biyopolimerlerle birleştirilebilirler. Bu malzemeler esas olarak hidrolazların, oksidoredüktazların ve transferazların adsorpsiyonu veya kovalent immobilizasyonu için kullanılmaktadır. Organik-inorganik hibritler, enzimler için destek malzemeleri olarak büyük potansiyel gösterir; çünkü bu tür malzemeler, iyi bir stabilite ve mekanik direnç ve ayrıca biyolojik moleküllere çok yüksek afinite sağlarlar. Yüksek stabilite ve kimyasal inertlik, inorganik monomer malzemenin özellikleriyle ilgilidir. Sentetik polimerler ve biyopolimerler yapılarında biyokatalizörlerin kimyasal gruplarıyla etkileşime girebilen birçok fonksiyonel parçaya sahip olduklarından enzimleri bağlama kabiliyetinin iyi olması organik bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Enzim immobilizasyonu için fonksiyonel organik-inorganik kompozitler ve hibritler üretmek üzere birçok farklı organik ve inorganik madde kombinasyonu kullanılmıştır [127]. Örneğin, Zhao vd. silisin stabilitesini ve mekanik direncini, CHI'nın biyouyumluluk ve jelleşme özellikleri ile birleştirmiş ve basit *in situ* kapsülleme yoluyla glikoz izomerazın silika CHI hibrit mikro-kürecikleri üzerinde immobilizasyonunu sağlamıştır. Immobilize enzim, glikozun fruktoza dönüşümünde katalizör olarak da kullanılmıştır. Enzimin bağlı aktivitesinin 6 ila 8'lik geniş bir pH aralığında, 40 ila 80 °C'lik bir sıcaklık aralığında, 3 aylık bir depolama süresinde ve 15 tekrarlanan katalitik döngüden sonra bile %90'ın üzerinde olduğu belirtilmiştir [148].

Miranda vd. çevre dostu bir malzeme olan poli L-lösin hidrotalsit nano hibrit malzemenin sentezini ve bifonksiyonel bağlayıcı olmadan tirozinaz immobilizasyonu

için etkin kullanımını bildirmiştir. Elde edilen biyokatalitik sistem, kalkonun asimetrik epoksidasyon reaksiyonunda kullanılmıştır. Nano hibrit bazlı biyokatalizör, mükemmel aktivite ve enantioselektivite sergilemiştir. Ürün ayrıca art arda beş çalışmadan sonra değiştirilmemiş aktivite ile iyi tekrar kullanılabilirlik göstermiştir. Böylece, bu biyokatalitik sistemin, protein mühendisliği, biyomedikal ve katalizde potansiyel uygulamaları bulunabileceği rapor edilmiştir [149].

Chang vd. montmorillonit ve tabakalı silikatlardan oluşan doğal kili, iyi jelleşme yetenekleri sergileyen CHI ile birleştirmiştir. İnorganik-organik hibrit malzeme, glutaraldehit ile çapraz bağlanmış ve son olarak,  $\beta$ -glukosidazın immobilizasyonu için kullanılmıştır. Kovalent olarak bağlı enzim, geniş pH ve sıcaklık aralıklarında yüksek stabilite göstermiştir [150].

Başka bir çalışmada ise, karbon nanosferlerin iletken özellikleri, glukoz oksidazın immobilizasyonu ve bunun glikozun ölçülmesinde kullanımı için sodyum aljinatın jelleşme kabiliyeti ile birleştirilmiştir. Optimum ölçüm koşulları altında, biyosensör, 0.5 M saptama sınırına sahip, geniş bir lineer konsantrasyon aralığında glikoz için çok iyi bir performans elde etmiştir [151].

Yukarıda tartışılan malzemelerin yanı sıra, inorganik-inorganik hibrit ve kompozit malzemeler, enzim immobilizasyonu yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Genel olarak bu malzemeler, iyi pH ve termal stabilite, mekanik direnç sergilerler. Dahası, kolayca temin edilebilir ve birçok durumda bunların sentezi basittir ve dolayısıyla nispeten ucuzdur. İnorganik-inorganik türevli malzemelerin yüzeyinde karbonil (C = O), karboksil (COOH), amin ( $-NH_2$ ) ve epoksi gibi çeşitli fonksiyonel gruplar mevcuttur, ancak en sık gözlenen hidroksil (-OH) gruplarıdır. Bu gruplar inorganik kompozit taşıyıcı malzemelerin hidrofilik karakterini belirler ve biyomoleküllere afinitelerini artırır. Ek olarak, birçok fonksiyonel grubun varlığı, immobilizasyon verimini artırır ve yüzeyin kolay işlevselleştirilmesine izin verir. Basit modifikasyonun yanı sıra, çeşitli kimyasal grupların varlığı, istenen teknolojik özelliklere sahip birleşik malzemelerin üretilmesine ve enzimlerin yüksek afinitesine izin verir; bu da bu malzemeleri pratik uygulamalar için umut verici kılar [127].

Örneğin, sol-jel türevli silika çok duvarlı karbon nanotüplerle birleştirilmiş ve *Candida rugosa* lipazın spesifik olmayan immobilizasyonu için kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen biyokatalitik sistem organik ortamda esterifikasyon reaksiyonlarında yüksek verimde uygulanmıştır. İmmobilize edilmiş lipaz ayrıca, çok duvarlı karbon nanotüplerin koruyucu etkisinden dolayı beş katalitik döngüden sonra

neredeyse başlangıç aktivitesinin tamamını korumuştur [152]. Başka bir çalışmada, Zhu vd. domuz pankreas lipazının kovalent immobilizasyonu için bir taşıyıcı olarak karboksil fonksiyonlu silika kaplı manyetik nanopartikülleri kullanmıştır. Manyetik nanopartiküllerin kompozite eklenmesi, biyokatalitik sistemin bir manyetik alan kullanarak reaksiyon karışımından kolayca ayrılmasını sağlamıştır. İmmobilize edilmiş lipaz, serbest enzime göre 70 °C'de yüksek katalitik verimle iyi bir termal direnç sergilemiştir [153]. Bu fonksiyonel grupların varlığı, hidrolazlar ve oksidoredüktazlar dâhil olmak üzere birçok katalitik sınıfa ait enzimlerin bağlanmasını ve bilinen tüm immobilizasyon tekniklerinin potansiyel kullanımını mümkün kılmaktadır. Örneğin, glikoz oksidaz, manyetik nanopartiküller ve çok duvarlı karbon nanotüplerle birleştirilmiş nanozeolitlere immobilize edilmiştir. Başka bir çalışmada, *Candida antarctica* kaynaklı  $\beta$ -glukosidaz,  $\alpha$ -kimotripsin ve lipaz B, *N,N*-disüksinimidil karbonat tarafından aktive edilen manyetik nanopartiküllerin yüzeyi üzerinde başarıyla kovalent olarak immobilize edilmiştir [154]. Genel olarak, silika inorganik hibrit malzemeler için en yaygın kullanılan öncülerden biridir. Bununla birlikte, inorganik oksitler, mineraller, killer, asil metal nanopartiküller ve karbon bazlı malzemeler gibi diğer inorganik bileşenler de inorganik-inorganik enzim destekleri için öncüler olarak görev yapabilir. Enzim immobilizasyonu için kullanılan inorganik inorganik kompozitin ilginç bir örneği, kalsiyum karbonat ve altın nanopartiküllerinin (CaCO<sub>3</sub>-AuNPs) bir kombinasyonudur. Bu taşıyıcı materyal Li vd. yaban turpu peroksidazın adsorpsiyon immobilizasyonu için ve ayrıca aracı madde içermeyen bir hidrojen peroksit biyosensörü üretmek için kullanılmıştır. CaCO<sub>3</sub>-AuNP'lerin inorganik hibritlerin elektrik iletkenliğinin iyi olması nedeniyle, enzim moleküllerinin matriksin yüzeyi üzerindeki elverişli yöneliminin yanı sıra, biyosensör H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> azalmasına yönelik güçlü bir aktivite sergilemiştir [155].

## 2.10. L-ASNaz'ın İmmobilizasyonu

L-ASNaz'ın immobilizasyonundan kullanılan taşıyıcı formülasyonlar genellikle biyouyumlu ve biyobozunur olan polimerik malzemeler olmakla beraber farklı taşıyıcı matriksler literatürde mevcuttur. Bu bağlamda L-ASNaz, PMMA, PHEMA, PMAA-*ko*-PMMA ve bunların değişik oranlarda nişasta içeren kompozitlerine immobilize edilerek enzim kinetik parametreleri, yarı ve depo ömrüne etkisi araştırılmıştır. İmmobilize enzimin hem kinetik parametreleri hem yarı ömrü hem de depolama süresinde önemli iyileştirmelerin gerçekleştiği saptanmıştır [156–158].

Bahreini vd., L-ASNaz enzimini üretmiş, saflaştırmış ve immobilize etmişlerdir. Çalışma ekibi *Escherichia coli* BL21 pLysS (DE3) bakterisinden L-ASNaz'ı modifiye alkalın lizis metoduna göre üretmişlerdir. Daha sonra ürettikleri enzimi SDS-PAGE yöntemiyle saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları enzimleri CHI-TPP nanopartiküllerine immobilize edip serbest enzim ile karşılaştırmışlardır. L-ASNaz'ın yarı ömrüne yaptığı etki bakımından incelendiğinde, uygun tampon ortamında serbest enzimin 26 saat olan yarı ömrünün CHI nanopartiküllerine immobilize edilerek 23 güne uzatıldığı ifade edilmektedir [159].

Monajati vd., grafen oksit (GO)'in , geniş spesifik yüzey alanı nedeniyle L-ASNaz immobilizasyonu için umut verici bir taşıyıcı materyal olduğunu önermişlerdir. Yaptıkları çalışmada, çalışma ekibi öncelikle GO malzemesini L-aspartik asit ile fonksiyonel hale getirmiş (GO-Asp) ve sonra L-ASNaz enzimini, fiziksel olarak veya kimyasal konjugasyon yoluyla GO-Asp üzerinde immobilize etmişlerdir. Onlar, kovalent immobilizasyon veriminin %100 olduğunu rapor etmişlerdir. Serbest ve immobilize edilmiş L-ASNaz'ın stabilitesi çeşitli sıcaklıklarda (20–60 °C) ve pH'da (5-9) enzim aktivitesini incelenmiştir. Kovalent olarak immobilize edilmiş L-ASNaz, pH 8'de serbest enzimden daha yüksek aktivite göstermiş ve 20 °C, 40 °C ve 60 °C'de sırasıyla %100, %90.5 ve %40.6 oranında aktivite sergilemiştir. Ayrıca bu enzim 60 °C'de 8 kez peş peşe kullanıldıktan sonra %42 oranında aktivite gösterdiğini ve kinetik parametrelerin immobilizasyondan sonra önemli oranda değişmediğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak çalışma ekibi hazırlanan GO-Asp nanomalzemelerin L-ASNaz'ın endüstriyel alanda kullanılabileceğini öngörmüşlerdir [160].

Başka bir çalışmada, *E. coli* ATCC 11303'den izole edilen L-ASNaz kalsiyum aljinat tanecikleri üzerine mikrokapsülleme tekniği ile immobilize edilmiştir. Optimum parametrelerin elde edilmesi için enzim aktivitesi üzerine sodyum aljinat konsantrasyonu, kalsiyum klorür konsantrasyonu ve enzim yükleme konsantrasyonu etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, sodyum aljinat konsantrasyonundaki artış, herhangi bir kalsiyum klorür konsantrasyonunda L-ASNazın aktivitesini arttırdığını ve orta değerde yüklenen enzim miktarının, enzimin kalan aktivitenin yüzdesini arttırdığını ortaya koyduğu görülmüştür. En uygun immobilizasyon koşullarının sodyum aljinat oranının %1.98 (w/v), kalsiyum klorür konsantrasyonunun %3.70 (w/v) ve enzim miktarının %46.91 (v/v) olarak bulunurken, elde edilen en yüksek L-ASNaz aktivitesinin %34.49 olduğu rapor edilmiştir [161].

2018 yılında yapılan bir çalışmada, *E. coli*'den izole edilen L-ASNaz, çapraz bağlama maddesi olan glutaraldehit kullanılarak alüminyum oksit peletleri üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Maksimum immobilizasyon verimi %85.0 olarak rapor edilmiştir. Hem serbest hem de immobilize edilmiş L-ASNaz, 37 °C'de ve pH 7.5'te optimal olarak aktif olduğu belirtilmiştir. İmmobilize enzimin daha yüksek afiniteye (düşük Km) sahip olduğu ve bazı çözücüler (etil asetat, aseton, asetonitril), metal iyonları (Ag<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) ve β-merkaptotanol varlığında nispeten daha kararlı olduğu görülmüştür. İmmobilize enzim, bir cam kolon reaktöründe, aktivitede bir kayıp olmadan art arda dokuz çevrim kadar substrat hidrolizi için tekrar kullanılmıştır. Ayrıca, immobilize enzimin raf ömrünün 30 gün olduğu ve beyazlatılmış patates cipsi içindeki L-Asn seviyesini düşürmede etkili olduğu yazarlar tarafından rapor edilmiştir [162].

Varshosaz ve Anvari yaptıkları bir çalışmada L-ASNaz'ın farmakokinetiğini geliştirmek, yarı ömrünü artırmak ve enzimin stabilitesini arttırmak için yeni bir polimer biyo-konjugat hazırlamışlardır. Amid bağı oluşturmak için polimerik nanopartiküllerin karboksilik asit gruplarını aktive eden 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbodiimidin çapraz bağlama maddesi kullanılmıştır. L-ASNaz'ı Ecoflex® ve poli (stiren-ko-maleik asit) (PSMA) nanopartiküllerine immobilize etmişlerdir. Optimal parametreleri elde etmek için her bir polimerin ve çapraz bağlayıcının miktarları optimize edilmiş ve nanopartiküllerin parçacık büyüklüğü, zeta potansiyeli ölçülmüştür. Sonuçlar, konjuge enzimin pH değişikliklerine ve proteolize karşı daha fazla kararlı olduğunu göstermiştir. İmmobilize enzimin daha düşük Km değeri (substrata daha fazla afinite olduğunu gösterir), plazmada ve PBS'de serbest enzime kıyasla daha yüksek yarı ömre sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, PSMA'ye konjuge edilen enzim, Ecoflex® nanopartiküllerine immobilize edilen enzimden daha iyi sonuçlar göstermiştir [163].

Uygun vd., Au/Ni/Au/PEDOT-PPy-COOH segmentlerinden oluşan ultrasonik uyarımlı nanoteller hazırlamışlar ve L-ASNaz immobilizasyonu için kullanmışlardır. L-ASNaz'ın nanotel motorların yüzeyine immobilizasyonundan sonra, immobilize enzimin termal ve pH'ya karşı olan stabilitesi artmış, tripsin enzimine karşı direnci gelişmiş ve substratı için daha yüksek afinite (düşük Km) göstermiştir. Aynı zamanda hazırlanan nanoteller ultrasonik etkiyle daha hızlı hareket ederek substratın biyotalitik tükenmesini büyük ölçüde hızlandırmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bulgularda serbest L-ASNaz EL4 lenfoma hücrelerinin büyümesini %17.3 inhibe ederken,

ultrasonik uyarımlı (5 V, 2.83 MHz) serbest L-ASNaz aynı hücrelerin büyümesini %22.9 oranında inhibe etmiştir. İmmobilize enzimin ise lenfoma hücrelerinin büyümesini %28 inhibe ederken, ultrasonik uyarımlı immobilize enzimin kanserli hücrelerin büyümesini %92 gibi yüksek bir oranda inhibe ettiği rapor edilmiştir [164].

Ayrıca, 2018 yılında yayımlanan bir yüksek lisans tezinde, *E. coli* kaynaklı L-ASNaz manyetik poli(HEMA-GMA) nanopartiküllerine (117.5 nm) kovalent bağlanma yöntemiyle immobilize edilmiştir. Serbest enzimin optimum pH'ı 7.5, optimum sıcaklığı 45 °C bulunurken, immobilize enzimin pH'ı 6.5, optimum sıcaklığı 55 °C olarak bulunmuştur. Serbest enzimin kcat değeri (47356 dk<sup>-1</sup>), immobilize enziminkinden (497 dk<sup>-1</sup>) daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, immobilize enzimin serbest formuna kıyasla daha termostabil ve depo kararlılığına sahip olduğu rapor edilmiştir. İmmobilize enzimin yapay insan serumundaki etkinliğini belirlenmiş ve elde edilen sonuçlarda immobilize enzimin %74.74 aktivite gösterdiği gözlenmiştir [165].

## 2.11. Stentler

Stentler, damar veya kanal çapındaki azalmaları önlemek ve kan damarlarında lokalize akışı sağlamak için kullanılan tüplerdir. Stentler ayrıca safra kanalı, özofagus gibi diğer kanallarda da uygulanır. Bu nedenle genişlemeleri için esneklik ve dilatasyonun sürdürülmesi için ise sertlik ve elastik geri tepmeye karşı dirençli olmaları gerekmektedir. Geleneksel metaller bu özelliklere sahiptir. Diğer yapay organlar ve tıbbi cihazlar sadece metallerden değil aynı zamanda seramiklerden, polimerlerden, bunların kompozitlerinden ve doğal biyomateryallerden yapılmıştır. Çeşitli malzemelerin mekanik özellikleri Tablo 2.8'de karşılaştırmalı olarak listelenmiştir. Stentler için seramiğin kullanılması zor olmaktadır. Tablo 2.8'de gösterildiği gibi, güçlü olmalarına rağmen, seramikler esneklikten yoksundur. Dahası, seramiklerin kırılma dayanıklılığı düşüktür ve seramikler hafif plastik deformasyonla aniden kırılır. Polimerler ise, mukavemet ve sağlamlıktan yoksun ama yüksek esnekliğe sahiptirler. Ancak hem ortam hem de vücut sıcaklığında yüksek esneklik ve mukavemete sahip olan polimerler elde etmek zordur. Ayrıca, tedavilerde stent olarak kullanılan bir materyalin X-ışını tarafından görüntülenmesi gerekir. Hafif elementlerden oluşan polimerler malzemenin herhangi bir gelişmesi olmaksızın kullanılamaz. Bu özellikler, stentlerdeki polimerlerin kullanımını sınırlamaktadır. Bu nedenle, mekanik özellikler açısından, stentler çoğunlukla metallerden yapılır.

Stentlerde, metallerin hayat kurtaran özellikleri, polimerlerin daha uzun vadeli toksisite özelliklerine göre daha önceliklidir, bu nedenle, mekanik özelliklere sahip metaller, polimerlerinkinden daha iyi olanlardır. Stentlerde metallere alternatif olarak polimerlerin kullanılması hakkında çalışmalar şu anda yoğun bir şekilde yapılmaktadır; bununla birlikte, polimerlerin mekanik ve görüntüleme özelliklerinin iyileştirilmesi de bu amaç için gereklidir.

**Tablo 2.8.** Çeşitli malzemelerin gerilme direnci, basınç dayanımı, elastik modülü ve kırılma dayanımı [166]

<b>Materyal</b>	<b>Gerilme direnci (MPa)</b>	<b>Basınç dayanımı (MPa)</b>	<b>Elastik modülü (GPa)</b>	<b>Kırılma dayanımı (MPa m<sup>1/2</sup>)</b>
<i>Metal</i>				
Paslanmaz çelik (316 L)	600-1000	-	200	-
Maraging çelik	-	-	-	76~110
Co-Cr alaşım	480-1030	-	200	-
Ti (ticari saf)	560-620	-	100	-
Ti-6Al-4V alaşım	950	-	105	40-70
Saf Ta	340-760	-	190	-
<i>Seramik</i>				
Alumina	-	980	364	3.1-5.5
Zirkonyum	-	206	151	-
Zirkonyum (kararlı)	-	900-1200	-	-
Kuvars camı	-	2000	67	0.7-0.8
Hidroksiapatit	-	-	-	0.69-1.06
<i>Polimer</i>				
PE (UHMW)	20-40	-	0.50	2-5
PMMA	70	-	3.0	1.6
Silikon lastik	5.0	-	0.01	-
Naylon 66	85	-	2.8	3-5

## 2.12. Biyobozunur Polimerik Stentler

Biyouyumlu polimer materyallerin seçimi, biyobozunur bir polimerik stentin üretimi için çok önemlidir. Biyobozunur dikiş ipliği ile ilgili ilk çalışmalarda, polimerlerin yüksek mekanik mukavemet gösterdikleri ve biyobozunur olduklarından dolayı cerrahi durumlarda kullanılabileceğini göstermiştir [167]. Hücreler implante edilen malzemenin doldurduğu alanı geri almaya başladıkça, polimer parçalanır ve son olarak tamamen çözünerek yerini yeni oluşmuş hücreler bırakır [168,169]. Bu kavram, biyobozunur stentin tasarımı için de benimsenmiştir.

Günümüzde biyoimplantlar için araştırılan birçok biyobozunur polimer vardır ve bunlar ayrıca stent uygulaması için de kullanılabilir. Ancak bazı dezavantajlar nedeniyle, polimerler stent uygulamaları için özel olarak üretilmektedir. Polilaktit (PLA) ve kopolimerleri son yıllarda biyobozunur stent implantları olarak geniş çapta çalışılmaktadır. Ayrıca, bazı kopolimerler de stent uygulamaları için tasarlanıp çalışılmakta ve ticari pazarları dünya çapında hızla büyümektedir [170]. İmplant olarak, klasik metalik malzemelerin yerine biyobozunur polimerlerin kullanılmasının avantajları arasında;

- ❖ Önceki stentlerin takıldığı hastalarda damarların yeniden tıkanması ve pıhtılaşma riski ortadan kalkıyor.
- ❖ Geride metal bir iskelet bırakmadıkları için aynı noktaya daha sonra yapılacak yeni bir stent veya bypass ameliyatı için engel oluşturmazlar.
- ❖ Hem hastaların yaşam kalitesi artacak hem de ömür boyu ilaç kullanılmayacağından maddi açıdan da önemli bir avantaj sağlamaktadır.
- ❖ Yaklaşık altı ay içinde yok oluyor.
- ❖ Tomografi ve MR cihazlarıyla görüntülenebilir.
- ❖ Stent takıldıktan sonraki ilk haftalarda göğüste duyulan batma hissi ortadan kalkıyor.

yer almaktadır.

Hem akademik hem de ticari olarak polimerik stent malzemelerinin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan biyobozunur polimerlerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.9'da sunulmuştur.

**Tablo 2.9.** En yaygın kullanılan biyobozunur polimerlerin bazı özellikleri [171]

<b>Polimer</b>	<b>Kristallik</b>	<b>Tg (°C)</b>	<b>Gerilme direnci (MPa)</b>	<b>Gerilme modülü (GPa)</b>	<b>t<sub>d</sub> (ay)</b>	<b>Bozunma ürünü</b>
PGA	Yarı kristalin	35–40	60-80	5-7	6-12	GA
PGA-ko-TMC	Yarı kristalin	–	60	2.4	12-15	GA
85:15 PDLGA	Amorf	50–55	40-50	2.0	6-12	D-LA & GA
PDLLA	Amorf	55–60	40-50	2.0	12-15	-
PLLA	Yarı kristalin	60–65	60-70	3.0	36	LA
PCL	Yarı kristalin	– 65– 60	20-25	0.4	36	CA
PDS		– 10– 0		1.5	6-12	GA & LA
75/25 PDLGA	Amorf	50–55		2.0	4-5	LA & GA
50/50 PDLGA	Amorf	45-50		2.0	1-2	-
Poliortoesterler		–		4-16	yüzey	-
PHB	Yarı kristalin	–	20-43	-	Yığın	-

PPF	Amorf	–	2-30	2-3	>24	fumarik asit & PEG
Tirozin-türevli polikarbonat	Amorf	53-81	50-70	1-2	Çok yavaş ( <i>in vitro</i> )	amid & karbonat

Not: GA = glikolik asit; LA = laktik asit; CA = kaproik asit; Tg = camsı geçiş sıcaklığı; td = bozunma zamanı

### 2.12.1. Doymuş alifatik poliesterler

Doymuş alifatik polimerik malzemeler, doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılan malzeme gruplarından biridir. Biyobozunur stentlerin hazırlanması için poli L-laktit (L-PLA), poli glikolid (PGA), poli-kaprolakton (PCL) ve poli-D, L-laktik asit (DL-PLA) en sık kullanılan alifatik poli ( $\alpha$ -hidroksi asit)lerdir [172]. Ayrıca, poli laktik asit (PLA), poli glikolik asit (PGA), poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) and bunların kopolimerler de kullanılmaktadır. PLA'nın üç türevi (L-PLA, D-PLA ve PLGA) vardır. DL-PLA, PGA ve PLA, biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan malzemelerdir [173].

Doymuş alifatik poliesterlerin çoğu kondenzasyon homo polimerizasyonu veya kopolimerizasyonu ile üretilir. L-PLA, PCL ve PLA, Sb (antimon), Zn (çinko) veya Pb (kurşun) gibi katalizör kullanılarak siklik monomerlerin halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenir. Alifatik poliesterlerin temel iskeleti benzerdir ancak asılı gruplar değişir. Bu asılı gruplar moleküler ağırlıkta ve kristallikte değişimlere katkıda bulunur ve bu da bozunma hızını etkiler [174]. Son zamanlarda alifatik poliester ve ko-polimerler avantajları sayesinde ilaç salım, kardiyovasküler ve doku mühendisliği uygulamaları alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. En önemli faktörler, yüksek biyoyumluluk, iyi mekanik özellikler, düşük bozunma süresi ve bozunma ürünlerinin toksik olmamasıdır. Ön klinik çalışmalarda incelenen tüm alifatik poliester stentler Tablo 2.10'da listelenmiştir.

**Tablo 2.10.** Alifatik poliester stentler

Stent tipi	Genişleme	Malzeme	Uygulama	Referans
Örme	Balon	PGA	Köpek koroner arter	[175]
Örme	Balon	PGA	Domuz koroner arter	[176,177]
Elmas örgülü	Kendiliğinden	PLLA	Köpek femoral	[178]
Film	-	PCL/(D, L)PLA	Domuz karotis	[179]

Tübüler bobin	Balon	PLLA/PCL	Tavşan karotis arterleri	[180]
Bobin stent	Kendiliğinden	PLLA	İnsan koroner	[177]
İlaç salan	Termal	PLLA	Domuz koroner	[178]

### 2.12.2. Poli glikolik asit (PGA)

PGA, biyomedikal uygulamalar için incelenen biyobozunur sentetik polimerlerden biridir. PGA yüksek derecede kristalin hidrofilik, lineer alifatik yapıdır [172]. Çoğu organik çözücüde yüksek bir erime noktasına ve nispeten düşük çözünürlüğe sahiptir. PGA, yüksek derecede toksik çözücü olan hekzafloro izopropanol içinde oda sıcaklığında çözünür. PGA'nın gücü ve genç modülü çok yüksektir ve bu yüzden dikiş ipliği olarak kullanılır [181]. PGA'nın sertliğini azaltmak için diğer monomerlerle kopolimerleştirilmiştir. PGA bozunması yığın (bulk) şeklindedir. Bu, iki adımda bağlanmış esterinin rasgele hidrolizi ile gerçekleşir. İlk aşamada su, matriksin amorf bölgesine yayılır ve ester grubunun hidrolitik zincir kesilmesi başlar. Bozunmanın ikinci aşamasında, amorf bölgenin yıkıma uğramasından sonra polimerin kristal bölgeleri ortaya çıkar [182,183] Kütle kaybı, PGA için 4-12 hafta aralığında gerçekleşir. Hidroliz *in vitro* oranı, pH değerini koruyarak kontrol edilebilir. Bozunma ürünü doğal bir metabolit olan glikolik asittir. PGA kaplama ve doku mühendisliği uygulamasında iskelet olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. PGA stenti, Kyoto Üniversitesi'nde çalışılmış ve geliştirilmiştir ve bu stent, 15 köpeğe başarılı bir şekilde implante edilmiştir. İmplantasyondan 3 saat sonra tromboz görülmüştür. PLA-ko-PGA ko-polimeri, prelinik testte başarılı bir şekilde çalışılmıştır [184]. PGA tek başına, dikişler, ilaç salım sistemleri ve biyobozunur implantlar için kapsamlı olarak çalışılmaktadır.

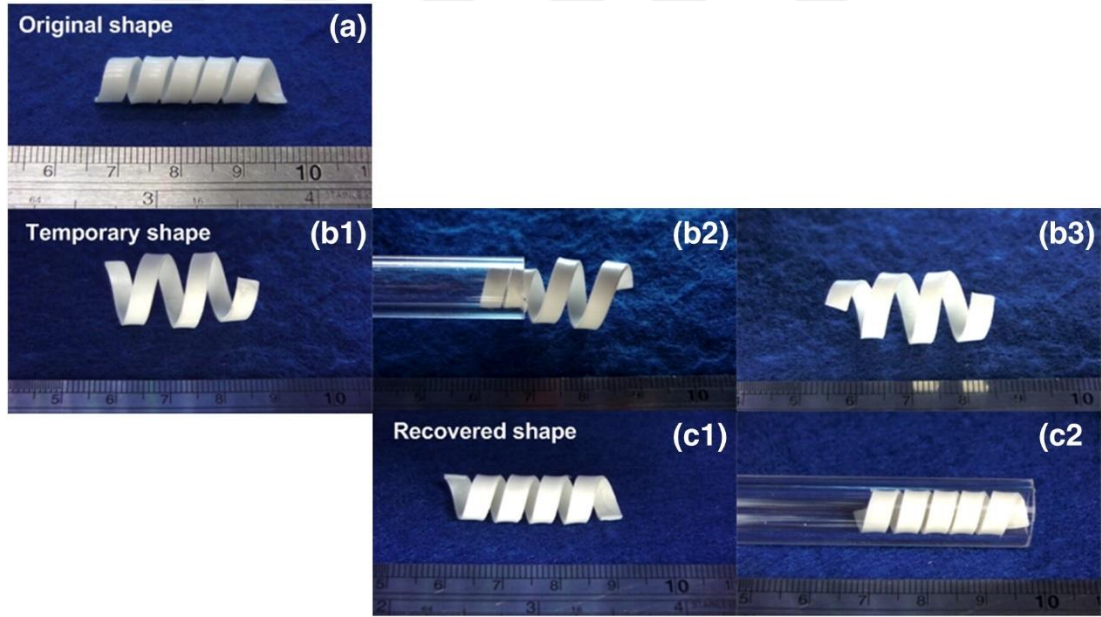
### 2.12.3. Poli Laktik Asit (PLA)

PLA, mekanik özellik profili, termoplastik işlenebilirliği ve biyoyumluluk ve biyobozunabilirlik gibi biyolojik özellikleri sayesinde en ümit verici biyobozunur polimerlerden biridir [185]. PLA lineer alifatik bir poliesterdir, ancak ekstra bir metil grubunun varlığı onu PGA'dan daha hidrofobik hale getirir [186]. Metil yan gruplarının sterik kalkan etkisinden dolayı hidrolize karşı PGA'dan daha dayanıklıdır.

İnce PLA filmlerinin su absorblama kapasitesi yaklaşık %2'dir. Asılı metil grubu bu polimeri daha amorf hale getirir ve çözünürlüğü artırır. Ayrıca, asılı metil grubu, üç farklı PLA formunun oluşumuna katkıda bulunan bir kiral merkez oluşturur. Bunlar (D) PLA, (L) PLA ve (D, L) PLA olarak adlandırılır. PLA genellikle D- veya L-laktik asitin polikondensasyonundan veya laktik asitin siklik bir dimeri olan laktidinin halka açma polimerizasyonu elde edilir [187]. Homopolimer L-laktit (PLLA) bir yarı kristalin polimerdir. Bu malzeme, yüksek mukavemet, uzama ve modüle sahip olduğundan dolayı yük taşıma uygulamaları için daha uygun bir malzemedir. PLA ve türevleri, dioksan, asetonitril, kloroform, metilen klorür, 1,1,2-trikloroetan ve dikloroasetik asit gibi çözügenlerde iyi çözünmesine rağmen, suda, alkollerde (örneğin, metanol, etanol), propilen glikolde ve süstitüe edilmemiş hidrokarbonlarda (örneğin hekzan ve heptan) zayıf çözünürlüğe sahip olduğu bildirilmiştir [188,189].

Yaygın olarak kullanılan tür PLLA'dır. PLLA, homojen hidroliz ile bozunur bozunma ürünü laktik asittir. Bozunma sırasında karboksilik asit monomeri salınır buda pH değerini düşürdüğü için bozunmasını artırır. Bu olaya otokataliz denir. PLLA 12 ayda bozunur. (D, L) PLA'nın bozunma süresi PLLA'dan daha azdır. PLA'nın degradasyon oranı da pH değerine göre değişir [190]. PLA, homopolimerden daha iyi mekanik ve fiziksel özellikler elde etmek için diğer polimerler ile kopolimerize edilir. Bu polimerlerin amorfudur; bu nedenle, bozunma oranları, her bir ko-monomerin miktarına göre değişir [191]. PLA kardiyovasküler uygulamalar ve ilaç salınımı için kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Biyobozunur stentler üzerindeki ilk çalışmalar poli (L-laktik asit) (PLLA) üzerinedir. PLLA biyobozunur stentin ilk polimerik stentleri Stack vd. tarafından dizayn edilmiş ve uygulanmıştır [192]. Bu stent, 9 ay boyunca minimum tromboz, orta derecede neointimal büyüme ve domuz atardamarlarında çok daha az inflamatuvar yanıt ile tamamen bozulmuştur. PLLA iyi bir biyoyumluluğa sahiptir, ancak stentin kırılabilirliği onu yerleştirme işlemini zorlaştırmıştır [193]. PLLA radyolüsendir yani X-ışınlarını geçirir. Bu nedenle tasarım sırasında ve üretim sırasında onu görselleştirmeye yardımcı olabilecek ve daha sonraki tanıya yönelik indikatörler eklenmiştir [194]. İnflamasyon yanıtı PLA stentinin moleküler ağırlığında azalmayla artar [195]. Biyobozunur koroner stentin ilk insan kliniği denemeleri 2000 yılında Igaki-Tamai tarafından araştırılmıştır. PLLA stenti, stentin kendi kendine genişlemesine izin veren ısıtılmış balon kateter kullanılarak yerleştirilmiştir. Sonuçlarda tromboz gözlemlenmemiştir ve restenoz oranı % 10.5 olarak rapor edilmiştir [196]. Abbott vasküler tarafından geliştirilen BVS bir PLLA

ilaç salan stenttir. BVS stent, everolimus ve antiproliferatif ajan içeren bir (D, L) PLA tabakası ile kaplanmıştır. Bu stent koroner damar için yeterli mekaniğe sahiptir ve tromboz olayı göstermemiştir [197]. BRS (Lepu Tıp Teknolojisi (Beijing) Co., Ltd. Çin) tarafından geliştirilen NeoVas rapamisin salan stent, PLLA'dan oluşur ve poli-D, L-laktit (PDLLA) katmanı ile kaplanmıştır. 2015'in sonlarına doğru NeoVas stentleri, 560 stent implantasyonu için ön klinik hazırlıklarını tamamlamıştır [170]. Shanghai MicroPort Medical tarafından bağımsız olarak araştırılan ve geliştirilen Firesorb, biyobozunur stentin ikinci neslidir ve duvar kalınlığı sadece 100–125  $\mu\text{m}$ 'dir. İnce duvar tasarımı, iskele implantasyonundan sonra postoperatif tromboz riskini azaltan hızlı endotelizasyon sağlar. İskelet yapımında daha az malzeme kullanıldığından, bozunma süresi daha da kısalmaktadır. Ayrıca, iskelet hedeflenmiş ilaç salım fonksiyonuna sahiptir. Böylelikle, ilaç sadece kan damarlarına temas edecek, ilaç dozunu azaltan, tedavinin etkinliğini arttıran ve uzun süre vücutta kalan çok miktarda ilaç kalıntısını önleyebilecektir [170]. Şekil 2.6, PLA temelli bir şekil hafızalı polimerik stentin farklı durumlardaki şekil hafıza karakterini göstermektedir.



**Şekil 2.6.** Şekil hafızalı PLA stentinin farklı görüntüleri. (a) Orijinal şekil; (b1) geçici şekil (programlamadan sonra); (b2) tüpten (kateter) dışarı itme; (b3) tamamen konuşlandırılmış; (c1) şekil kazanımı için ısıtmadan sonra; ve (c2) tüpe geri döndükten sonra [198].

#### 2.12.4. Poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL)

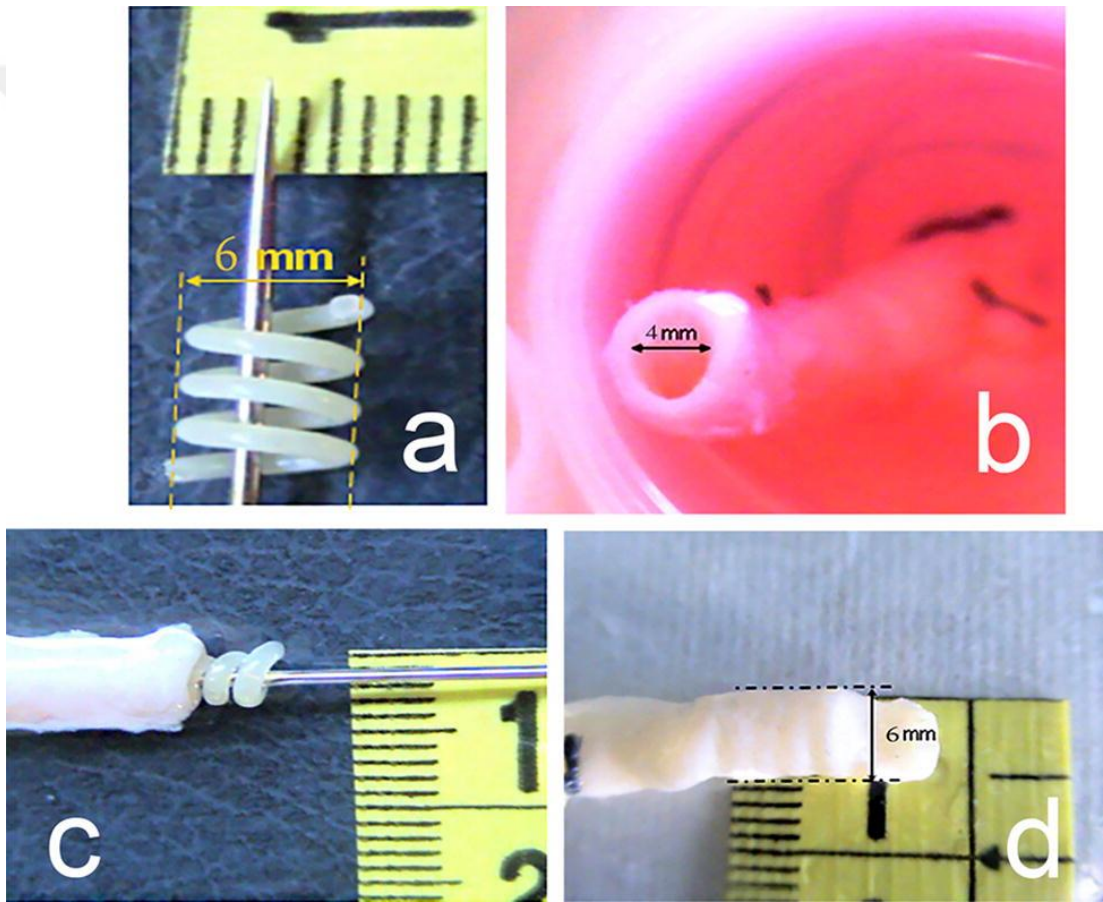
PCL, yarı kristalin, alifatik poliesterdir. PCL'nin kristallenmesi, malzemenin moleküler ağırlığının azalmasıyla artar. PCL, katalizör varlığında siklik alifatik monomer  $\epsilon$ -kaprolaktonun halka açma polimerizasyonu ile sentezlenir. Polimerizasyon sırasında, başlatıcı ve sonlandırıcı olarak düşük moleküllü alkol kullanılır. PCL, tetrahidrofuran, kloroform, metilen klorür, karbon tetraklorür, benzen ve toluen gibi organik çözücüler içinde tamamen, aseton, 2-bütanon, etil asetat, asetonitril ve dimetil fumarat içinde ise kısmen çözünür. PCL bozunması, belirli koşullar altında ester gruplarının rastgele hidrolitik olarak kırılması ile enzimatik olarak gerçekleşir. PCL'nin bozunması PDLA'ya benzer, ancak PDLA'dan üç kat daha yavaş bozunur. PCL, bir otokatalitik bozunma mekanizması ile asidik koşullardan etkilenir ve ayrıca etanol, pentanol, oleik asit, desilamin ve tribütülin gibi küçük moleküllerin eklenmesiyle de etkilenir. PCL aynı zamanda birçok polimer ile faydalı kopolimerler ve blendler de oluşturabilir [199]. Bu kopolimer ve blendler, mekanik, fiziksel, biyoyumluluk ve bozunma süresi gibi istenilen özelliklere göre farklı oranlarda dizayn edilebilir. PCL ayrıca (D, L) PLA ile kopolimer yapabilir.

Peng vd. retina tedavisinde biyobozunur genişletilebilir kendinden kilitlemeli PCL stentleri geliştirmişlerdir (Şekil 2.7) [200]. Biyobozunur PCL stentleri oluşturmak için, PCL bileşenleri ilk önce laboratuvar ölçekli bir mikroenjeksiyon kalıplama makinesi ile üretilmiştir. Bileşenler daha sonra, 6 ve 8 mm çapında ağ benzeri stentler içine monte edilmiştir. Elde edilen PCL stentleri, silikon sünger ile karşılaştırılabilir mekanik özellikler göstermiştir. *In vivo* sonuçlar, genişletilebilir biyobozunur PCL stentlerinin, retina cerrahisinde potansiyel olarak ideal bir biyo materyal olarak hizmet edebileceğini göstermiştir [200].



Şekil 2.7. Retina tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen PCL stenti [200].

Bir başka çalışmada ise Ajili vd. ilk kez, şekil hafızalı stentler için poliüretan (PU)/PCL karışımını kullanmışlardır [201]. Farklı oranlarda monomer içeren malzemeler hazırlanmış ve şekil hafızası davranışları incelenmiştir. PU/PCL (80/20) dışındaki tüm karışımlar şekil hafızası etkileri göstermiş ve en ideal malzeme olarak PU/PCL (70/30) seçilmiştir (Şekil 2.8). Bu çalışmada PU/PCL (70/30) karışımının *in vitro* biyouyumluluğu, insan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, bu malzemenin iyi biyouyumluluk oranına sahip olduğu, hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklediğini göstermiştir. Yazarlar, bu karışımın stent implantı olarak potansiyel bir materyal olabileceğini öne sürmüşlerdir.



Şekil 2.8. PU/PCL (70/30) 'dan yapılan vida stentinin görüntüleri [201]

#### 2.12.5. Poli (orto esterler) (POE)

POE'ler, hidrolitik olarak kararsız, asit duyarlı hidrofobik amorf polimerlerdir [202]. POE I, POE II, vb. gibi dört farklı POE türü vardır. POE I, bir diol ve dietoksi tetrahidrofuran arasındaki transesterifikasyon ile sentezlenir [203]. POE II'nin

bozunma ürünü  $\gamma$ -hidroksibutirik asittir. POE, kloroform, metilen klorür ve dioksan gibi hidrofobikliğinden dolayı organik çözügen içinde kolaylıkla çözülebilir. Bu polimerler termal bozunmaya duyarlıdır ve buna göre işlenir. POE'ler yüzey erozyonu ile heterojen olarak bozunabilir bir polimer sınıfıdır [204]. Bu polimerler sadece yüzeyden malzeme kaybeder ve orijinal geometrik şeklini korur. POEler ilaç taşıma uygulamalarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. POE I'in hidrolizi sırasında karboksilik asit üretilir ve buda aside duyarlı bozunmayı daha da katalize eder [180,205]. Asit ürününü nötralize etmek için genellikle  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  veya  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  gibi bazik tuzlar eklenir, fakat buda difüzyonu engelleyerek ilaç salım oranını sınırlandırabilir [206]. POE II asidik hidroliz ürünleri üretmez ve bozunması asidik veya bazik yardımcı maddelerin ilavesiyle kontrol edilebilir. Asit ilavesi durumunda, suyla beraber asit iyonlaşır ve pH'ı azaltır, daha sonra hidrolizi katalize eder, bu da hidrasyon cephesine ve bozunmaya neden olur. Asidik gruplar ayrıca, polimerizasyon sırasında, polimerin kendisine de entegre edilebilirler [206]. Bu polimerlerin mekanik özellikleri ve termal özellikleri, farklı bileşimlere ve moleküler ağırlıklara sahip başlangıç malzemelerinin seçilmesiyle ayarlanabilir. Bu polimerler ayrıca diğer malzemelerle karıştırılabilir ve daha iyi fiziksel, mekanik özellikler ve bozunma oranı elde etmek için diğer monomerlerle polimerize edilir [170].

### **2.12.6. Poli (3-hidroksibutirat) (PHB)**

PHB, bir enerji depolama molekülü olarak mikroorganizmalar tarafından üretilen bir kristal, termoplastik alifatik poliesterdir [207]. Bu polimerler, belirli bakteriler tarafından enzimatik olarak bozunabilir. Bu polimerler yüksek biyouyumluluk gösterir ve biyobozunurdur. Bu özellikler de onları doku mühendisliği ve ilaç salım uygulamalarında iskelet olarak kullanılmasını sağlar [208,209]. Ancak, PHB homopolimeri çok sert ve kırılğan bir polimerdir. Bundan dolayı, PHB farklı monomerler ile kopolimerleştirilir. PHB'nin poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV), poli 3-hidroksiheksanoat (PHO) gibi birçok farklı kopolimerleri de kemik plakaları, sütürler, perçinler, zımba vidaları, ortopedik pimler ve kemik iliği iskeletleri gibi biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. P(HB-HV)'nin kristallik ve mekanik özellikleri, monomerlerin oranını değiştirerek ayarlanabilir. P(HB-HV)'nin amorf bölgelerin yüzdesi fazla olduğundan dolayı PHB'ye kıyasla daha fazla bozunur. PHB ve kopolimerleri, ester bağlarının hidrolitik bölünmesiyle yüzeyden bozunurlar [210]. PHB'nin bozulması

sırasında D-3-hidroksibutirik asit üretilir buda insan kanında bulunur ve düşük toksisite gösterir [211]. PHB biyobozunur stentler, 30 haftaya kadar Yeni Zelanda beyaz tavşanın arterlerine yerleştirilmiştir. PHB'nin kollajen, tromboz ve stent lümeninde daralma ile birlikte yoğun inflamatuvar ve proliferatif reaksiyon başlattığı saptanmıştır. Bundan dolayı, PHB stentlerinin klinik kullanımlarda yasaklanması sonucuna varılmıştır [212].

### 2.12.7. Polianhidritler

Polianhidritler hidrolitik olarak kararsızdır. Bu polimerler genellikle alifatik, aromatik veya her ikisinin bir kombinasyonudur. Polianhidritler, biyobozunur ve kontrollü salım özellikleri gibi mükemmel avantajlara sahip, kapsamlı olarak incelenen bir biyobozunan polimer grubudur [213]. Diasit veya diasitlerin dehidrasyonu ile polikondenzasyon yoluyla sentezlenir. Bu polimerler, kloroform ve metilen klorit dahil olmak üzere yaygın organik çözücüler içinde çözülebilir ve sulu ortamlara aşırı derecede duyarlıdır. Ayrıca, çok reaktifler ve kontrollü salım için öngörülen ilaçlarda bulunan amin veya diğer nükleofilik gruplarla reaksiyona girebilirler [214]. Polianhidritler de diğer polimerlerle birlikte polimerize edilir veya karıştırılır. Poliimid, yüzey bozunma özellikleri ile daha iyi mekanik özellikler elde etmek için polianhidrit ile kopolimerleştirilmiştir. Poli (anhidrit-ko-359 imidler), ortopedik uygulama için özel olarak tasarlanmıştır [215]. Poli (anhidrid-imitler) önemli ölçüde geliştirilmiş mekanik özelliklere sahiptir. Polianhidritlerin bozunması, iskelet yapılarının seçimine veya kombinasyonuna bağlı olarak günlerden yıllara kadar değişebilir [170]. Polianhidritler esas olarak yüzey erozyonu ile bozunmaktadır. Degradasyon hızı da pH'daki değişikliklere duyarlıdır, genelde artan pH ile artar [216]. Polianhidritlerin mekanik özellikleri genellikle zayıftır ve minimum lif oluşturma yetenekleri ile kırılma eğilimi gösterir. Bu özellikleri arttırmaya yönelik girişimler arasında, fumarik asidin kopolimeri ile çapraz bağlamanın yanı sıra, imit bağları içeren kopolimerlerin oluşturulması bulunmaktadır. Ek olarak, polianhidritlerin *in vivo* biyoyumluluğunun mükemmel olduğu gösterilmiştir [170]. Şu anda poli anhidrit bir stent olan IDEAL™ stent (Bioabsorbable Therapeutics Inc., Menlo Park, CA, ABD) gelişme aşamasındadır. Bu stentte, polianhidrit ester (PAE) polimerik stentine salisilik asit ilave edilmiştir. Salisilik asit ilavesi daha az inflamasyon sağlar. Çıplak metal stentlere kıyasla PAE-salisilik asit polimeri 30 günü takiben anjiyografik restenozu azaltmıştır. Ayrıca, IDEAL™ stenti, Cypher

stentlerine kıyasla gözlenen inflamatuvar yanıtı ve neointimal büyümeyi azaltmıştır. IDEAL stent ilk olarak WISPER çalışmasında değerlendirilmiştir. 11 hastadan oluşan erkek denemelerinde, IDEAL stent yapısal bütünlük sağlamış ve bariz herhangi bir akut veya kronik geri tepme (recoil) göstermemiştir. Ancak yetersiz ilaç dozuna ve hızlı ilaç salınmasından dolayı yetersiz neointimal bastırma nedeniyle, IDEAL stentinin tasarımı revize edilmiştir. IDEAL stentlerin 2. versiyonu (0.155 mm'ye karşı 0.2 mm), daha yüksek dozda sirolimus, daha yavaş ilaç salgılama profili, daha düşük bir çaprazlama profili ve arter duvar kaplamasına daha düşük stent oranı (% 57'ye karşılık % 65) gibi özelliklere sahiptir [170].

#### **2.12.8. Poli (propilen fumarat) (PPF)**

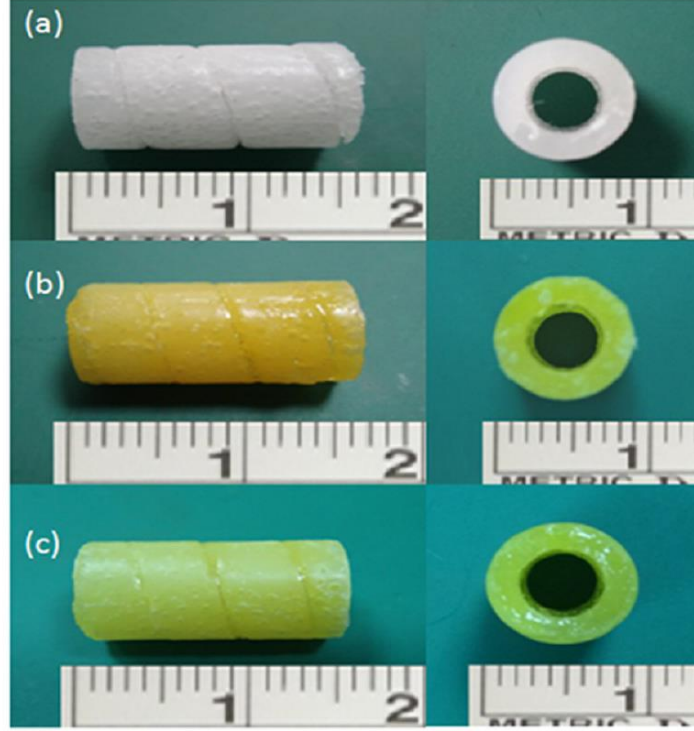
PPF, ortopedik implantlarda yaygın olarak kullanılan biyobozunur bir polimerdir. Plazma genleştiricisi olarak kullanılan, kreb döngüsünün ve propilen glikolün bir bileşeni olan fumarik aside dönüşen lineer bir poliesterdir [217]. PPF, iki aşamada sentezlenir ve ilk aşamada, dietil fumarat, asit katalizörü olarak çinko klorür varlığında hidroksipropil fumarat üretmek için fazla glikol ile reaksiyona girer. PPF'nin, polimer omurgası boyunca doymamış bölgeleri vardır, bu da bir vinil monomeri kullanılarak ek çapraz bağlanmaya izin verir. PPF, fumarat ikili bağı üzerinden çapraz bağlanabilir [218]. PPF düzgün çapraz bağlandığında yüksek mekanik özelliklere sahiptir. PPF, aktif karbon zinciri çiftiyle güçlü bir polimer ağı elde etmek için termal çapraz bağlama veya foto çapraz bağlama ile sertleştirilebilir ve iyileştirilebilir. Çapraz bağlama maddesinin seçimi ayrıca PPF'nin mekanik özelliklerini de etkileyebilir. PPF, ester bağlarının, her ikisi de toksik olmayan ve *in vivo* uyumluluğa sahip propilen glikol ve fumarik asite hidrolizi yoluyla bozunmaktadır [219]. Gıda endüstrisinde gıda katkı maddesinde propilen glikol kullanılmaktadır. Vücut tarafından metabolize edilebilir veya atılabilir [220]. Çapraz bağlı PPF'nin bozunma hızı, PPF polimerinin moleküler ağırlığı, çapraz bağlama maddeleri, ağın çapraz bağlama yoğunluğu, çevresel pH ve PPF bazlı kompozitlerde diğer bileşenlerin varlığı gibi birçok faktöre bağlıdır.

#### **2.12.9. Poli (etilen glikol) (PEG)**

PEG olağandışı çözünürlük davranışını gösteren eşsiz bir polimerdir. Çok hidrofilik olmasının yanı sıra inorganik çözücülerde de çözünür. Aynı zamanda,

kolayca türevlendirilebilecek hidroksil grupları vardır, buda onu birçok farklı reaksiyon türleri için çekici bir molekül haline getirir. PEG, aşırı hidrofilitik olduğundan dolayı hücrelere yapışmaz ve trombojenik değildir. Bu avantajlarından dolayı, biyomedikal implantlarda kullanılmak üzere bir dizi farklı polimerle kovalent olarak bağlanmıştır [102]. Tıbbi uygulamalar için PEG'li birçok farklı kopolimer önerilmiştir. Tıbbi uygulamalar için polieter/kopolimer bazlı malzemeler de çalışılmıştır. Gilding vd. [103], di (2-hidroksietil) tereftalat monomer ve PEG'den antimon trioksit katalizörlüğünde transesterifikasyon yoluyla poli (etilen glikol-etilen tereftalat) sentezlemiştir [104]. PLGA/PEG akrilat kopolimerleri restenozu azaltmak için kan/doku bariyeri olarak çalışılmıştır [106]. 1999 yılında Suggs vd. kardiyovasküler uygulama için P(PF-co-EG) kullanmıştır. PPF, çapraz bağlanabilir parçalanabilir bileşen olarak görev yaparken, PEG ise esneklik, biyoyumluluk ve trombojenik olmayan özellikler kazandırmıştır. Bu materyal, balon anjiyoplasti sonrası restenoz ve trombozun önlenmesi için kullanılmıştır [109].

Yang vd. yaptığı bir çalışmada sıcaklık indüklü şekil hafızalı ilaçlı, biyobozunur PEG-PCL temelli polimerik stentini sentezlemişler ve karakterize etmişlerdir (Şekil 2.9). Sentezlenen polimerin şekil hafıza özelliği polimerlere sonradan eklenen çapraz bağlanmalarla sağlanmıştır. Polimerleri polikondenzasyon metoduyla sentezledikten sonra benzoil peroksitle çapraz bağlama yaparak spiral stent şekline getirmişlerdir. Degradasyon sonuçlarına göre akış koşullarında 4 ayda %50 bozunabilen polimerler elde etmişlerdir. *In vitro* sitotoksosite deneylerine göre de yüksek biyoyumlulukta polimerler elde etmişlerdir. Polimerik olarak biyoyumluluğu ölçülen stentlere curcumin ve mitomisin C ilaçları tutturulmuş ve antromboz ve hSMC proliferasyon inhibisyonu deneyleri gerçekleştirilmiştir. En son *in vivo* damar koşullarını taklit etmek amacıyla bir biyoreaktör sistemi tasarlamışlar ve 60 günün sonunda stentin bütünlüğünü koruduğu ve ani parçalanma gözlenmediği gösterilmiştir [221].



**Şekil 2. 9.** (a) PEG-PCL:6040 şekil hafızalı stentin yandan ve kesit alanının görünümü (b) 1 ve (c) 2 aylık yıkamadan sonra PEG-PCL:6040 stenti [221]

#### 2.12.10. Tirozin türevli polikarbonatlar

Tirozin bazlı polikarbonatlar, ortopedik uygulamalarda kullanılma potansiyeli olan bozunabilir polimerler olarak rapor edilmiştir. Tirozin bazlı psödo-peptid polimerler ilk olarak 1987 yılında Kohn ve Langer tarafından tanıtılmıştır [110]. Desaminotiyosil-tirozinin farklı alkil esterlerinden türetilen tirozin polikarbonatlar kondenzasyon polimerizasyonu ile hazırlanabilir. Aromatik bölgesinden dolayı, bu polimerler iyi mühendislik özellikleri sergilerler ve bu nedenle stent gibi biyomedikal uygulamalar için mekanik olarak yeterli ve biyobozunur bir polimer sınıfı olarak hizmet edebilirler. Tirozin türevli polikarbonatlar mukavemet 50–70 MPa, sertlik 1–2 GPa ve cam geçiş sıcaklıkları 50 °C–90 °C gibi özelliklere sahiptir. Bu özellikler, asılı alkil zincir grupları [111] değiştirilerek kolayca uyarlanabilir. Bu şekilde üretilen tüm bu polimerler şekilsizdir [111], hidrofobiktir ve fizyolojik sıcaklıkta yavaş hidrolitik bozunma gösterirler. Bu polimerler üç potansiyel olarak hidrolize olabilir bağ içerir: amid, karbonat ve ester. Yapılan çalışmalar, karbonat grubunun, asılı zincir ester bağından [112] daha hızlı bir oranda hidrolize olduğunu ve amid bağının *in vitro* olarak kararsız olduğunu göstermiştir [113]. Karbonat gruplarının hidroliz ürünü iki tanedir; alkoller ve karbon dioksit.

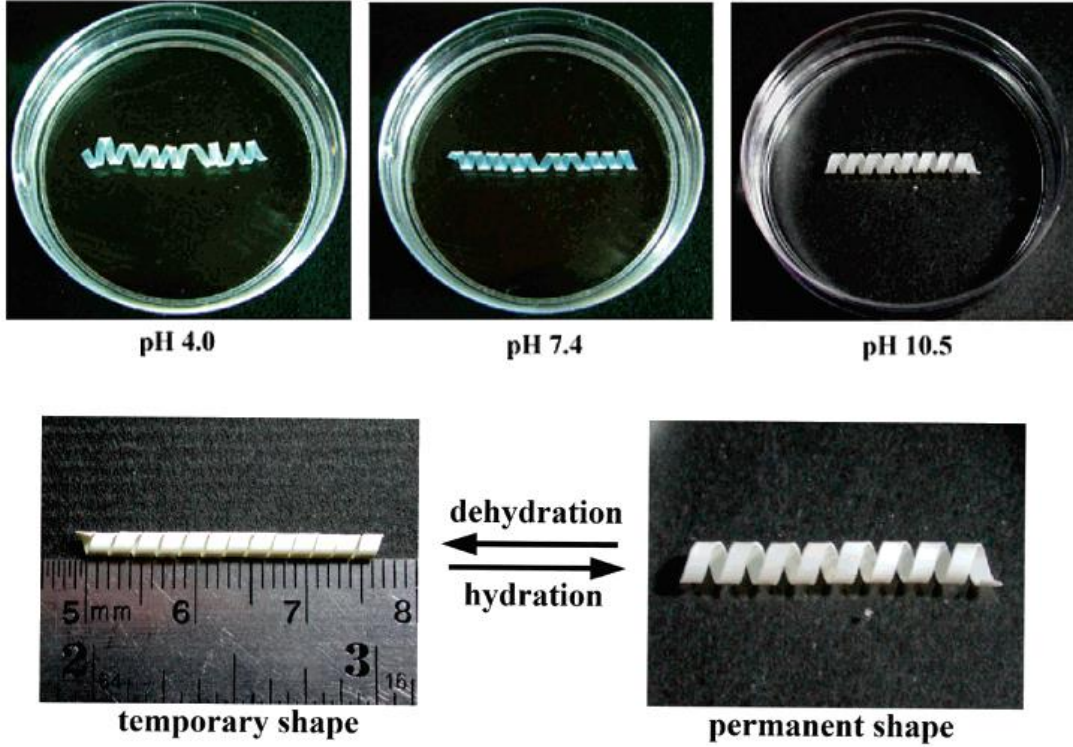
Asılı R grubunun yapısının değişmesiyle, farklı mekanik, bozunma oranları ve ayrıca hücrel tepkime özelliklere sahip olan polimerler hazırlanabilir. Bir etil ester grubu ile polikarbonatın, güçlü bir şekilde osteokondüktif olduğu ve stent uygulaması gibi biyomedikal implantlar için yeterli mekanik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [114]. PLLA ve tirozin türevli karbonatların şişme özelliği onların arasındaki önemli bir farklılıktır. Tirozin türevli polimerler, bozunmanın son aşamalarında bile %5'ten fazla su emmezler. Tirozin türevli polimerler, şekillerini daha uzun bir süre boyunca sürdürebilmektedir. PLLA'ya kıyasla tirozin türevli karbonatın bozunma ürünlerinin düşük asitliği bir başka önemli fayda sağlar. Poli (desaminotiyosil-tirosin etil ester) [115] (nihai gerilme mukavemeti:230 MPa ve Young modülü: 3.1 GPa) ile PLLA'dan daha iyi mekanik özelliklere sahip olan yüksek mukavemetli lifler oluşturabilir. Özel tirozin karbonat karışım sistemleri, her biri araştırma ve geliştirme aşamasındadır ve doku mühendisliği uygulamalarının nihai adayları olarak kullanılmak üzere farklı hücrel yanıtlara sahiptir [116]. REVA Medical, REVA stentinde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir tirozin türevli poli karbonat sürümü geliştirmiştir [35]. REVA Medical sürgü ve kilitleme (slide-and-lock) teknolojisi, stent yapısının önemli ölçüde deformasyonu olmaksızın kullanıma izin veren oldukça yeni bir stent tasarımıdır. REVA'nın stent tasarımı, stent ticarileştirmeye açık bir yol sunan, oldukça belirgin bir fikri mülkiyet ürünüdür [38]. *In vivo* çalışmalar, sürgü ve kilit tasarımı olan stentlerin poli (DTE karbonat) yapılabildiğini ve standart balon operasyonu kullanarak femoral ve koroner domuz arterlerine başarılı bir şekilde implante edilebildiğini göstermiştir. Poli (DTE karbonat) stentlerin 28 gün boyunca domuz arterlerinde kalması, doku/materyal ara yüzeyinde normal bir iyileşme tepkisi göstermiştir ve akut ve/veya kronik inflamasyon olmadığı rapor edilmiştir. Ayrıca, poli (DTE karbonat) içeren anti-restenoz ilaç salım çalışmaları, bu polimerin vasküler uygulamalar için önemli bir potansiyeli olduğunu göstermiştir. REVA stenti ilk olarak RESORB çalışmasında değerlendirilmiştir. 27 hastanın katıldığı bir ilk çalışmada, REVA stentinin implanttaki lezyonları başarılı bir şekilde düzelttiği ve damar daralmasında azalma sağlanmıştır. [117]. Ancak, 6 ve 12 aylık izlemde, tirozin türevli polimerin klinik yüklemeye direnç gösterememesi nedeniyle beklenen hedef-lezyon revaskülarizasyon oranından (6 ay: %60; 12 ay: %67) daha yüksek olduğu bildirilmiş ve 6 ayda neointimal hiperplazi görülmüştür. Revaskülarizasyon prosedürleri sırasında implante edilen yüzeylerin operasyon sonrasında hızlı bir şekilde neointimal hücreler ile kaplanması önemlidir. Hızlı

çoğalma özelliği gösteren bu hücrelerin dikey planda prolifer olmaları “neointimal hiperplazi” olarak adlandırılır ve uzun dönemde stenoza neden olması nedeniyle istenmeyen bir reaksiyondur. RESORB çalışmasının sonuçlarından sonra RVEA stenti, ReZolve stentinin (REVA Medical Inc.) gelişmesine yol açan yeni bir stent tasarlamıştır [118].

#### **2.12.11. Kitosan**

Bir kitin türevi olan CHI, rastgele konumlandırılmış D-glukozamin ve N-asetilglukozamin birimlerinden oluşan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. CHI'nın işlenebilirliği ve çok yönlülüğü nedeniyle, geniş bir biyomedikal uygulama yelpazesinde kullanılmıştır. CHI su emici, oksijeni geçirgen ve hemostatik olduğu için, son 20 yıl içerisinde yoğun bir şekilde yara örtüsü materyali olarak çalışılmıştır. Ayrıca, CHI yara iyileşmesinin hızlanmasına yol açan biyobozunur birçok polimerden çok daha biyoaktiftir. CHI'nın kendine özgü antibakteriyel özelliği ve bozunma ürünü olan N-asetilglukozamin (dermal dokunun ana bileşeni) yaranın hızlı bir şekilde iyileşmesine yardımcı olur. CHI'nın mekanik olarak zayıf olduğu için, genellikle daha güçlü film, membran, sünger, parçacık, lif ve jel formunda biyomalzemeler oluşturmak için PLA, PLGA, PEG, kollajen ve aljinat gibi diğer parçalanabilir polimerler ile çapraz bağlanır veya birleştirilir [222].

Örneğin, Chen vd. CHI molekülüne GLY ve PEG katkılayarak biyobozunur şekil hafızalı stent tasarımı yapmışlardır. Moleküllere epoksi bileşenlerle çapraz bağlama yaparak şekil hafıza özelliği sağlamışlar ve farklı pH'ların çapraz bağlama üzerine etkilerini incelemişlerdir (Şekil 2. 10). Sentezlenen polimerin şekil hafıza özelliği hidrasyonla sağlandığı için esneme oranları örneklerin PBS ile ıslatılması sonucu çapın artmasıyla ölçülmüştür. Lizozim indüklü degradasyon testinde örnekler 10 hafta sonunda alınmış, ninhidrin yöntemiyle bozunma oranı hesaplanmış ve malzemelerin SEM görüntüleri çekilmiştir. Hayvan çalışmalarını ise tavşanların abdominal aorta bölgesine stentleri implante ederek gerçekleştirmişlerdir. Hazırlanan bu stentlerin metallare alternatif olarak ilaç salan stentler olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [223].



**Şekil 2. 10.** CHI-GLY-PEG biyobozunur stentlerinin farklı pH'larda şekil hafıza karakteri ve şişme görüntüsü [223]

### 2.13. Ticari Biyobozunur Polimerik Stentler

Biyobozunur stent teknolojisi hem akademi hem de endüstride önemli bir hale gelmiştir. Son yıllarda kalıcı stentlerin tromboz ve alerjik reaksiyon gibi bazı olumsuzlukları meydana getirmesinden dolayı biyobozunur stentlere olan ilgi artmıştır. Kalıcı stentler genellikle metal ve polimerik temellidir. Organizmada zamanla bozunmazlar, dolayısıyla tedavi süreci bittikten sonra bile kalırlar. Bu durum tromboz riskini çok yükseltmektedir. Dolayısıyla kalıcı stentlerde çok uzun süre ek olarak antirombosit tedavilerinin yapılması gerekmektedir. Ayrıca 7 ila 10 yıl içinde stentin etrafında inflamasyon ve damar dokusunda biyoyumsuzluk oluşturabilme riskleri mevcuttur. Biyobozunur stentler zamanla dokudan uzaklaştıkları için restenoz oluşturma riski oldukça düşüktür. Ayrıca bazı hastalarla yapılan araştırmaya göre de kalıcı implantın sürekli olarak organizmada bulunmasının psikolojik olarak hastaları etkilediği belirtilmiştir. Kalıcı stentlerin böyle olumsuzluklarının önüne geçebilmek için alternatif olarak biyoemilebilir stentler geliştirilmektedir. Biyobozunur stentlerin geliştirilmesinin arkasındaki fikir kısa süreli tedavilerde damar dokusuna iskele görevi

yapması ve hatta tromboz ve restenoz riskini ortadan kaldırmak için ilaç salabilmesidir. Böyle stentlerde zamanla stent bozunur ve yeni bir cerrahi müdahaleye gerek duyulmadan yerini damarın doğal yapısına bırakır, dolayısıyla stent ortadan kalkınca tromboz riski de kalkar ve uzun süreli ek bir antitrombosit tedavisine gerek kalmaz. İlaçlı biyobozunur stentler antiproliferatif ajanları da salabildiğinden restenoz riskini de elimine eder ve böylece kalıcı stentlerin dezavantajlarını da ortadan kaldırır. Şu an, ticari olarak kullanılan biyobozunur polimerik stentler Şekil 2.11.'de şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 2.11.** Klinik veya prelinik kullanımda olan ticari biyobozunur stentlerin tasarımı [224]

### 2.13.1. Igaki-Tamai stent

Igaki-Tamai stenti (Kyoto Medical Planning Co., Ltd., Kyoto, Japonya), insanlarda kullanılan PLLA bazlı, ilaçsız, ve termal olarak kendi kendini genişletebilen ilk biyobozunur stenttir [181]. *In vivo* olarak tamamen bozunması 18-24 ay sürmektedir. Bu stentin etkinliğini inceleyen bir pilot çalışmada (15 hasta, 19 lezyon, 25 stent), 30 günlük süre içinde önemli olumsuz kardiyak olaylar veya stent trombozu olmadığını ve 6 aylık takipte sadece bir tane tekrar PCI olduğu

gözlemlenmiştir. Özellikle, intravasküler ultrasonda belirgin bir neo-intimal hiperplazi görülmemiştir. İntravasküler ultrason ayrıca 1. günde anlamlı bir stent geri tepkisi olmadığını, ancak implantasyondan 3 ay sonra stent genişlemesine ait kanıt olduğunu göstermiştir.

### **2.13.2. Poli karbonat stent: REVA**

REVA iyodine edilmiş desaminotirozintosisinden oluşan bir poli (iyodine edilmiş desamino tirozintosisin etil ester) karbonat stentidir. Bozunduktan sonra, Krebs döngüsünün son ürünleri olan su, karbon dioksit, etanol ve iyodine edilmiş aminotirozintosisin oluşur ve vücuttan böylelikle atılır. REVA stenti anti-proliferatif ilaç kaplamaya sahip değildir ve biyobozunurluk süresi yaklaşık 36 aydır. Sürgü ve kilitleme tasarımı, stentin açılması sırasında polimerin deformasyonunu ve zayıflamasını önlemiştir. REVA iskelesinin radyal direncinin büyük olduğu bildirilmiştir [224]. De novo lezyonları olan 27 hastanın kaydedildiği RESORB çalışmasında, REVA stentinin implantasyonu sonrasında lümen çapı ve damar büzülmesinde tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. İmplantasyon öncesi çap darlığı %70 iken implantasyon sonrasında %5.9 olarak kaydedilmiştir. İmplantasyon öncesi ve implantasyon sonrası lümen çapı sırasıyla  $0.88 \pm 0.39$  mm ve  $2.76 \pm 0.36$  mm olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlara rağmen, 6 aylık takipte geç lümen kaybı 1.81 mm ve hedef lezyon revaskülarizasyonu %66.7 idi. Bu durum, neo-intimal hiperplazi yanıtının metal stentlere göre benzerdir [224]. Bu bulgulardan sonra, ikinci nesil ReZolve stenti sert radyoopak bir polimerle spiral sürgü ve kilit mekanizmasına göre yeniden tasarlandı ve ayrıca antiproliferatif bir ilaç olan sirolimus ile kaplandı. RESTORE çalışmasında, 12 aylık takipte 50 hasta ile akut geri tepme  $\%3.8 \pm 6.7$ , geç lümen kaybı ise  $0.29 \pm 0.33$  mm olarak belirtilmiştir. 6 ayda 12 hastada 2 tane önemli olumsuz kardiyak olaylar gözlemlenmiştir [224].

### **2.13.3. Poli salisilik asit stent: IDEAL BRS**

IDEAL BRS, salisilik asit ve sebasik asitin polimeri ile karıştırılmış bir polilaktit anhidritinden oluşan bir omurgaya sahiptir. Bu stent, antiproliferatif bir ilaç olan sirolimusun salınmasını kontrol eden salisilat ile kaplanmıştır ( $8.3 \mu/\text{mm}$ ). Böylece stent hem antiinflamatuvar hem de antiproliferatif özelliklere sahip olmuştur [225]. IDEAL BRS öncelikle 2009'da (11 hasta) insanlarda test edilmiştir. Bu ilk deneyde,

sirolimusun doz salım kinetiği ile ilgili problemlerle ilişkili olan ihmal edilebilir neointimal bastırma ve lümen bölgesinde belirgin bir azalma olmuştur. Yeni nesil IDEAL BioStenti, sirolimusun doz salım kinetiğinin optimize edilmesinin yanı sıra, sirolimusunun salımına yardımcı olmak için daha düşük bir profille tasarlanmıştır. IDEAL BioStent cihazının prelinik çalışmaları devam etmektedir [224].

#### 2.14. Tez Çalışmasının Amacı

PEG-ASNaz'ın şu anki kullanım şekli ALL hastalığının kapsamlı tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Buna ilaveten L-ASNaz üretiminde ülkemiz dışa bağımlı olup bu enzimin pahalı olması nedeniyle hem hastalar hem de ülkemiz açısından ALL tedavisi büyük bir maliyet doğurmaktadır. Tüm bu dezavantajların önüne geçebilmek için yeni bir formülasyona ihtiyaç olduğu aşikârdır. Bu noktada tez çalışmamız ALL hastalığının tedavisi için L-ASNaz içeren biyobozunur şekil hafızalı stent formülasyonunun oluşturulmasını hedeflemiştir. Hâlihazırda damar tıkanıklığının giderilmesinde kullanılan biyobozunur polimerik stentlerin, ilk defa bizim tarafımızdan L-ASNaz enzim taşıyıcısı olarak kullanılacak olması tezimizin özgünlüğündeki temel noktadır.

Tez kapsamında öncelikle L-ASNaz enzimini taşıyabilecek, biyoyumlu ve biyobozunur ko-polimerik stent tasarımları CHI/GLY/PEG, CHI/GLY/PPG ve CHI/GLY/PVA içerecek şekilde farklı kombinasyonlarda hazırlanacaktır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak ve biyoyumluluğu arttırmak için sodyum tripolifosfat (TPP) kullanılarak şekil hafıza özelliğine sahip stent formu kazandırılacaktır. Yapısal ve termal olarak karakterize edilen formülasyonların hidrofilik/hidrofobik karakterini belirlemek için ise sıvı temas açısı, şişme testi, su tutma kapasitesi, gaz geçirgenliği ve *in vitro* biyobozunurluk ölçümleri gerçekleştirilecektir. Formülasyonlara L-ASNaz immobilizasyonu hazırlanma sırasında *in situ* olarak gerçekleştirilecek ve en uygun immobilizasyon şartları belirlenecektir. Bu aşamadan sonra seçilen 3 formülasyona mekanik testler ve *in vitro* biyoyumluluk açısından karakterizasyon işlemleri yapılacaktır. Son olarak seçilen bu 3 formülasyon için damar akış koşullarını taklit ettiğimiz biyoreaktör sisteminde zamana karşı kararlılıkları ve kullanılabilirlikleri test edilecektir.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmaksızın kullanılmıştır. Kullanılan bu kimyasalların üretici firması ve bazı özellikleri Tablo 3.1’de verilmiştir. Ayrıca, çalışma kapsamında hazırlanan tüm sulu çözeltiler Tip I denilen ultra saf su kullanılarak hazırlanmıştır.

**Tablo 3.1.** Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

Malzeme	Özellikler	Üretici Firma
Asetik asit	Glasiyal, $\geq\%99.85$	Sigma-Aldrich, USA
Civa (II) iyodür	$\geq\%99.0$	Sigma, USA
di-potasyum hidrojenfosfat	$\geq\%99.0$	Merck, USA
Gliserol (GLY)	$\geq\%99.5$ , $d=1,26 \text{ g/cm}^3$	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol	$\geq\%97.0$	Sigma-Aldrich, USA
Kitosan (CHI)	Orta molekül ağırlıklı ve $\%75-85$ deasetillenmiş	Aldrich, USA
L-Asn	$\geq\%98$	Sigma, USA
L-ASNaz	$\geq\%96$ , <i>E. coli</i> ASI.357’den izole edilmiş	ProSpec
Poli(etilen glikol) (PEG)	$M_w=10.000 \text{ g/mol}$	Merck, USA
Poli(propilen glikol) (PPG)	$M_w= \sim 4.000 \text{ g/mol}$	Aldrich, USA
Poli(vinil alkol) (PVA)	$M_w=9.000-10.000 \text{ g/mol}$ , $\%80$ hidrolize edilmiş	Aldrich, USA
Potasyum dihidrojenfosfat	$\geq\%99.0$	Merck, USA
Potasyum iyodür	$\geq\%99.5$	Merck, USA
Sodyum hidroksit	$\geq\%97.0$	Merck, USA
Sodyum klorür	$\geq\%99.0$	Merck, USA
Sodyum tripolifosfat (TPP)	$\geq\%99.0$	Merck, USA

Sodyum sitrat	≥99.5%	Sigma-Aldrich, USA
Trikloroasetik asit (TCA)	≥%99.0	Sigma-Aldrich, USA
Tris-HCl	≥%99.0	Sigma, USA
BSA	≥%99.0	Sigma, USA
Fibrinojen	≥%99.0	Sigma, USA
DMEM		PAN-Biotech
MTT	%98	Sigma-Aldrich, USA
DMSO	%≥99.9	Sigma-Aldrich, USA
SDS	%≥99.0	Sigma-Aldrich, USA
<i>o</i> - fitalaldehit	%98	ACROS Organics

### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazların listesi Tablo 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Tez kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz	Bulunduğu Kurum/Kuruluş
FTIR/ATR Spektrofotometre (Perkin Elmer)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Termogravimetrik Analiz (TGA, Shimadzu, Model TGA-50)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Diferansiyel Termal Analiz (DTA, Shimadzu, Model DTA-50)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC, Shimadzu, Model DSC-60)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
ELİSA Plate Okuyucu (BioTek)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Sıvı Temas Açısı Ölçüm Cihazı (SEO Phoenix 300)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Su Banyosu (WiseBath)	İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Nüve, NF 800 R)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Orbital Karıştırıcı (Daihan, SHO-1 d)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Vorteks (Daihan, VM-10)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Vakum Etüvü (Nüve, EV 018)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Peristaltik Pompa (ShenChen, LabN6)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı (Daihan, HP-LP1)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Elektronik terazi (Shimadzu ATX224)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, LEO, EVO 40 XVP)	İnönü Üniversitesi	Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi (İBTAM)
Enerji Dağılımı X- Işını Spektroskopisi (EDX)	İnönü Üniversitesi	Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi (İBTAM)
X-ışını kırınım (XRD, Rigaku, Rad B-Dmax II)	İnönü Üniversitesi	Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi (İBTAM)
Millipore Ultrasaf Su Cihazı	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
CO <sub>2</sub> Etüv (Esco)	İnönü Üniversitesi	Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

### 3.3. CHI/GLY/PEG Hidrojellerinin Hazırlanması

CHI/GLY/PEG hidrojellerini hazırlamak için Chen vd. tarafından yayınlanan bir makalede kullanılan prosedürden yararlanılmıştır [223]. Öncelikle, %2'lik (w/v) CHI çözeltisi için, 0.3 g CHI tartılmış ve %1'lik (v/v) asetik asit içeren deiyonize sulu çözeltide çözülerek hazırlanmıştır. CHI çözeltisi, 60 dakika boyunca oda sıcaklığında 1500 rpm'de karıştırılmıştır. Sonra, jöle kıvamındaki CHI çözeltisinden, fazla asetik asidi (son pH: 6.0-7.0) uzaklaştırmak için birkaç kez su değişimi ile 12 saat deiyonize suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen berrak CHI çözeltisine elde

edilecek filmlerin esnekliklerini sağlayabilmek için, plastikleştirici olarak sabit oranda GLY (% w/v) eklenmiş ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca 1500 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra nihai formülasyonu hazırlamak için sırasıyla 0.2, 0.6, 1.0, 2.0 ve 4.0 (%w/v) oranlarında PEG 10.000 CHI çözeltilerine eklenmiş (Tablo 3.3) ve oda sıcaklığında 24 saat boyunca 1500 rpm'de karıştırılmıştır. Elde edilen karışımlar daha sonra teflon plakalar üzerine dökülmüş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan filmler plakalardan dikkatlice kaldırılmış ve ileriki analizler için saklanmıştır.

**Tablo 3.3.** CHI/GLY/PEG hidrojellerinin hazırlanmasında kullanılan monomerlerin oranı ve örnek kodları

<b>Numune Kodu</b>	<b>CHI (%w/v)</b>	<b>GLY (%v/v)</b>	<b>PEG (%w/v)</b>
CHI	2.0	-	-
CHI/GLY	2.0	0.5	-
CHI/GLY/PEG-1	2.0	0.5	0.2
CHI/GLY/PEG-2	2.0	0.5	0.6
CHI/GLY/PEG-3	2.0	0.5	1.0
CHI/GLY/PEG-4	2.0	0.5	2.0
CHI/GLY/PEG-5	2.0	0.5	4.0

#### **3.4. CHI/GLY/PPG Hidrojellerinin Hazırlanması**

CHI/GLY/PPG hidrojellerinin hazırlanması için 3.3 başlığında detayları verilen yöntem kullanılmıştır (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4.** CHI/GLY/PPG hidrojenlerinin hazırlanmasında kullanılan monomerlerin oranı ve örnek kodları

<b>Numune Kodu</b>	<b>CHI</b> (%w/v)	<b>GLY</b> (%v/v)	<b>PPG</b> (%w/v)
CHI	2.0	-	-
CHI/GLY	2.0	0.5	-
CHI/GLY/PPG-1	2.0	0.5	0.2
CHI/GLY/PPG-2	2.0	0.5	0.6
CHI/GLY/PPG-3	2.0	0.5	1.0
CHI/GLY/PPG-4	2.0	0.5	2.0
CHI/GLY/PPG-5	2.0	0.5	4.0

### 3.5. CHI/GLY/PVA Hidrojellerinin Hazırlanması

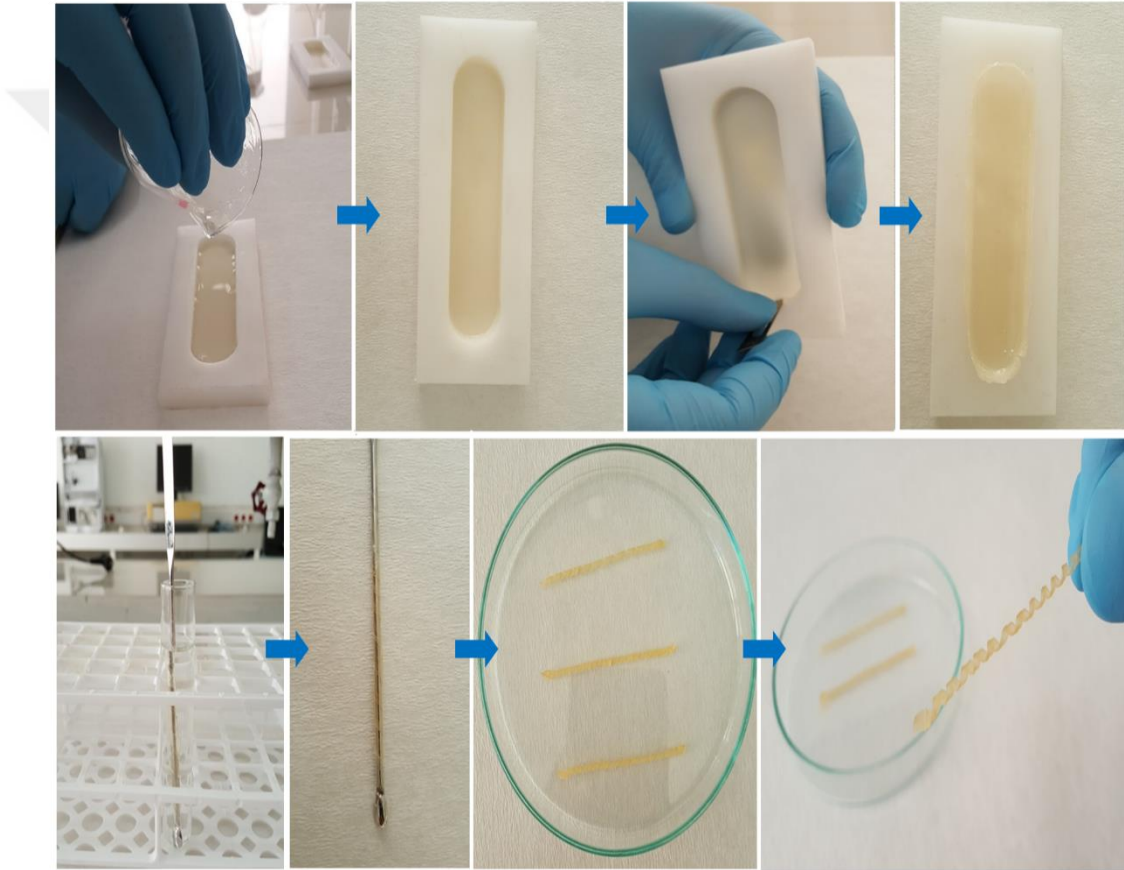
CHI/GLY/PVA hidrojenlerinin hazırlanması için 3.3 başlığında detayları verilen yöntem kullanılmıştır (Tablo 3.5).

**Tablo 3.5.** CHI/GLY/PVA hidrojenlerinin hazırlanmasında kullanılan monomerlerin oranı ve örnek kodları

<b>Numune Kodu</b>	<b>CHI</b> (%w/v)	<b>GLY</b> (%v/v)	<b>PVA</b> (%w/v)
CHI	2.0	-	-
CHI/GLY	2.0	0.5	-
CHI/GLY/PVA-1	2.0	0.5	0.2
CHI/GLY/PVA-2	2.0	0.5	0.6
CHI/GLY/PVA-3	2.0	0.5	1.0
CHI/GLY/PVA-4	2.0	0.5	2.0
CHI/GLY/PVA-5	2.0	0.5	4.0

### 3.6. Şekil Hafızalı Stentlerin Hazırlanması

Çalışma kapsamında hazırlanan CHI temelli hidrojellere şekil hafıza karakterini kazandırmak için çapraz bağlayıcı olarak TPP kullanılmıştır. Hazırlanan filmler 1 cm genişliğinde ve 10 cm uzunluğunda kesilerek çelik bir çubuğa spiral şeklinde sarılmıştır. Çubuklar konsantrasyonu belli TPP çözeltisine daldırılmış ve belli bir süre inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu stent görünümlü malzemeler çubuktan dikkatli bir şekilde alınmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sonucu şekil hafıza özelliği kazandırılmış olan CHI temelli stentler karakterizasyon için oda koşullarında depolanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. CHI temelli şekil hafızalı biyobozunur stent formülasyonlarının hazırlanma aşamaları

### 3.7. Hazırlanan Şekil Hafızalı Stentlerin Karakterizasyonu

#### 3.7.1. FTIR analizi

Hazırlanan tüm örneklerin yapısal olarak karakterizasyonunu sağlamak için Perkin Elmer marka FTIR/ATR kullanılmıştır. 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında FTIR spektrumları alınmıştır.

### 3.7.2. Termal analiz

Hazırlanan tüm örneklerin termal özelliklerini incelemek için Termogravimetrik Analiz (TGA, Shimadzu marka TGA-50), Diferansiyel Termal Analiz (DTA, Shimadzu marka DTA-50) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC, Shimadzu marka DSC-60) cihazları kullanılmıştır. Örneklerin (~10 mg) TGA ve DTA analizleri, 10 °C dk<sup>-1</sup> ısıtma hızıyla 25 ile 700 °C aralığında, DSC analizleri ise 10 °C dk<sup>-1</sup> ısıtma hızıyla 25 ile 500 °C aralığında hava ortamında gerçekleştirilmiştir.

### 3.7.3. Sıvı temas açısı ölçümleri

Şekil hafızalı stentlerin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin (PEG, PPG ve PVA) stentlerin hidrofobiklik-hidrofiliklik özelliğini nasıl değiştirdiğini belirlemek amacıyla hazırlanan filmlerin sıvı temas açıları gonyometreyle belirlenmiştir. Filmler üzerine deiyonize distile su damlacıkları koyulduktan hemen sonra oda sıcaklığında sıvı temas açısı ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 3 paralel örnek kullanılmış ve en az 6 ölçüm elde edilmiştir. Her örnek için ortalama sıvı temas açısı değerleri hesaplanmıştır.

### 3.7.4. Dinamik şişme ve su tutma kapasitesi testleri

Hazırlanan örneklerin dinamik şişme ve su tutma kapasitesi deneyleri, 37 °C sabit sıcaklıktaki etüv içerisinde, fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) kullanılarak, 3 mm çapında ve 10 mm uzunluğundaki 3 paralel örnek ile yürütülmüştür. Hidrojeller, kuru ağırlıkları kaydedildikten sonra 5 ml PBS içeren beherler içerisine daldırılarak şişme deneyleri başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında ortamdan alınan hidrojeller, yüzeyleri hafif bir şekilde kâğıt havlu ile kurularak tartılmış ve tekrar şişme ortamına konulmuştur. Bu işleme hidrojellerin maksimum veya denge şişme oranına ulaşmaya kadar devam edilmiştir. Hidrojellerin şişme değerleri Eşitlik 3.1, su tutma kapasitesi ise Eşitlik 3.2 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \left[ \frac{(W_s - W_d)}{W_d} \right] \times 100 \quad (3.1)$$

$$\text{Su tutma kapasitesi (\%)} = \left[ \frac{(W_s - W_d)}{W_s} \right] \times 100 \quad (3.2)$$

$W_s$ : Şişmiş örneğin ağırlığı

$W_d$ : Kuru örneğin ağırlığı

### 3.7.5. Oksijen geçirgenliği

Vücutta kullanılmak üzere tasarlanan biyomalzemelerin yüksek O<sub>2</sub> geçirgenliğine sahip olması istenir. Bundan dolayı hazırlanan hidrojelilerin O<sub>2</sub> geçirgenliği Morgan ve Efron [226] tarafından rapor edilen eşitliğe (Eşitlik 3.3) göre hesaplanmıştır. O<sub>2</sub> hidrojelden ziyade suyla kolaylıkla difüze olabilir. Bundan dolayı su tutma kapasitesi ve O<sub>2</sub> geçirgenliği doğru orantılıdır. O<sub>2</sub> geçirgenliği Dk değeri ile belirtilir.

$$Dk = 1.67xe^{0,0397WC} \quad (3.3)$$

'D' örneğin difüzivitesi, 'k' örnekteki O<sub>2</sub> çözünürlüğüdür. WC ise % su tutma kapasitesi değeridir.

### 3.7.6. *In vitro* biyobozunurluk testi

Hazırlanan hidrojelilerin *in vitro* hidrolitik bozunma deneyleri sabit sıcaklıkta (37 °C) ve fosfat tamponu (pH=7.4) içerisinde yürütülmüştür. Hazırlanan stentlerin kuru ağırlıkları (A<sub>0</sub>) tartıldıktan sonra 5 mL'lik taze fosfat tampon ortamına yerleştirilerek, 37 °C'deki etüve konulmuştur. 1., 2., 3., ve 4. haftalarda örnekler alınmış filtrasyon yardımıyla tampon uzaklaştırılmış ve örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Tamamen kuruyan örnekler tekrar tartılmış (A<sub>1</sub>) ve değerler kaydedilmiştir. Böylece hazırlanan stentlerin bir ay süresince kütle kayıpları saptanmıştır. Kütle kayıpları Eşitlik 3.4 kullanılarak belirlenmiştir.

$$KK (\%) = \left[ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

KK: Kütle kaybı

A<sub>0</sub>: Örneğin ilk ağırlığı

A<sub>1</sub>: Örneğin son ağırlığı

## 3.8. L-ASNaz İçeren Şekil Hafızalı Stent Formülasyonlarının Hazırlanması

L-ASNaz içeren şekil hafızalı stent formülasyonlarının hazırlanması için CHI/GLY/PEG, CHI/GLY/PPG ve CHI/GLY/PVA hidrojelileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hidrojellere L-ASNaz enzimi eklenmiş ve daha önce belirlenen optimum koşullar kullanılarak (hidrojel oranı, immobilizasyon süresi, çapraz bağlayıcı oranı ve çapraz bağlama süresi) 4 °C'de 200 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan

sonra, elde edilen karışım daha sonra teflon plakalar üzerine dökülmüş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. L-ASNaz içeren filmler plakalardan dikkatlice kaldırılmış ve şekil hafıza karakteri kazandırılarak L-ASNaz içeren şekil hafızalı stent formülasyonları hazırlanmıştır. Bu formülasyonlar ileriki analizler için 4 °C’de saklanmıştır.

### **3.9. L-ASNaz-Stent Formülasyonlarının Karakterizasyonu**

#### **3.9.1. FTIR analizi**

Hazırlanan L-ASNaz-stent formülasyonlarının yapısal olarak karakterizasyonunu sağlamak ve enzimin varlığını kanıtlamak için Perkin Elmer marka FTIR/ATR kullanılmıştır. 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında FTIR spektrumları alınmıştır.

#### **3.9.2. XRD analizi**

Numunelerin kristal fazları, XRD cihazı (Rigaku RadBDmax X ışını difraktometresi) ile 2–80 ° arası, saniyede 0.02 ° boyutunda Cu K $\alpha$  radyasyonu kullanılarak analiz edilmiştir.

#### **3.9.3. SEM ve EDX analizi**

Bu çalışmada hazırlanan filmlerin yüzey morfolojisi hakkında bilgi edinebilmek amacıyla SEM görüntüleri çekilmiştir. SEM görüntülerinin çekiminde İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi (İBTAM)’da bulunan LEO, EVO 40 XVP cihazı kullanılmıştır. EDX analizi ise SEM cihazına entegre edilen Rontek Xflash dedektör analiz cihazı ile yapılmıştır.

#### **3.9.4. Protein adsorpsiyonu, porozite ve su buharı iletim hızı**

Hazırlanan formülasyonların protein adsorpsiyon testi için BSA ve fibrinojen kullanılmıştır. Öncelikle hazırlanan formülasyonlar çapı 2 cm olacak şekilde disk olarak kesilmiştir. Disk şeklindeki örnekler 24 saat boyunca PBS (pH:7.4) tamponunda bekletilmiştir. Daha sonra maksimum şişme derecesine ulaşan diskler 1 mg/ml BSA ve 0.05 mg/ml fibrinojen içeren protein çözeltileri ile 48 saat inkübe edilmiştir. Diskler protein çözeltilerinden çıkarılarak PBS tamponu ile iki kez yıkanmış ve %1’lik SDS çözeltisinde (2 ml) 3 saat karıştırmasıyla ile adsorbe olan proteinlerin çözeltiye geçişi sağlanmıştır. Çözeltiye alınan protein miktarı o-

ftalaldehid türevlendirmesi kullanılarak ölçülmüştür. Adsorbe edilen protein miktarları  $\mu\text{g protein/ cm}^2$  olarak verilmiştir.

Porozite, bir numunedeki boşluk oranı olarak tanımlanır ve biyomalzemenen bağımsız olan morfolojik bir özelliktir. Porozite ölçümleri, etanol ile sıvı yer değiştirme yöntemiyle yapılmıştır. Etanol, gözenek boyutunda bir değişikliğe neden olmadığından, yer değiştirme ortamı olarak kullanılmıştır.  $3 \text{ cm}^2$  alanındaki örnekler, belirlenmiş bir etanol ( $V_1$ ) hacmini içeren bir kabın içine daldırılmıştır. Örnekler konduktan sonraki etanolün hacmi  $V_2$  olarak kaydedilmiştir.  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 24 saat beklendikten sonra, örnekler çıkarılıp kalan etanolün hacmi  $V_3$  olarak kaydedilmiştir. Örneklerin porozitesi ( $\epsilon$ ), aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Eşitlik 3.5).

$$\text{Porozite (\%)} = \left[ \frac{(V_1 - V_3)}{(V_2 - V_3)} \right] \times 100 \quad (3.5)$$

Hazırlanan hidrojellerin su buharı geçirgenliğini ölçmek için Ma ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanılmıştır [227]. Membran örnekler (çap: 2.5 cm) 5 mL deiyonize su içeren cam şişelerin ağzına yerleştirilmiştir. Suyun test membranından  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de buharlaşması sistemin su kaybının ölçülmesiyle izlenmiştir. Numunelerin su buharı geçirgenliği, su buharı iletim hızı (WVTR):

$$\text{WVTR} = \left[ \frac{(W_t - W_0)}{t \cdot A} \right] \quad (3.6)$$

$W_0$ , başlangıçtaki sistemin ağırlığı,  $W_t$ , t zamanında sistemin ağırlığı, t, ölçüm zamanı ve A, cam şişenin açıklığının alanıdır. WVTR'nin birimi  $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  olarak verilmiştir.

### 3.9.5. Mekanik özellikler

Kuru filmlerin çekme dayanımı (TS) ve kopma (Eb) uzaması MTS Universal Tester (MTS Exceed Series 42) kullanılarak ölçülmüştür. Örnekler, 50 mm uzunluğunda ve 7 mm genişliğinde dikdörtgen şekillerde kesilmiştir. Gösterge uzunluğu 50 mm'ye sabitlenmiş ve hareketli kelepçenin hızı  $0.1 \text{ mm s}^{-1}$  olarak ayarlanmıştır. Üç paralel numune test edilmiş ve ortalama değerler rapor edilmiştir.

### 3.9.6. *In vitro* sitotoksisite

Hazırlanan formülasyonların sitotoksisite testi *Mus musculus* cinsi fare fibroblast hücreleri (L-929) kullanılarak indirekt sitotoksisite yöntemine (ISO 10993-5) göre yapılmıştır. Başlangıçta, tüm örnekler 0.1 g olacak şekilde tartılmıştır. Daha sonra, örnekler bir saat UV ışığı altında sterilize edilmiştir. Sterilasyon işlemi bittikten sonra örnekler %5 CO<sub>2</sub> atmosferinde 37 °C'de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ile 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, her bir numune solüsyonundan 100 µL alınmış ve 96 well-plakasının oyuklarına ekilmiş L-929 hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra her bir oyuğa 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolyum bromür (MTT) çözeltisi (PBS içerisinde 5 mg/ml) ilave edilmiş ve 4 saat karanlıkta 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, her bir kuyucuğa 100 µL dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiş ve oluşan renk dönüşümü bir mikropate okuyucu kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar % hücre canlılığı olarak verilmiştir. Ayrıca, JuliFL hücre analizörü ile hücre morfolojileri belirlenmiştir.

### 3.10. L-ASNaz Aktivitesi

Çalışma kapsamında, L-ASNaz enziminin aktivitesi Nesslerizasyon metodu kullanılarak belirlenmiştir [228]. Bu yöntem, L-Asn'nin L-ASNaz tarafından hidrolizi sonucu oluşan amonyağın kolorimetrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Ölçüm metodu kısaca şöyledir: Serbest ve immobilize enzimler bir tüpe yerleştirilmiş ve Tris-HCl (0.05 M) tamponuyla taze hazırlanmış substrat (0.01 M, 1 mL) çözeltisi eklenmiştir. Reaksiyon çözeltisi optimum sıcaklıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra, enzimatik reaksiyon TCA çözeltisi (1.5 M, 0.1 mL) eklenerek sonlandırılmıştır. Sonrasında çözeltiden 0.1 mL alınıp 96'lık well plate'e eklenmiş ve Nessler reaktifi (K<sub>2</sub>HgI<sub>4</sub>, 0.1 mL) ile reaksiyona sokulmuş ve sarı-turuncu bir renk oluştuğu gözlemlenmiştir. Elde edilen rengin absorbansı, oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra micro-plate reader cihazı ile 480 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bir birim enzim aktivitesi (IU), optimum koşullar altında dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Tüm deneyler üç paralel örnek kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler ortalama±SD (standart sapma) olarak grafik halinde sunulmuştur. Sonuçlar en yüksek aktiviteyi % 100 kabul ederek hesaplanmış ve bağıl aktivite olarak verilmiştir.

### 3.11. İmmobilizasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Enzim immobilizasyonu çalışmalarında immobilizasyon sonrası enzimin optimum pH, optimum sıcaklık, pH kararlılığı, termal kararlılığı, tekrar kullanılabilirliği ve depolama kararlılığı araştırılmaktadır. Çalışma kapsamında, bu faktörlerin her birinin enzim aktivitesi üzerine etkisi incelenerek sonuçlar serbest enzim ile kıyaslamalı olarak verilmiştir.

#### 3.11.1. Optimum pH

Serbest enzim ve L-ASNaz-stent formülasyonlarının optimum pH değerini belirlemek için enzim aktiviteleri farklı pH'ya sahip tamponlar ile hazırlanan substrat çözeltileri kullanılarak ölçülmüştür. Tampon olarak, 0.05 M sitrat (pH 4.0, 5.0 ve 6.0), 0.05 M fosfat (7.0, 7.5 ve 8.0) ve 0.05 M Tris-HCl (pH 8.5, 9.0 ve 10.0) kullanılmıştır. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu pH değeri optimum pH değeri olarak kaydedilmiştir.

#### 3.11.2. Optimum sıcaklık

Serbest enzim ve L-ASNaz-stent formülasyonlarının optimum sıcaklık değerlerini belirlemek için her iki örneğin aktivitesi de 5 °C aralıklarla 25 °C ile 80 °C arasındaki sıcaklıklarda incelenmiştir. Enzim aktivitesinin en fazla olduğu sıcaklık optimum sıcaklık değeri olarak kaydedilmiştir.

#### 3.11.3. Aktivasyon enerjisi

Serbest ve immobilize enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır. Aktivasyon enerjisi ( $E_a$ ) bir reaksiyonda reaktanlar ve geçiş durumu (veya aktive edilmiş kompleks) arasındaki enerji farklılığını temsil eder.  $E_a$ , Arrhenius eşitliği kullanılarak belirlenmiştir.

$$\ln(V) = \ln A - E_a/(RT)$$

Eşitlikteki; V, bağıl enzim aktivitesi, A, reaksiyon sabiti, T, Kelvin cinsinden sıcaklık ve R, evrensel gaz sabitidir. Aktivitenin sıcaklıkla arttığı bölge için elde edilen grafiğin eğiminden serbest ve immobilize enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

#### **3.11.4. Termal kararlılık**

Termal kararlılık, serbest ve immobilize edilmiş enzimin, su banyosunda, 0.5 ile 3 saat arasında değişen süre boyunca her bir örneğin optimum sıcaklığının 5 °C üst sıcaklığında inkübe edilmesi ve kalan aktivitelerin belirlenmesi ile değerlendirilmiştir.

#### **3.11.5. Tekrar kullanılabilirlik**

L-ASNaz-stent formülasyonlarının yeniden kullanılabilirliği araştırmak için, örneğin aktivitesi tekrar tekrar optimum koşullarda ölçülmüştür. Her aktivite analizinden sonra, örnek reaksiyon sisteminden çıkarılmış, ultra deiyonize su ile iyice yıkanmış ve kurutulmuştur. Daha sonra, taze substrat çözeltisi aynı örneğe tekrar ilave edilmiş ve kalan aktivite standart enzim prosedürüne göre ölçülmüştür. İlk enzim aktivitesi % 100 kabul edilmiş ve sonraki aktiviteler göreceli olarak hesaplanmıştır.

#### **3.11.6. Depolama kararlılığı**

Serbest ve immobilize enzimin depolama kararlılığını belirlemek için, her iki enzim örneği +4 °C ve oda sıcaklığında (~25 °C) 4 hafta boyunca saklanmıştır. Daha sonra, belirtilen enzim aktivitesi yöntemine göre her iki enzim örneğinin aktivitesi her hafta ölçülmüştür. İlk enzim aktivitesi %100 kabul edilmiş ve sonraki aktiviteler göreceli olarak hesaplanmıştır.

#### **3.11.7. Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat özgüllüğü**

Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine metal iyonlarının ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) ve inhibitör kimyasallarının ( $\beta$ -merkaptanoethanol, üre, sodyum azid, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100) etkisini incelemek için her iki enzim örneği de hazırlanan metal iyon ve inhibitör (10 mM) çözeltileriyle 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası optimum koşullar altında enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar herhangi bir kimyasala maruz bırakılmamış enzim aktivitesi % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır.

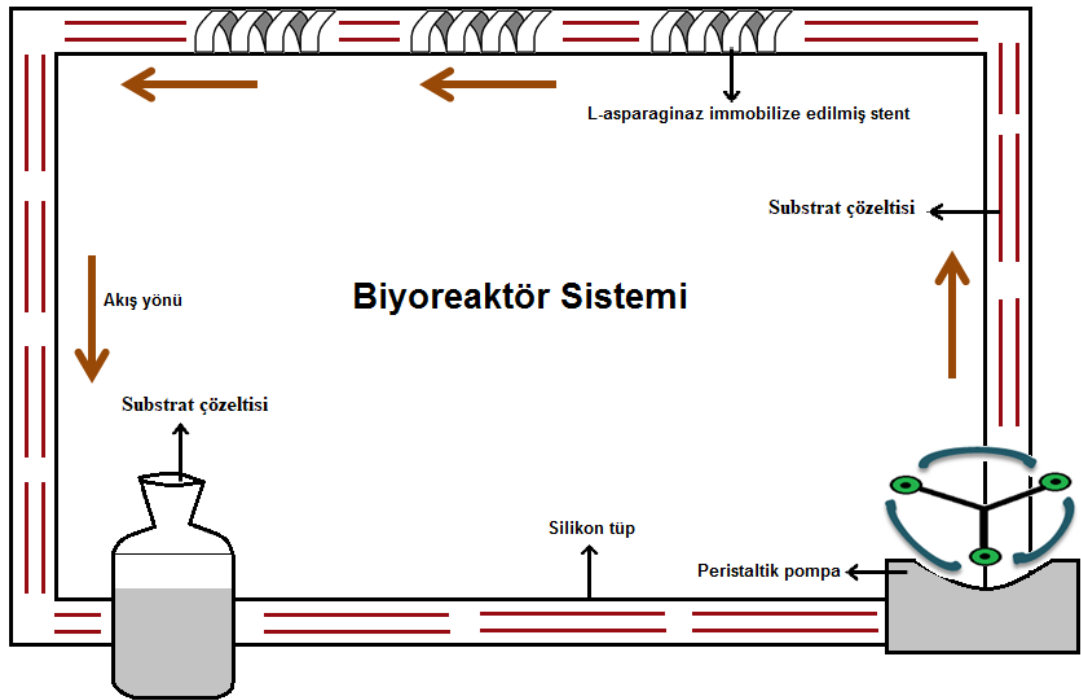
Aynı zamanda, enzim özgüllüğünü incelemek için her iki enzim örneğinin aktiviteleri 10 mM farklı substratlar (L-asparagin, L-glutamin, L-aspartik asit, L-glutamik asit, L-histidin, akrilamid ve üre) kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar, bağlı aktivite cinsinden sunulmuştur.

### 3.11.8. Tripsin direnci

Hem serbest hem de immobilize enzimin tripsine karşı direncini ölçmek için her iki enzim örneğine 0.2 mL 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 8.6) ve daha sonra 10 µL (1.0 mg/ml) tripsin çözeltisi eklenmiş ve karışım inkübe edilmiştir. Belirli aralıklarda enzim hidrolize edildikten sonra örnekler alınmış ve kalan aktiviteleri ölçülmüştür.

### 3.11.9. *İn vitro* akış koşullarında stent formülasyonlarının uygulanabilirliği

Tez kapsamında hazırlanan nihai stent formülasyonlarının insan damar akışını taklit ettiğimiz *in vitro* sistemimizde (Şekil 3.2) aktivitelerinin bir aydaki değişimi incelenmiş ve örneklerin kalan aktiviteleri belirlenmiştir. Her bir örnek, 2.0 mm iç ve 4.0 mm dış çapında bir silikon hortum içerisine yerleştirilmiş ve 250 ml/dakika akış oranında substrat çözeltisi 1 ay boyunca peristaltik pompa yardımıyla sistemde sirküle edilmiştir. Her hafta sonunda enzimin aktivitesi belirlenmiş ve örneklerin kalan aktiviteleri hesaplanmıştır.



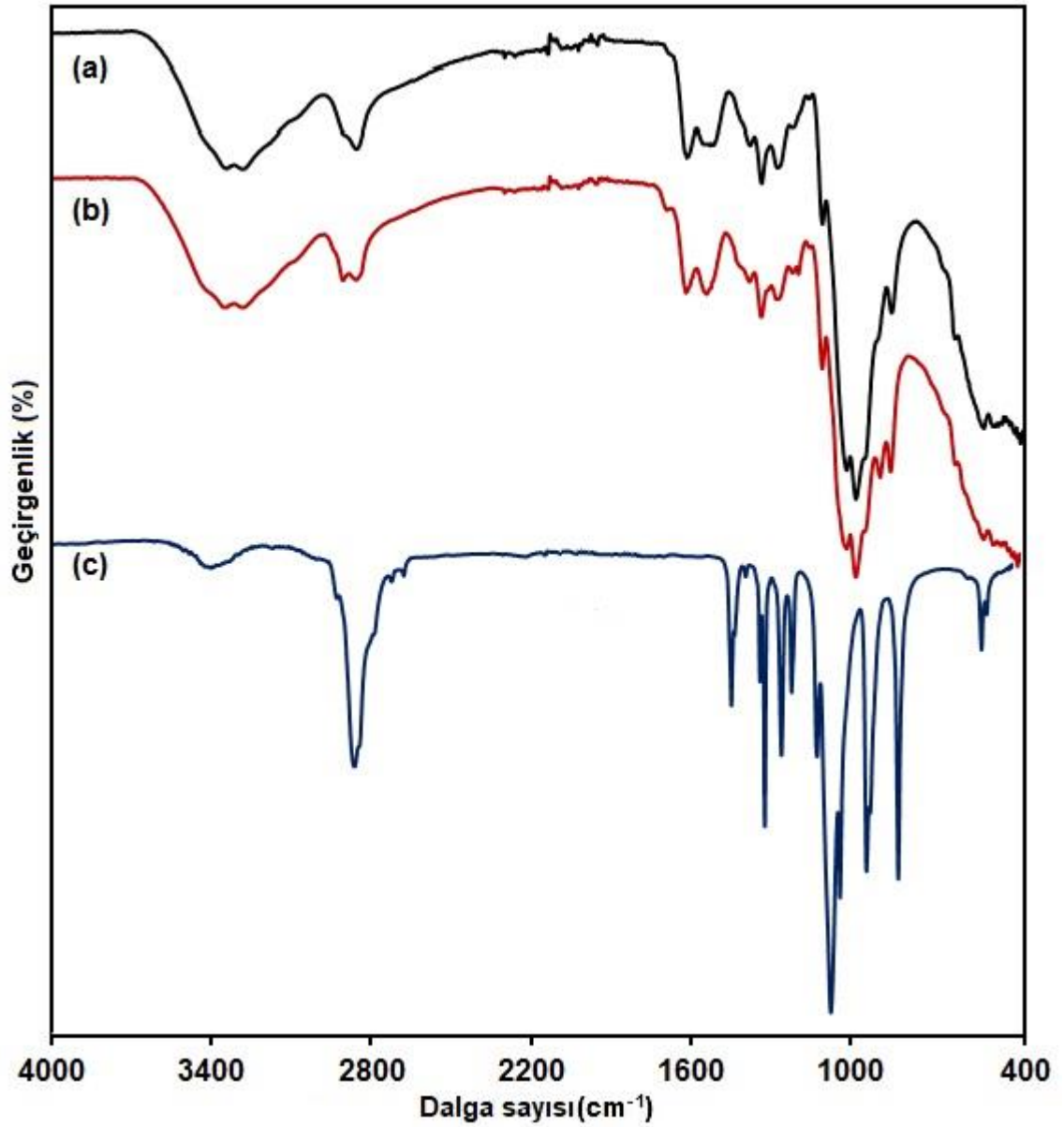
Şekil 3.2. *İn vitro* biyometrik reaktör sisteminin şematik gösterimi

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. CHI/GLY/PEG Hidrojellerinin Karakterizasyonu

#### 4.1.1. FTIR analizi

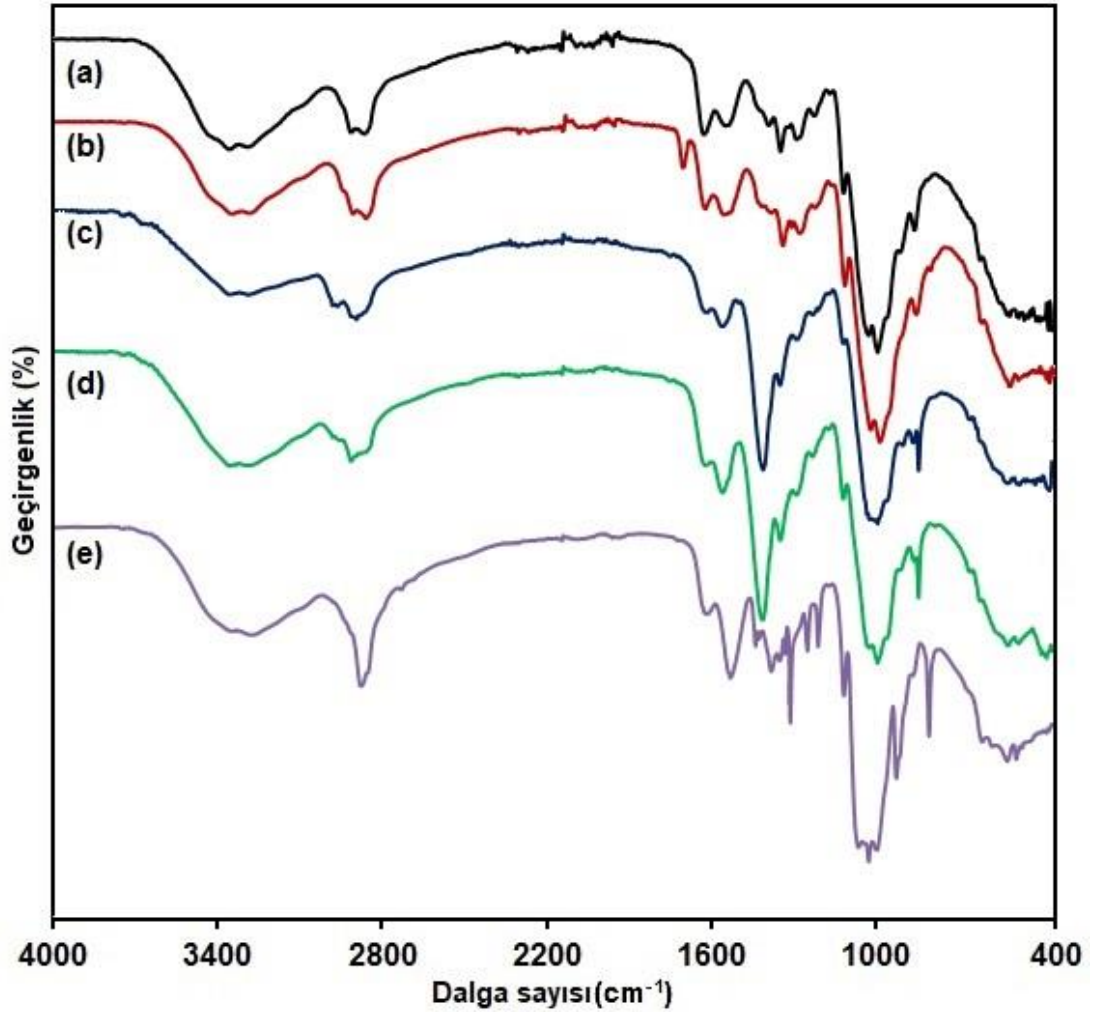
CHI, CHI/GLY ve PEG örneklerinin FTIR spektrumu Şekil 4.1'de verilmiştir. Saf CHI için (Şekil 4.1. (a), 3100-3500  $\text{cm}^{-1}$ 'de (O–H ve N–H gerilme titreşimleri), 2860-2917  $\text{cm}^{-1}$ 'de (asimetrik C–H ve  $\text{CH}_2$  gerilme titreşimleri) ve 1652  $\text{cm}^{-1}$ 'de (N–H eğilme titreşimleri, amid I bandı) karakteristik absorpsiyon bantları görülmüştür [229]. Bunun yanı sıra, 1568  $\text{cm}^{-1}$ , 1420  $\text{cm}^{-1}$ , 1375  $\text{cm}^{-1}$ , 1153  $\text{cm}^{-1}$ , 1063  $\text{cm}^{-1}$ , ve 1025  $\text{cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları sırasıyla N–H eğilme titreşimleri (amid II bandı), C–H bükme, O–H eğilme, C–O–C asimetrik titreşimleri ve C–O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [230]. Şekil 4.1 (b)'de CHI/GLY için verilen FTIR spektrumuna bakıldığında CHI'nın tüm karakteristik piklerini göstermiştir sadece bazı pik şiddetlerinde azalma veya kayma vardır. Saf PEG'in FTIR spektrumu ise Şekil 4.1 (c)'de sunulmuştur. FTIR spektrumunda; 3440  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunan bant O–H gruplarından, 2880  $\text{cm}^{-1}$  de C–H gerilme bandından, 1467  $\text{cm}^{-1}$  ve 1342  $\text{cm}^{-1}$  de C–H eğilme titreşimleri ve 1094  $\text{cm}^{-1}$  de C–O–H gerilim titreşiminden kaynaklanmaktadır [231]. Ayrıca, 950  $\text{cm}^{-1}$  (C-H düzlem dışı bükülme titreşimi) ve 840  $\text{cm}^{-1}$  (O-H düzlem dışı bükülme titreşimi) de bulunan absorpsiyon bantları da PEG polimerinin kristal bölgedeki karakteristik pikleridir [232].



**Şekil 4. 1.** Saf CHI (a), CHI/GLY (b) ve saf PEG (c) örneklerine ait FTIR spektrumları

Kütlece farklı oranlarda PEG içerecek şekilde hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerinin FTIR spektrumları Şekil 4.2’ de gösterilmiştir. FTIR spektrumu incelendiğinde tüm hidrojeller saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG polimerinin karakteristik piklerini göstermektedir. Ancak, PEG oranı arttıkça bazı piklerin pik şiddeti değişmekte ve kayma gözlemlenmektedir. Örneğin, 1652  $\text{cm}^{-1}$ ’de bulunan amit I piki ile karşılaştırıldığında, amit II’nin pik şiddeti önemli ölçüde azalmıştır. Ortaya çıkan bu spektrum, CHI’nin  $-\text{NH}_2$  gruplarının kısmen PEG ile reaksiyona girdiğini göstermektedir [233]. 1120  $\text{cm}^{-1}$  ve 2880  $\text{cm}^{-1}$ ’de bulunan pikler CHI ve PEG’in C–O ve C–H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [234]. Ayrıca, PEG oranı arttıkça 1342  $\text{cm}^{-1}$ , 950  $\text{cm}^{-1}$  ve 840  $\text{cm}^{-1}$  de bulunan PEG’in karakteristik piklerinin şiddetinde

artma görülmektedir [235]. Sonuç olarak, CHI/GLY/PEG hidrojenlerinin FTIR spektrumları literatür ile tamamen uyumlu olduğundan dolayı, bu sonuçlar CHI/GLY/PEG hidrojenlerinin başarılı bir şekilde hazırlandığını kanıtlamaktadır.

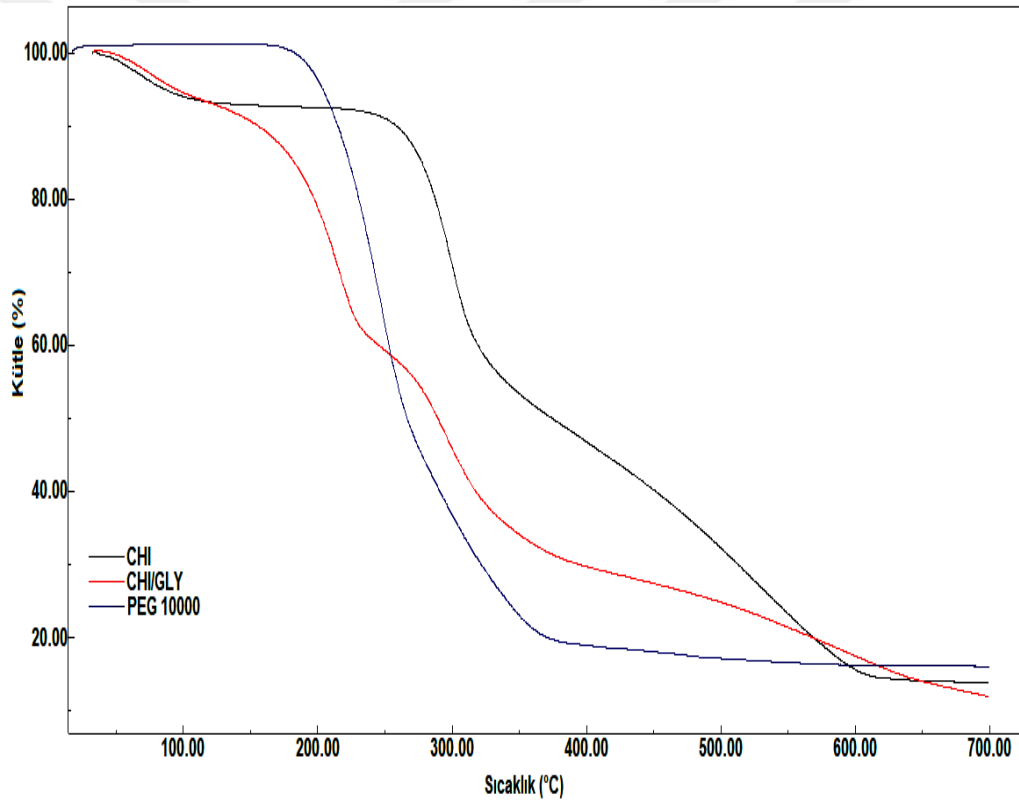


**Şekil 4. 2.** Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojenlerine ait FTIR spektrumları; (a) CHI/GLY/PEG-1, (b) CHI/GLY/PEG-2, (c) CHI/GLY/PEG-3, (d) CHI/GLY/PEG-4 ve (e) CHI/GLY/PEG-5

#### 4.1.2. Termal analiz

Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG malzemelerinin TGA termogramları Şekil 4. 3'de gösterilmiştir. Saf CHI'nın TGA termogramında 150 °C'nin altında gözlenen ilk kütle kaybı (yaklaşık %6) nem kaybından dolayıdır. Saf CHI'nın ikinci kütle kaybı 250 °C'de başlamıştır ve yaklaşık %40'lık bir kütle kaybı görülmüştür. Bu kütle kaybının sebebi CHI'nın eterli gruplarının bozunmasından kaynaklanmaktadır. Saf CHI'nın son kütle kaybı 350-600 °C arasındadır ve glukozamin kalıntılarının bozunmasından kaynaklıdır [236]. Termogramlar incelendiğinde CHI/GLY üç temel

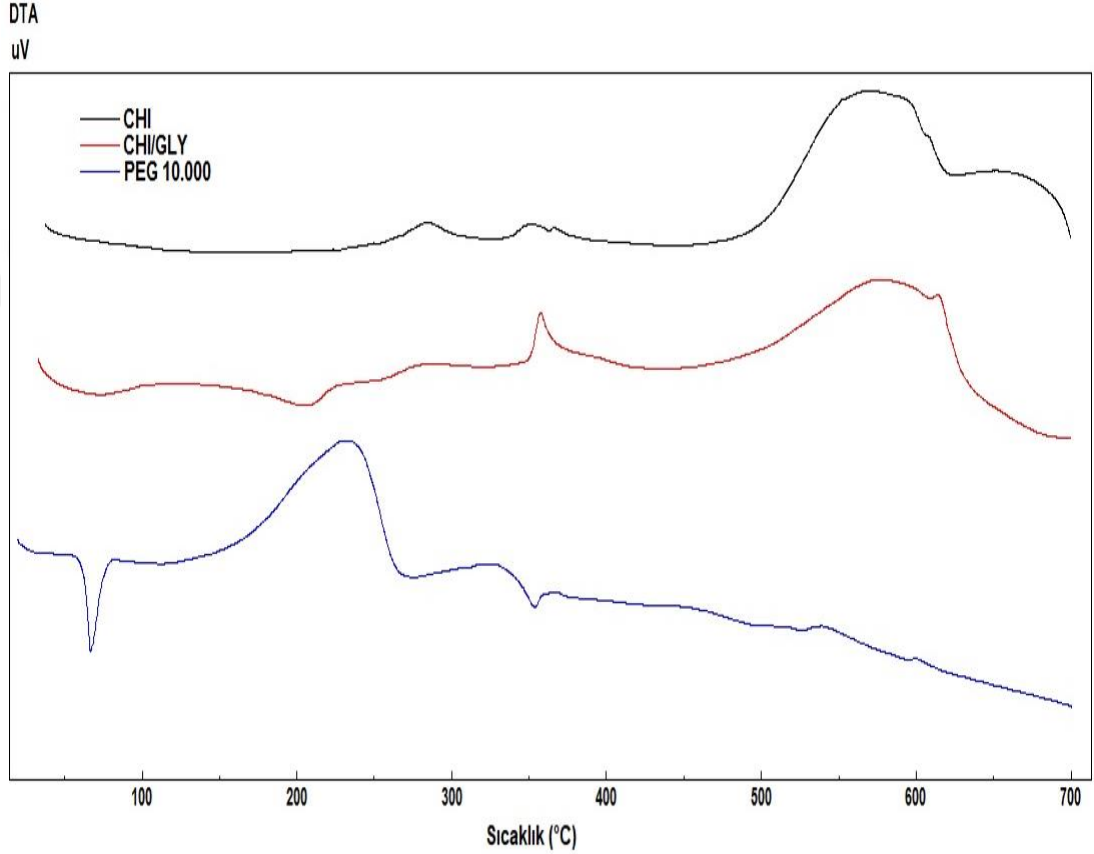
kütle kaybı vermektedir. Birincisi 50 °C ile 150 °C arasında yaklaşık %5'lik bir kütle kaybıdır. Bu kütle kaybı adsorbe edilen suyun dehidrasyonundan kaynaklanmaktadır. İkinci kütle kaybı ise GLY'nin termal bozunmasıdır. Son kütle kaybı hidrojellerin temel maddesi olan CHI'nin termal bozunmasına aittir. CHI/GLY termal bozunması saf CHI ile karşılaştırıldığında daha düşük sıcaklıklara kaymıştır. Bunun sebebi plastikleştirici olarak kullanılan GLY'dir. Literatürde de benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Örneğin, Zhang vd. GLY'nin serisin filmlerinin termal bozunmasını hızlandırdığını belirtmişlerdir [237]. Saf PEG'in TGA termogramında bir tane temel kütle kaybı (yaklaşık %80) görülmektedir. 200-400 °C arasındaki bu bozunma PEG fonksiyonel gruplarının pirolizinden dolayıdır ve tüm polimerik yapının bozunduğunu gösterir [238].



**Şekil 4. 3.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG malzemelerine ait TGA termogramları

Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG örneklerinin DTA termogramları Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu termogramlar TGA termogramları ile uyumludur. DTA termogramları incelendiğinde üç bozunma piki mevcuttur. CHI'nin ilk bozunma piki dehidrasyondan dolayıdır ve küçük bir piktir. İkinci ve üçüncü bozunma bölgeleri 300-550 °C arasındadır ve geniş bir bant görünümündedir. CHI/GLY için termal bozunma üç

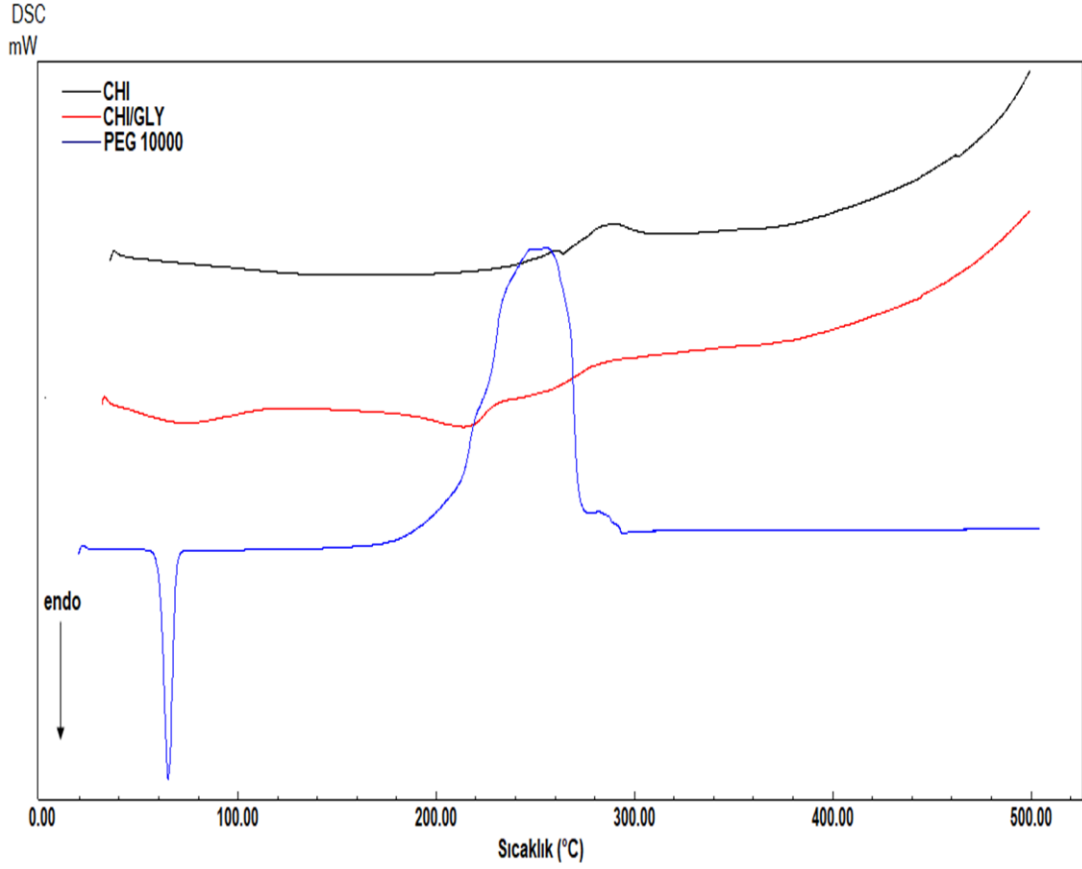
bölgede görülmektedir. İlk pik (50-200 °C) örnekte bulunan su kaybına karşılık gelmektedir, ikinci pik (350-400 °C) büyük olasılıkla plastikleştirici olarak kullanılan GLY'ye aittir ve son bozunma piki de (550-600 °C) CHI'nın bozulması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Saf PEG'in dehidrasyon piki daha belirgin olup 50-100 °C arasındadır. İkinci temel bozunma piki PEG'in tamamen bozunduğunu göstermektedir.



**Şekil 4. 4.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG malzemelerine ait DTA termogramları

Şekil 4.5'te saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG 10.000 malzemelerine ait DSC termogramları görülmektedir. Bu termogramlarda öncelikle saf CHI'nın yapısında 250-350 °C aralığında ekzotermik bir pik görülmektedir. Bu pik CHI'nın kısmi dehidrasyonundan kaynaklanmaktadır [239]. CHI/GLY yapısında ise yapıdaki GLY'ye bağlı olarak 50-100 °C arasında nemin uzaklaşmasına ait bir endotermik pik görülmektedir. Yine 230-300 °C civarında CHI ünitelerinden dolayı kısmi dekompozisyon ekzotermi görülmektedir. PEG'in DSC termogramında ise biri ekzotermik diğeri endotermik olmak üzere belirgin iki pik görülmektedir. PEG termogramı kristal yapısından dolayı 64.62 °C'de keskin bir pik göstermiştir. Bu

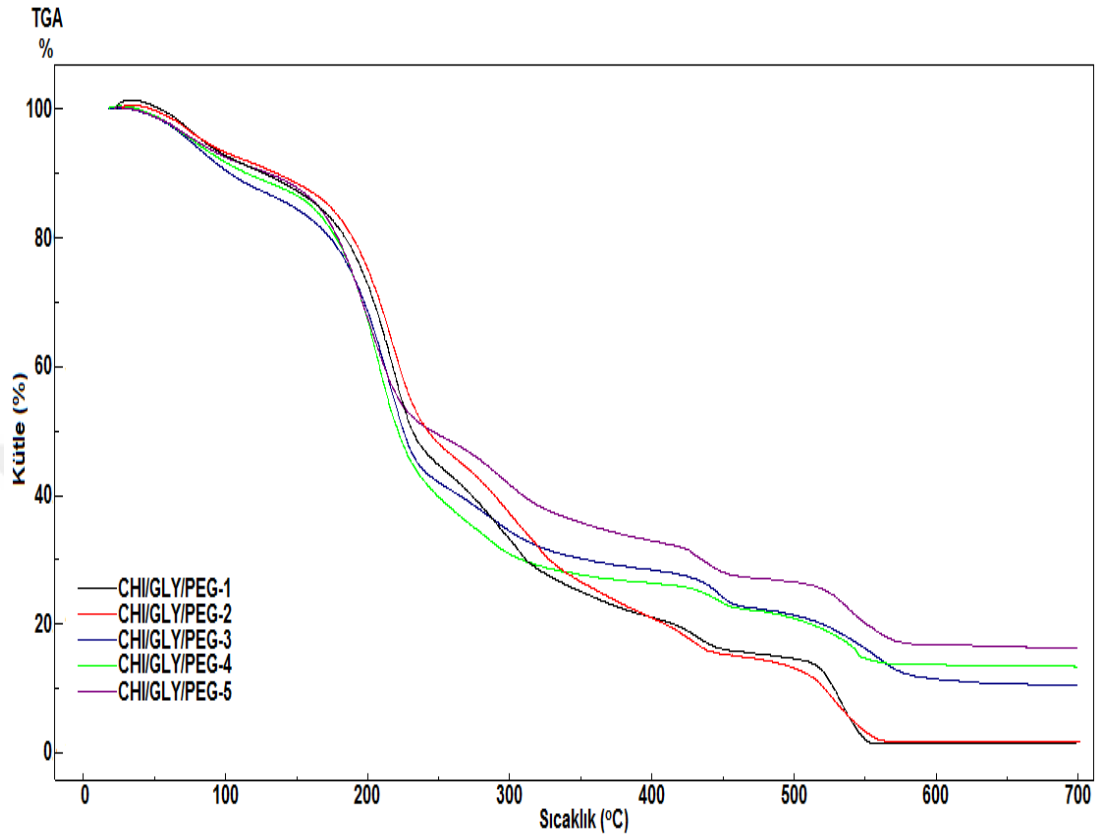
keskin pik PEG'in endotermik erime pikidir. Yaklaşık 200 °C'de başlayıp 300 °C'de sonlanan geniş bant görünümlü pik ise termooksidatif bant pikidir.



**Şekil 4. 5.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PEG malzemelerine ait DSC termogramları

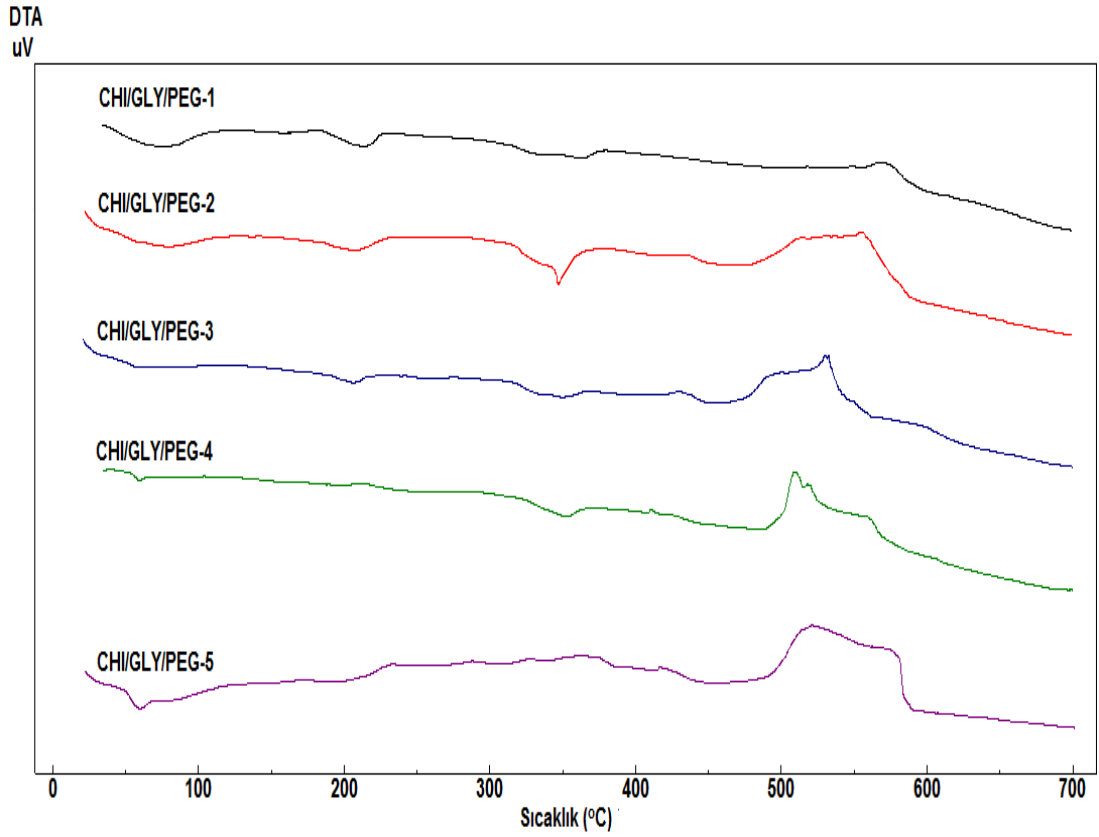
Şekil 4.6'da CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait TGA termogramları verilmiştir. Tüm termogramlar incelendiğinde, 50-150 °C arasında görülen ilk kütle kaybı adsorbe edilen suyun dehidrasyonundan kaynaklanmaktadır. Dehidrasyonun 100 °C'nin üzerinde olmasının nedeni CHI'nın fonksiyonel grupları ve GLY arasında oluşan hidrojen bağlarından kaynaklanmaktadır. Literatürde bildirildiği üzere hidrojen bağı polimerlerin termal kararlılıklarını arttırmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmada hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerinin termal bozunmalarının artan PEG miktarlarıyla doğru orantılı olarak değiştiği açıkça görülmektedir. Hazırlanan hidrojellere ait termogramlarda, PEG miktarı arttıkça hidrojellerin termal kararlılığı da artmaktadır. Bunun sebebi CHI'nın OH grupları ile PEG'in terminal OH grupları arasında oluşan hidrojen bağıdır. PEG grupları arttıkça daha fazla hidrojen bağı meydana gelir ve bundan dolayı hidrojeller daha rijit bir hal alır. İkinci kütle kaybı, hidrojellerin hazırlanması sırasında etkileşime girmeyen fazla PEG ünitelerinin

bozunmasından ileri gelmektedir. Son kütle kaybı ise CHI'nın temel yapısının termo degradasyonundan kaynaklanmaktadır.



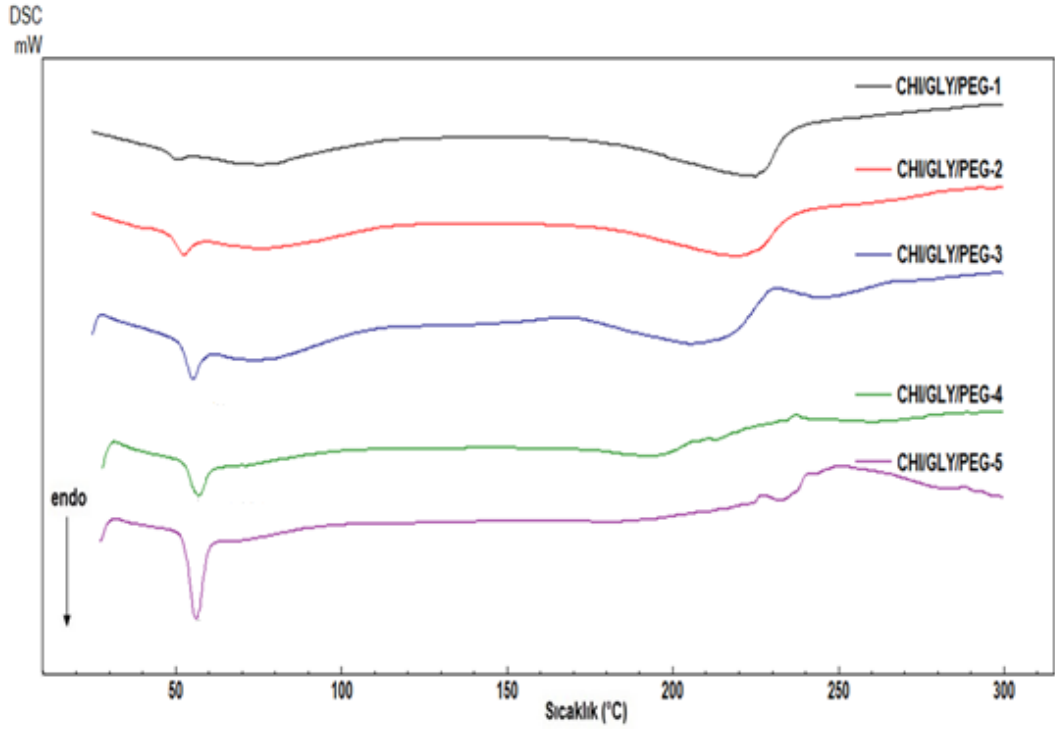
**Şekil 4. 6.** Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait TGA termogramları

Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerinin DTA termogramları TGA termogramları (Şekil 4.7) ile uyumludur. PEG oranının artmasına bağlı olarak 66.5 °C civarındaki PEG'den kaynaklı olan geçişler net bir şekilde görülmektedir. DTA termogramı üzerinde temel olarak 200-400 °C arasında geniş bir ekzoterm ve 500-600 °C civarında büyük bir ekzotermik bozunma piki görülmektedir. 200 °C civarında başlayan termal bozunma piki yapıdaki PEG gruplarından kaynaklanırken, 500 °C civarında başlayan bozunma piki ise CHI ünitelerinden kaynaklı termooksidatif piktir. Yapıdaki PEG oranı arttıkça 200 °C civarında başlayan bozunma piki alanları da büyümektedir. Bu da yapıya istenilen oranda PEG birimlerinin dâhil olduğunu ispatlamaktadır.



**Şekil 4. 7.** Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait DTA termogramları

Şekil 4.8'de CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait DSC termogramları verilmiştir. Yapıdaki PEG miktarı arttıkça PEG ünitelerinden dolayı erime piki belirginleşmektedir. Yine PEG ünitesinden kaynaklı 200-300 °C arasındaki PEG grubu bozunma piki CHI/GLY/PEG-3, CHI/GLY/PEG-4 ve CHI/GLY/PEG-5 örneklerinin termogramında belirginleşirken, CHI/GLY/PEG-1 ve CHI/GLY/PEG-2 örneklerinin spektrumunda çoğunlukla CHI yapısından kaynaklanan 250 °C civarında başlayan bozunma piki görülmektedir. Elde edilen bu termogram sonuçları hazırlanan hidrojellere PEG'in istenilen oranda katkılındığını kanıtlamaktadır.



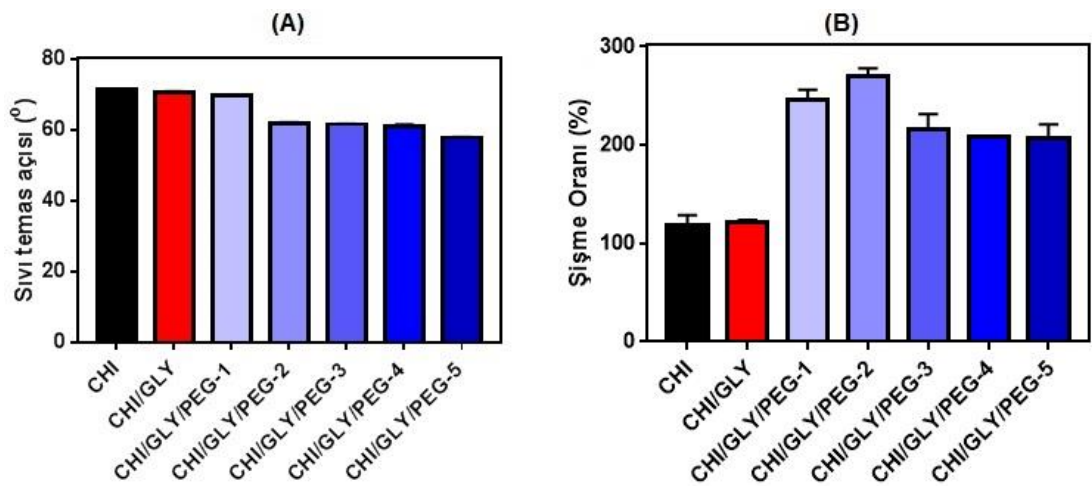
**Şekil 4. 8.** Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerine ait DSC termogramları

#### 4.1.3. Sıvı temas açısı ve şişme derecesi

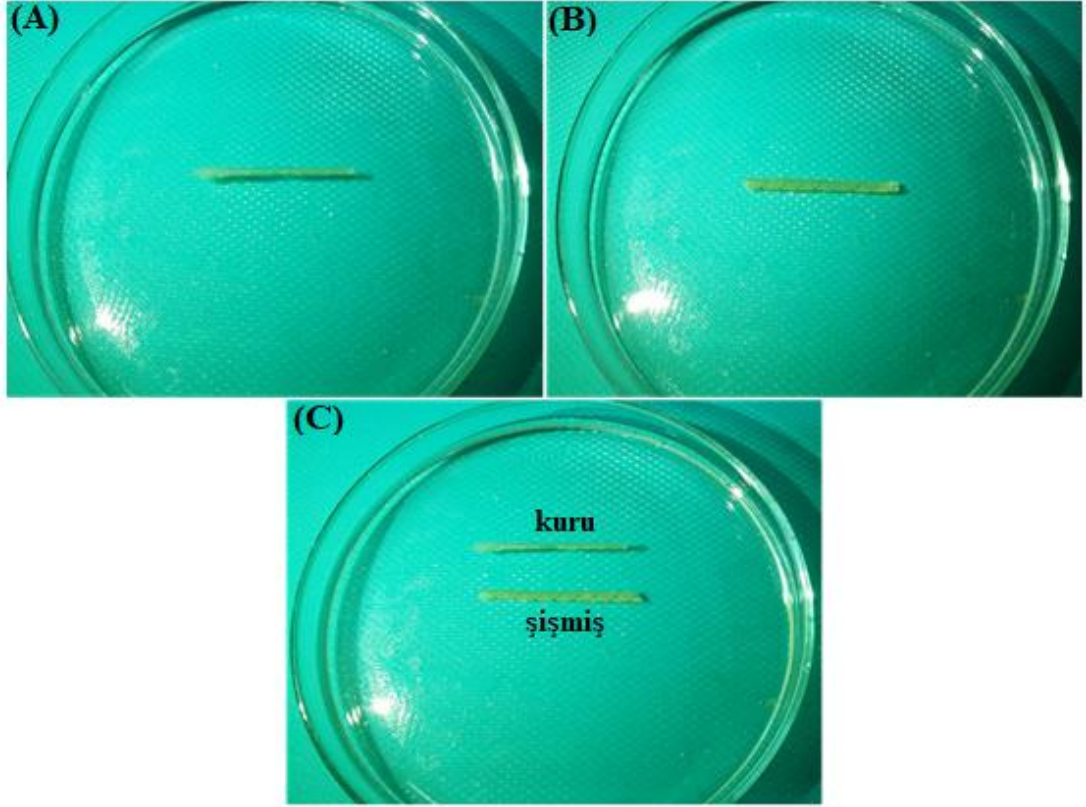
Hidrofiliklik, biyobozunur hidrojel filmlerin biyomedikal uygulaması için en temel özelliklerden biridir. Şekil 4.9 (A)'da gösterildiği gibi film yüzeylerinin hidrofilisitesini değerlendirmek için sıvı temas açısının değeri ölçülmüştür. CHI filminin sıvı temas açısı  $78.0 \pm 1.0^\circ$  olarak ölçülmüştür ve bu değer literatürde rapor edilen diğer çalışmalar ile uyumludur [240]. CHI/GLY filminin sıvı temas açısı saf CHI'kinden düşüktür ( $70.43^\circ \pm 0.58$ ). GLY'nin doğal hidrofilik karakteri sıvı temas açısında bir azalmaya neden olmuştur. Benzer şekilde, hidrojel film yüzeylerinin hidrofilisitesi yani ıslanabilirliği PEG'in eklenmesiyle artırılmıştır. Çünkü PEG ıslatılabilirliği artıracak hidrofilik polimer zincirlerine sahiptir. Ayrıca, bu beklenen sonuç, aynı PEG'in terminal -OH gruplarının varlığına da atfedilebilir, çünkü -OH grupları biyomalzemelerin hidrofilisitesini geliştirme potansiyeline sahiptir. CHI moleküllerine çapraz bağlanmış veya aşılınmış bir yapının sokulmasının hidrofilisiteyi arttırdığı bilinmektedir [241]. CHI filmlerinde güçlü moleküller arası ve molekül içi hidrojen bağları vardır ve PEG gibi kimyasal modifikasyonların dâhil edilmesi bu etkileşimleri kırar. Bu nedenlerle, hidrojel filmlerin hidrofilisitesi artar. Bu nedenle, PEG katkılanmış filmlerin temas açısı, CHI ve CHI/GLY filmlerine kıyasla küçüktür. Hazırlanmış CHI/GLY/PEG hidrojellerinin sıvı temas açıları PEG

miktariyla doğru orantılı olarak  $69.67^{\circ} \pm 0.26$ ,  $62.04^{\circ} \pm 0.16$ ,  $61.65^{\circ} \pm 0.21$ ,  $61.04^{\circ} \pm 0.54$  ve  $57.92^{\circ} \pm 0.07$  olarak ölçülmüştür. Ancak, aşırı PEG miktarı (CHI/GLY/PEG-4 ve CHI/GLY/PEG-5 örnekler için) sıvı temas açısında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu sonuç ta literatürde rapor edilen bir durumdur [233]. Bu bağlamda, Tamada vd. 60–80 °'lik sıvı temas açısı değerinin hücre büyümesi için yeterli bir aralık olduğunu bildirmiştir [242]. Buradaki sonuçlara kıyasla, CHI/GLY/PEG hidrojellerinin doku mühendisliği uygulamalarında hücre büyümesinin desteklenmesi için kullanılma potansiyelinin olabileceği çıkarılabilir.

Şekil 4.9 (B), farklı PEG içeriğine sahip hidrojel filmleri için şişme testlerinin sonucunu göstermektedir. İlk olarak, her bir örnek PBS çözeltisinde hızla şişmiş, daha sonra şişme oranı yavaşlamış ve 24 saat sonunda her bir örnek maksimum şişme oranına ulaşmıştır (Şekil 4. 10). Şişme, hidrojel ağlarının gözenekliliği ile doğrudan bağlıdır. Gözenek hacmi fraksiyonunu, gözenek büyüklüklerini ve ara bağlantılarını kontrol eden temel faktörler; ağ polimer zincirlerinin ve çapraz bağlama yoğunluğunun bileşimidir. Polimerin belirli bir hacimde artan konsantrasyonu, polimer zincirlerinin sayısında bir artışa neden olur. Bu artış polimer ağda gözenekliliğin azalmasına neden olur ki bu da büyük olasılıkla hidrojellerin su tutma kapasitesinin azalmasının sebebidir. Literatürde hidrojel filmlerinin şişme oranını CHI'nın amino grupları ve suyun hidroksil grupları arasındaki iyonik etkileşimlerin belirlediği rapor edilmiştir [243]. Bizim çalışmamızda, artan PEG miktarıyla birlikte CHI'nın amino grupları ve suyun hidroksil grupları arasındaki iyonik etkileşimler kısıtlanacağından hidrojellerin şişme oranı azalmıştır.



Şekil 4. 9. Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojellerinin (A) sıvı temas açıları ve (B) dinamik şişme testi sonuçları

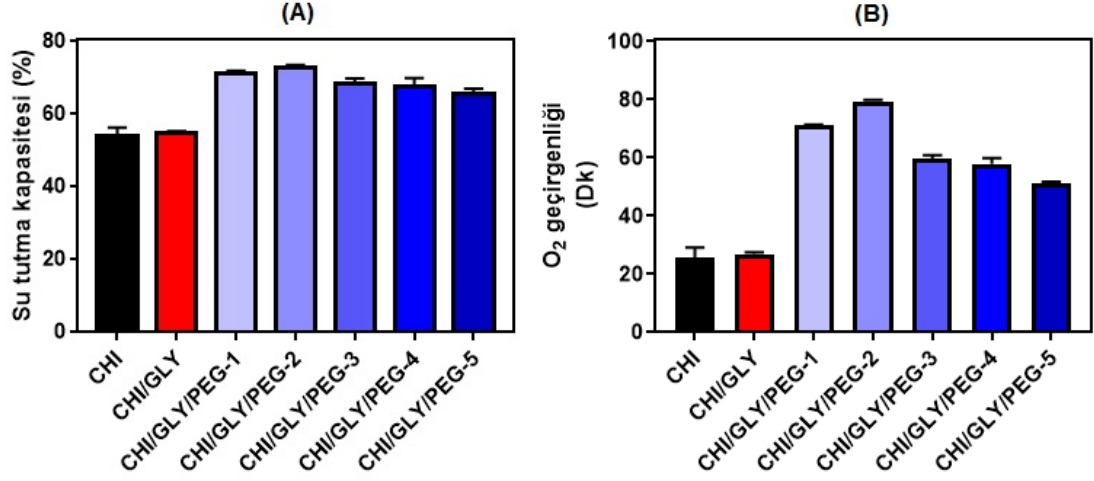


**Şekil 4. 10.** CHI/GLY/PEG hidrojenlerinin kuru (A), şişmiş haldeki (B) ve karşılaştırmalı (C) sonuçlarının fotoğraf görüntüleri

#### **4.1.4. Su tutma kapasitesi ve gaz geçirgenliği**

Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojenlerinin su tutma kapasitesi sonuçları Şekil 4.11 (A)'da gösterilmiştir. Çapraz bağlanmamış CHI pH 7.4'te %52-56 oranında su tutma oranına sahip olmasına rağmen, çapraz bağlanmış CHI/GLY/PEG hidrojenlerinin su tutma yüzdesi %65-71'dir. Dolayısıyla, PEG miktarı hazırlanan hidrojenlerinin su tutma kapasitesini önemli ölçüde etkilemiştir. Bu artış CHI omurgasına hidrofilik segmentin (PEG) dahil edilmesinden kaynaklanır. Elde edilen sonuçlar şişme testi ile paralellik göstermektedir.

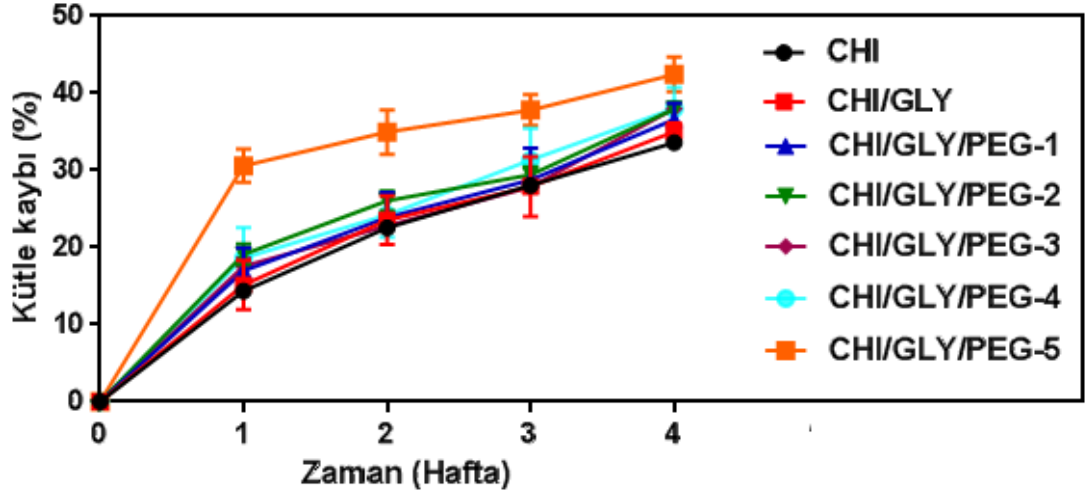
Şekil 4.11 (B), ayrıca hidrojel filmlerin O<sub>2</sub> geçirgenliğini göstermektedir. O<sub>2</sub> örneğin içindeki su fazıyla difüze olabileceğinden dolayı örneklerin su tutma kapasiteleri ile doğru orantılıdır [244]. Yani bir hidrojel örneği ne kadar su absorbe edebilirse o örnek için O<sub>2</sub> gazının geçirgenliği de lineer olarak artar. Bu korelasyon bizim çalışmamızda da gözlenmiştir.



**Şekil 4. 11.** Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojenlerinin (A) su tutma kapasitesi ve (B) O<sub>2</sub> geçirgenlik testi sonuçları

#### 4.1.5. *In vitro* biyobozunurluk testi

CHI/GLY/PEG hidrojenlerine ait *in vitro* biyobozunurluk sonuçları Şekil 4.12’de verilmiştir. Saf CHI dört hafta sonunda %33.58±1.11 oranında bozunma göstermiştir. CHI/GLY 4. haftanın sonunda %35.01±0.64 oranında bozunma sergilemiş olup bu bozunma oranı CHI’ninkinden yüksektir. Bozunma sürecinin ilk haftalarında bu artış daha belirgin olarak görülmektedir. GLY’nin biyobozunurluluğu arttırdığına dair literatürde çalışmalar mevcuttur. Bunun nedeni olarak GLY’nin hidrofilik karakteri gösterilmektedir. Farklı oranda PEG içeren hidrojenlerin ise 4. haftanın sonunda % 36.58±2.09, 37.95±0.64, 38.01±0.94, 38.00±2.77 ve 42.43±2.24 oranında bozunma sergilemiş olup haftalara göre baktığımızda bozunma oranı lineere yakındır. Elde edilen bu sonuçlar göstermektedir ki PEG oranı arttıkça hidrojenlerin bozunurluğu buna paralel olarak artıyor. PEG oranının en yüksek olduğu CHI/GLY/PEG-5 örneğinde hazırlanan hidrojenlerin bozunurluluğu maksimum düzeydedir. PEG yüksek hidrofilik özelliğinden dolayı hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırmak için kullanılan suda çözünen biyobozunur sentetik bir polimerdir. Literatürde PEG’in yüksek hidrofilik özelliği ve lineer yapısından dolayı malzemenin *in vitro* hidrolitik degradasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir [245].



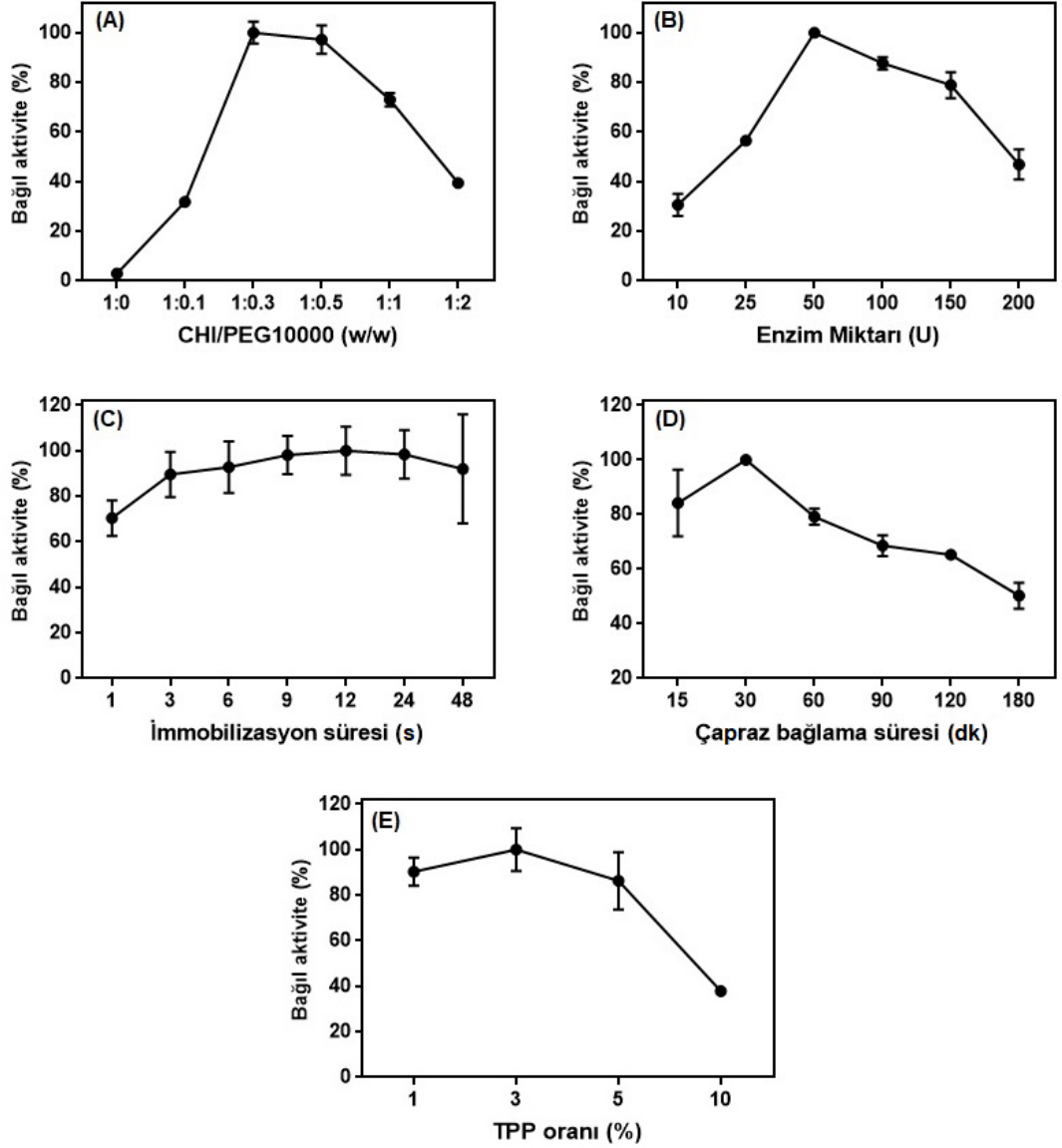
Şekil 4. 12. CHI/GLY/PEG hidrojellerinin *in vitro* biyobozunurluk test sonuçları

#### 4.1.6. L-ASNaz içeren CHI/GLY/PEG formülasyonlarının hazırlanması

L-ASNaz içeren CHI/GLY/PEG formülasyonlarının hazırlanması için öncelikle enzim aktivitesi üzerine bazı parametrelerin (CHI/PEG oranı, enzim miktarı, TPP oranı, çapraz bağlama süresi ve immobilizasyon süresi) etkisi incelenmiş ve maksimum bağlı aktivite gösteren en ideal koşullar belirlenmiştir. Hazırlanan CHI/GLY/PEG hidrojelleri arasında seçim yapmak için her bir örneğe belli miktarda enzim eklenmiş ve enzimin bağlı aktivitesi hesaplanmıştır. Şekil 4.13 (A)'da görüldüğü üzere PEG oranının artmasıyla beraber enzimin bağlı aktivitesinde CHI:PEG oranının 1:0.3 olduğu formülasyonda maksimum bağlı aktivite elde edilmiştir. PEG oranının artmasıyla malzemedeki hidroksil grupları artacaktır buda enzimin bu gruplarla daha fazla etkileşim halinde olacağı anlamına gelmektedir. Bu etkileşimler enzimin immobilizasyonunu arttırmış ve paralel olarak enzimin aktivitesinde bir artışa neden olmuştur. Ancak, bu formülasyondan sonraki örneklerde enzim aktivitesinde bariz bir azalış görülmüştür. Bu azalmanın nedeni PEG miktarının artmasıyla beraber enzimin etkileşeceği fonksiyonel grupların sayısı artacağından bu aşırı bağlanma enzimin aktif merkezini gizleyebilir veya substratın aktif merkezine girişini engellemiş olabilir. Bu fiziksel veya kimyasal bağlanmalar sonucu enzim aktivitesi azalmış olabilir. Bundan dolayı en uygun formülasyonun CHI/GLY/PEG-3 olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.13 (B) 'de gösterildiği gibi, bağlı aktivite, enzim konsantrasyonunun 10-50 U arasında artmış ve 50 U'de maksimum aktiviteye ulaşmıştır. Daha sonra, enzim konsantrasyonunun arttırılmasıyla bağlı aktivite azalmıştır. Enzim aktivitesindeki bu azalma, enzimin, aktif bölgeyi gizleyecek ve

enzim aktivitesinde bir azalmaya neden olacak şekilde daha yüksek bir enzim konsantrasyonu ile formülasyon içerisine aşırı yüklenmesi gerçeğiyle açıklanabilir. Bu nedenle, immobilizasyon için enzim miktarı olarak 50 U konsantrasyonu seçilmiştir. Immobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için, 1 ile 48 saat arasında değişen immobilizasyon süresi incelenmiştir. Immobilizasyon süresi, enzim immobilizasyon işlemi sırasında başka bir anahtar değişkendir. Çok kısa bir immobilizasyon süresi, enzim moleküllerinin çoğunun taşıyıcı malzemenin yapısına nüfuz etmek için yeterli zamana sahip olmadığı anlamına gelmektedir. Çok uzun bir immobilizasyon süresi ise, taşıyıcı malzeme üzerinde bulunan enzim moleküllerinin, substratları ile temas sağlanması zorlaştırır ve bu da enzim aktivitesinde düşüşe neden olur [246]. Şekil 4.13 (C)'den görülebileceği gibi, bir saat immobilizasyondan sonra, enzimin bağıl aktivitesindeki belirgin bir artış vardır. Bunun nedeni, immobilizasyon süresi arttıkça, hazırlanan formülasyonlarla enzim arasındaki kimyasal etkileşimlerden dolayı immobilize edilen enzim miktarı artmıştır ve dolayısıyla bağıl aktivite artmıştır. Immobilizasyon süresinin artmasıyla immobilize hale getirilmiş enzimin aktivitesi tekrar kademeli olarak artmıştır. 12 saatlik immobilizasyondan sonra hazırlanan formülasyon ile enzimin aktif merkezindeki arasında oluşan kovalent etkileşimlerden dolayı immobilize enzimin bağıl aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonuçlara dayanarak immobilizasyon süresi olarak en ideal olan 12 saat süresi optimum değer olarak alınmıştır.

Çapraz bağlayıcı ajanın oranı ve çapraz bağlama süresi de immobilizasyon sürecini önemli ölçüde etkiler. Şekil 4.13 (D) ve (E)'de gösterildiği gibi, TPP oranı %3 ve çapraz bağlama süresi 30 dakika olduğunda bağıl aktivite maksimuma ulaşmıştır. TPP oranının ve çapraz bağlanma süresinin daha da arttırılmasında, formülasyon ve enzimin aktif merkezi arasında fiziksel ve kimyasal etkileşimler gerçekleşeceğinden, bağıl aktivite azalmıştır. Ayrıca, aşırı çapraz bağlanmadan dolayı sterik engel oluşacağından substratın enzimin aktif merkeze ulaşması engellenecektir. Bundan dolayı TPP oranı %3 ve 30 dakikalık çapraz bağlama süresi seçilmiştir.



**Şekil 4. 13.** L-ASNaz içeren CHI/GLY/PEG formülasyonlarının hazırlanması için optimum parametrelerin belirlenmesi: A) CHI/PEG oranı, B) Enzim miktarı, C) İmmobilizasyon süresi, D) Çapraz bağlama süresi ve E) TPP oranı

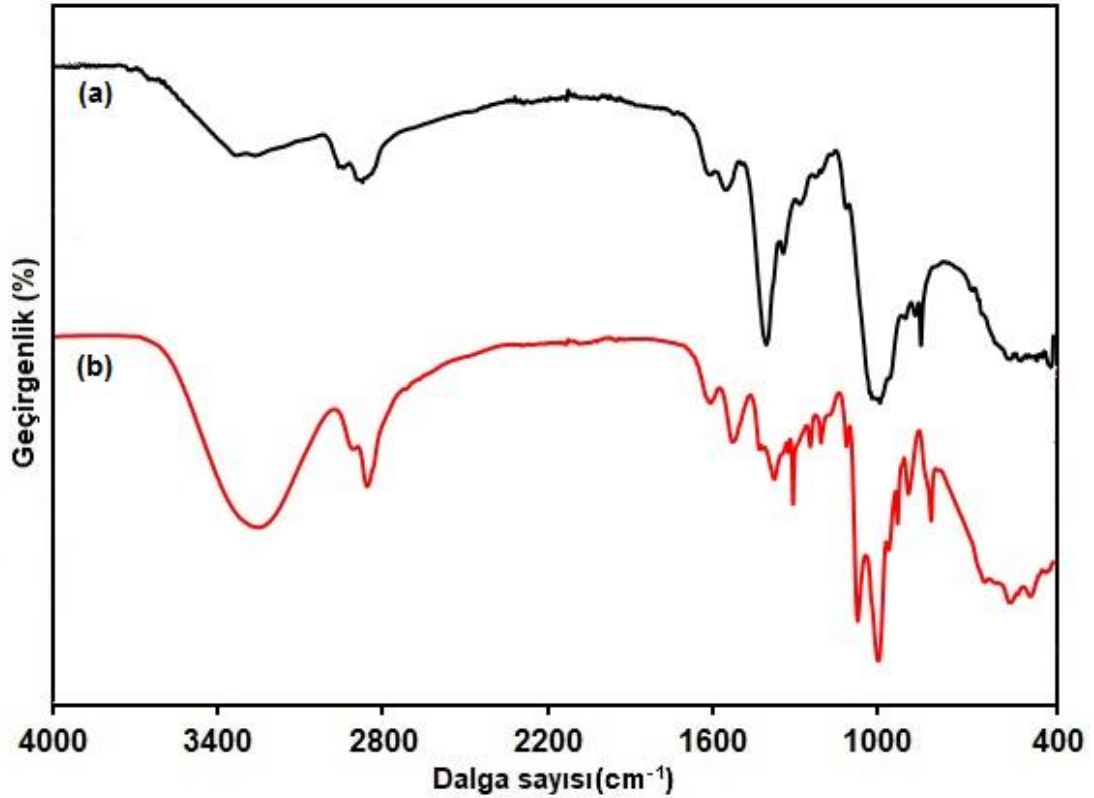
#### 4.1.7. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonunun karakterizasyonu

Enzim aktivitesi testi sonucunda seçilen örneklerde enzimin varlığını kanıtlamak ve immobilizasyon prosedürünün örnekte oluşturduğu değişiklikleri incelemek için enzim immobilize edilmiş örnekler FTIR, XRD, SEM ve EDX cihazları ile yapısal ve morfolojik olarak incelenmiştir.

##### 4.1.7.1. FTIR analizi

L-ASNaz'ın varlığını yapısal olarak kanıtlamak için CHI/GLY/PEG-3 ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları kaydedilmiştir (Şekil

4.14). Her iki spektrum da incelendiğinde, L-ASNaz enziminin başarılı bir şekilde formülasyona dâhil edildiğine dair absorpsiyon bantları açıkça görülmektedir. CHI/GLY/PEG-3 örneğinin spektrumundan farklı olarak, 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında pik şiddetinin immobilizasyondan sonra arttığı görülmüştür. Bu artışın nedeni enzimde bulunan –OH ve –NH gruplarından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, 2881-2926  $\text{cm}^{-1}$ 'de aralığında bulunan piklerin şiddetindeki artma enzimdeki hidrokarbonların asimetrik ve simetrik titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1643  $\text{cm}^{-1}$  (amid I bükme) ve 1342  $\text{cm}^{-1}$ 'de (amid II bükme), iki pikin yoğunluğunun artması L-ASNaz'ın başarılı bir şekilde immobilizasyonuna dair kanıttır. Ayrıca, 850 ve 1260  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunan pikler ise, enzimin aminoasit kalıntısında bulunan histidin gibi amino asit kalıntılarının aril yapısındaki C-H ve C-N gerilmesine karşılık gelmektedir [247].

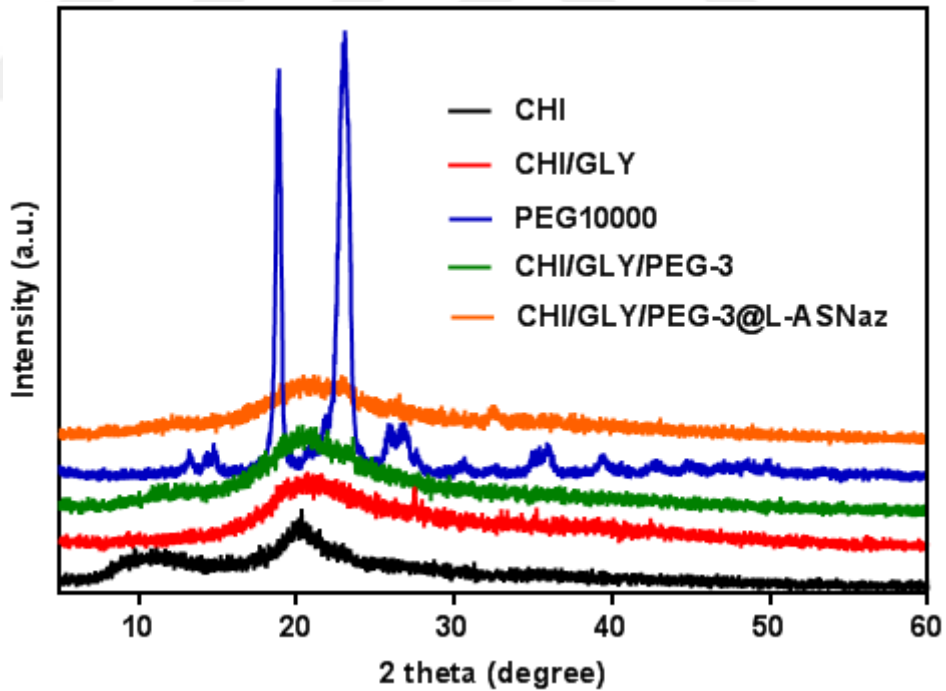


Şekil 4. 14. (a) CHI/GLY/PEG-3 ve (b) CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları

#### 4.1.7.2. XRD analizi

Şekil 4. 15 CHI, CHI/GLY, PEG10.000, CHI/GLY/PEG-3 ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneklerinin XRD analizi sonuçlarını göstermektedir. Saf CHI  $2\theta=10.1^\circ$  ve  $2\theta=20.1^\circ$ 'de iki adet karakteristik difraksiyon piki göstermiştir. Bu sonuca göre

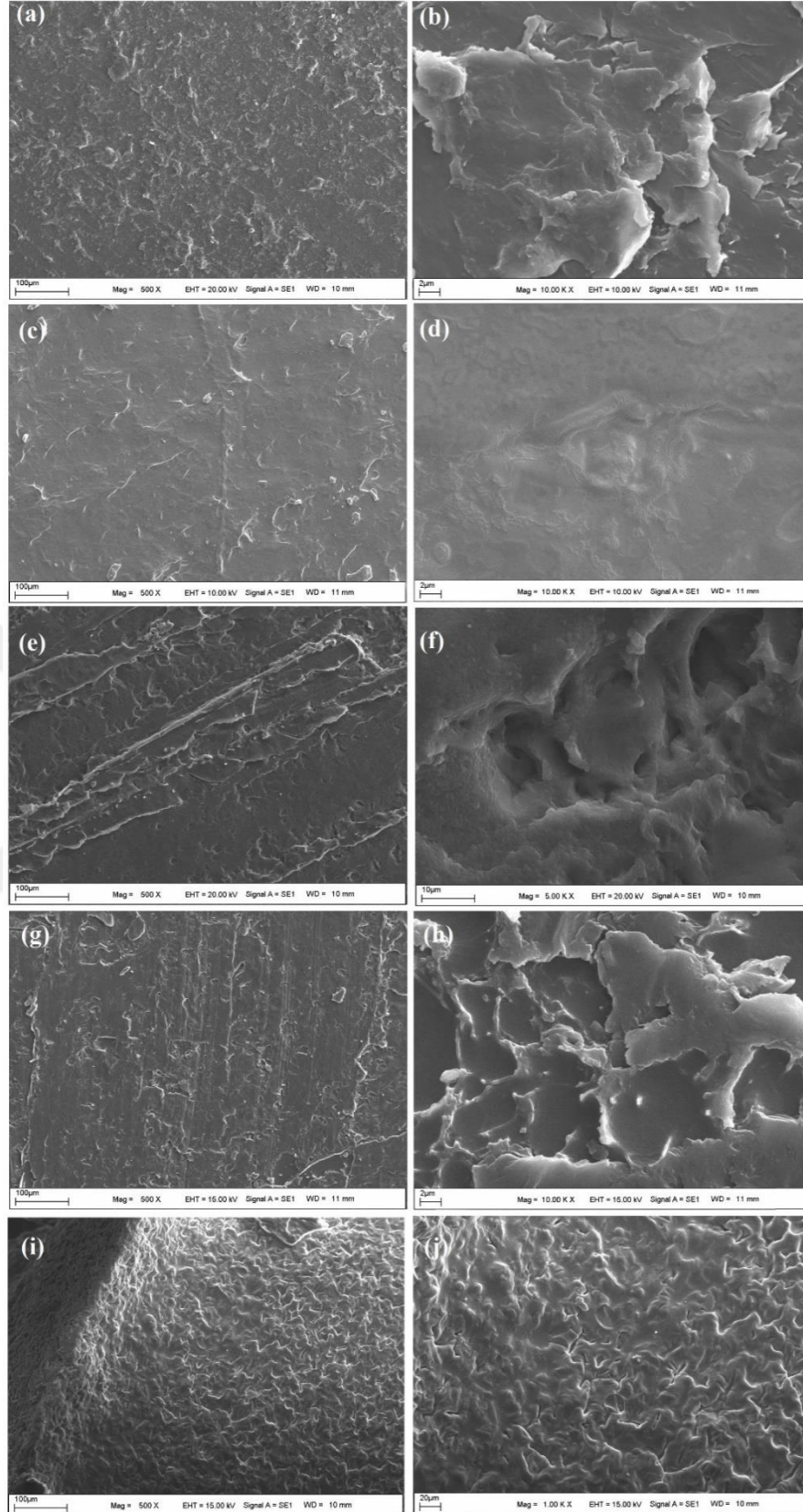
CHI'nın düşük yoğunluklu ve yarı-kristalin olduğu söylenebilir [248]. CHI/GLY filmlerinin XRD spektrumuna bakıldığında birkaç pikin kaybolduğu, sadece 20.1 °de CHI'nkine göre geniş bir pike sahip olduğu görülmektedir. Buda, GLY içeren filmlerde kristalleşme derecesinin azaldığının kanıtıdır [249]. Saf PEG 19.6° ve 23.4°'de iki adet güçlü ve keskin difraksiyon piki, 15.0°, 26.1°, 26.8°, 36.29° ve 39.74°'de beş adet zayıf difraksiyon piki göstermiştir. Bu sonuçlar daha önce rapor edilen XRD sonuçları ile tamamen uyumludur ve kullanılan PEG'in iyi kristalin özelliklerine sahip olduğunu doğrular [238]. PEG eklendikten sonra ise XRD spektrumunda pikler daha geniş bir bantta görüldü, bu da kristalin bölgesinin amorf hale geldiğinin göstergesidir [223]. CHI/GLY/PEG-3 örneği için, 18-26° arasında hem CHI hem de PEG'den dolayı geniş bir pik görülmektedir. Buda CHI/GLY/PEG hidrojellerinin başarılı bir şekilde hazırlandığının kanıtıdır. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneğinin XRD spektrumu incelendiğinde, L-ASNaz immobilizasyonundan sonra önemli bir faz değişimi olmadığı görülmüştür. Ancak, pik şiddetlerinin hafif azaldığı görülmüştür.



Şekil 4. 15. CHI, CHI/GLY, PEG10.000, CHI/GLY/PEG-3 ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneklerinin XRD spektrumları

#### 4.1.7.3. SEM analizi

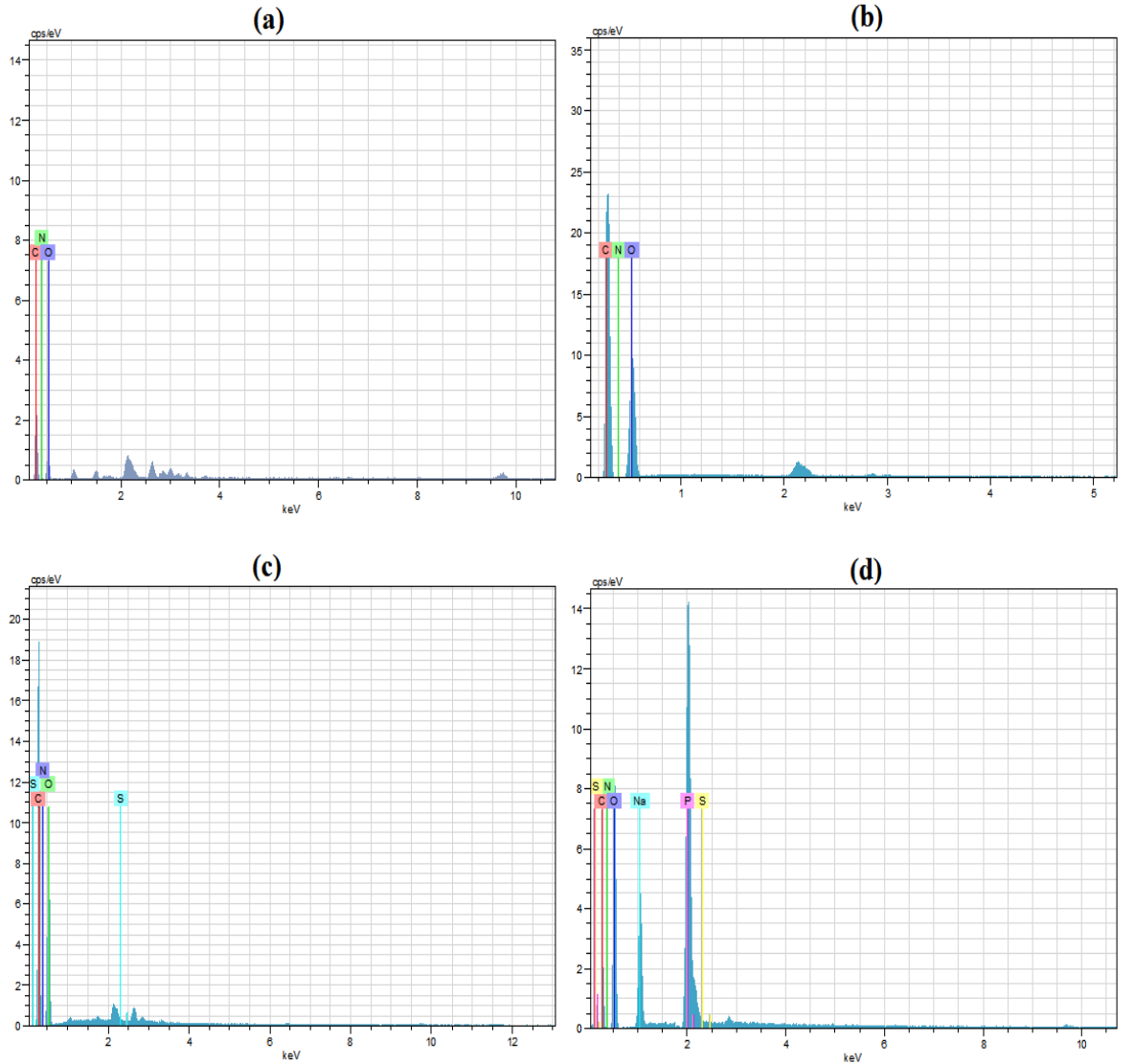
Hazırlanan hidrojel filmlerin morfolojisi Şekil 4.16'da sunulan SEM görüntülerine dayanılarak değerlendirilmiştir. CHI'nin SEM görüntüsü incelendiğinde, CHI filmlerin yüzeyinin düzgün, sürekli ve kompakt bir yapı olduğu görülmektedir (Şekil 4.16 a, b). GLY içeren filmin mikroyapısı, CHI filmlerinin görüntülerinden farklıdır (Şekil 4.16 c, d). Bu film yüzeyinde çatlama gözlemlenmiştir. Bunun nedeni GLY'nin plastikleştirme etkisinden olduğu sonucuna varılabilir. GLY konsantrasyonu düşük olduğunda, GLY'nin tipik plastikleştirme etkisi oluşur ve kurutma sırasında yüzeyde mikro çatlama meydana gelir. Buna, yapının içinde daha sıkı polimerik ağ oluşmasına neden olur. Mikroyapının ve morfolojinin PEG içeriğinden ciddi şekilde etkilendiği açıkça görülmektedir. PEG'in yapıya dâhil edilmesiyle birlikte, CHI/GLY'nin gözenek yapısı artmıştır (Şekil 4.16 e, f). Şekil 4.16 g, h ise hidrojel formülasyonuna L-ASNaz enzimi yüklendikten sonra oluşan CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneğinin morfolojik görüntüsünü yansıtmaktadır. Enzimin hidrojel formülasyonuna eklenmesinden sonra örneğin morfolojisinde büyük ölçüde bir değişiklik oluşmamıştır. Ancak, hidrojel örneği TPP ile çapraz bağlandıktan sonra film yüzeyi bariz bir şekilde değişmiştir (Şekil 4.16 i, j). Film yüzeyinin düzenli gözenekliliği çapraz bağlama işleminden sonra artmıştır. Bu CHI ve PEG arasındaki etkileşimin varlığını kanıtlamaktadır ve elde edilen sonuçlar literatür ile tamamen paraleldir [223].



**Şekil 4. 16.** CHI (a, b), CHI/GLY (c, d), CHI/GLY/PEG-3 (e, f), CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz (g, h) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (i, j) SEM görüntüleri

#### 4.1.7.4. EDX analizi

Hazırlanmış hidrojel formülasyonların EDX spektrumları Şekil 4.17'de sunulmaktadır. Saf CHI için karbon (C), oksijen (O) ve azot (N) elementlerine ait pikler görülmektedir (Şekil 4.17a). CHI/GLY/PEG örneğine ait EDX spektrumu incelendiğinde benzer elementlere ait pikler görülmektedir (Şekil 4.17b). Ancak, PEG polimerinden dolayı bu piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.17c, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz örneğine ait EDX spektrumunu göstermektedir. Bu spektrum dikkatlice incelendiğinde, enzimden kaynaklı ekstra kükürt (S) piki görülmektedir. Ayrıca, C, O ve N piklerinin şiddeti de artmıştır. Son olarak, TPP ile çapraz bağlanmış stent formülasyonlarına ait EDX spektrumunda TPP'den dolayı sodyum (Na) ve fosfor (P) elementlerinin varlığı bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.17d).

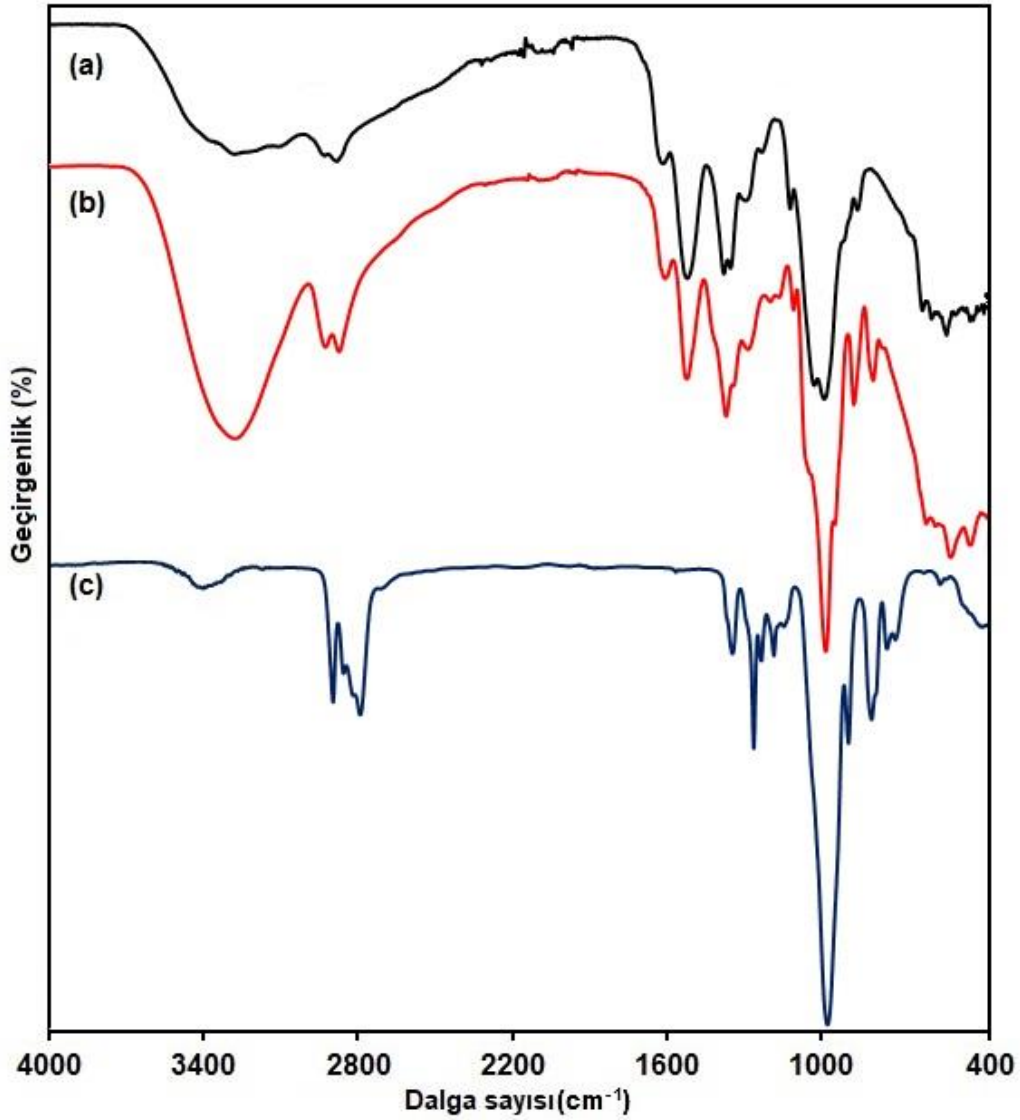


Şekil 4. 17. CHI (a), CHI/GLY, CHI/GLY/PEG-3 (b), CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz (c) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (d) EDX spektrumları

## 4.2. CHI/GLY/PPG Hidrojellerinin Karakterizasyonu

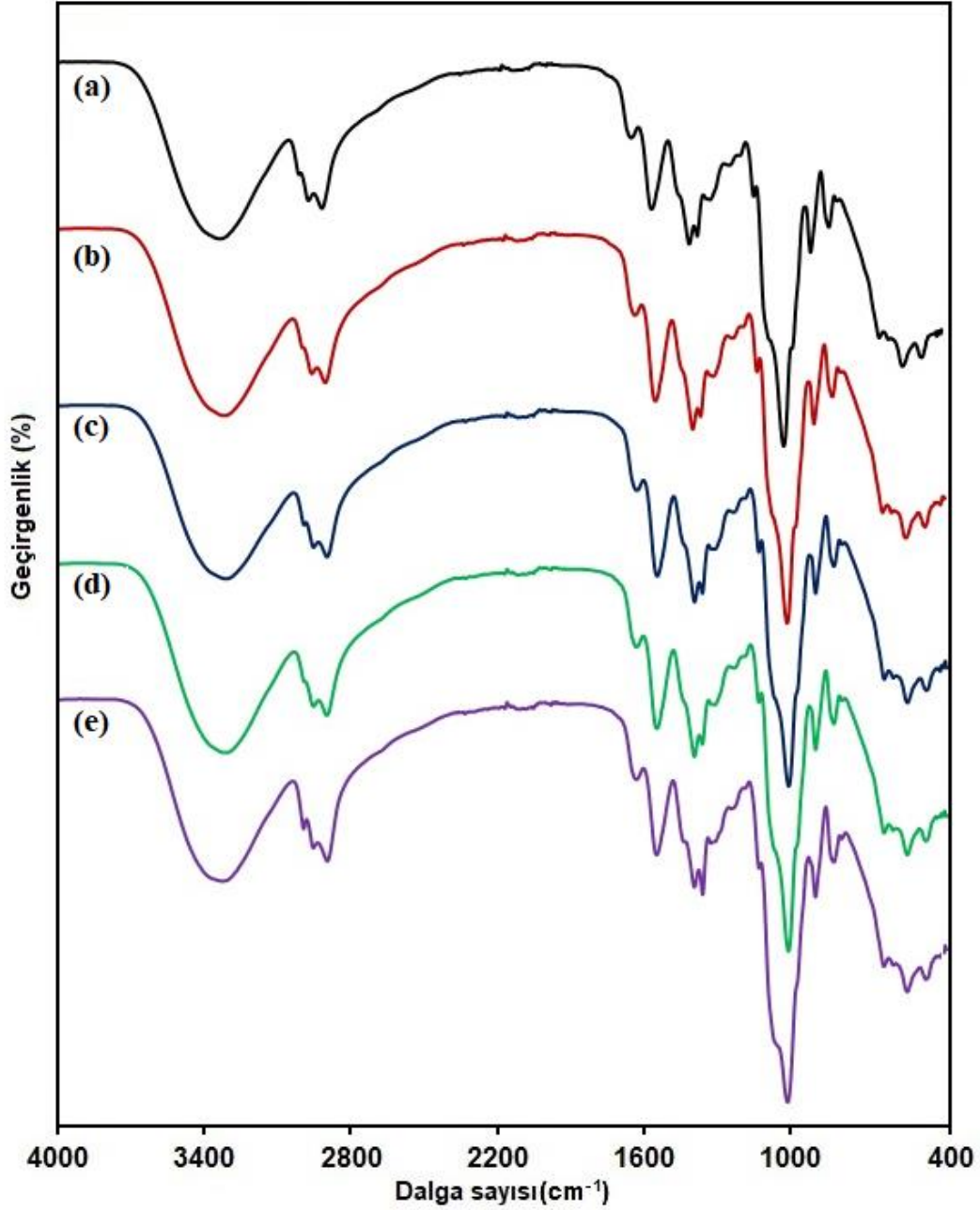
### 4.2.1. FTIR analizi

CHI, CHI/GLY ve PPG örneklerinin FTIR spektrumu Şekil 4.18’de verilmiştir. CHI ve CHI/GLY örneklerinin FTIR analiz sonuçları 4.1.1 başlığı altında detaylı bir şekilde verilmiştir. Saf PPG’nin FTIR spektrumunda  $3457\text{ cm}^{-1}$ ’de O-H gerilme titreşimleri,  $2883$  ve  $2977\text{ cm}^{-1}$ ’de,  $\text{CH}_3$ ’ün simetrik ve asimetrik C-H gerilmesine ait bantlar vardır.  $1242$ ,  $1298$  ve  $1375\text{ cm}^{-1}$ ’de görülen pikler (alkil CH) PPG’nin karakteristik pikleridir [250]. Ayrıca, PPG’nin tekrarlanan  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$  birimlerinin karakteristik C-O-C gerilme titreşimi  $1100\text{ cm}^{-1}$ ’de gözlenmiştir.



Şekil 4. 18. Saf CHI (a), CHI/GLY (b) ve saf PPG (c) örneklerine ait FTIR spektrumları

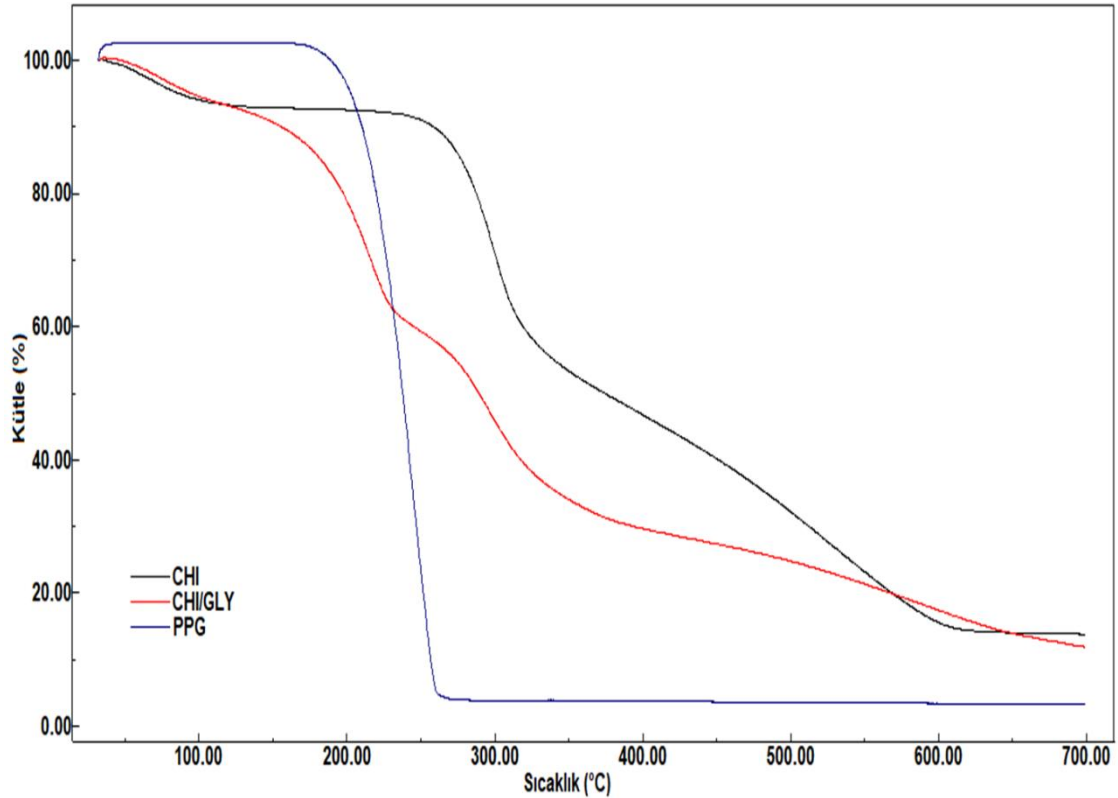
Kütlece farklı oranlarda PPG içerecek şekilde hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojenlerinin FTIR spektrumları Şekil 4.19'da gösterilmiştir. FTIR spektrumu incelendiğinde tüm hidrojenler saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG polimerinin karakteristik piklerini göstermektedir. CHI/GLY/PPG hidrojenlerinin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında 2868-2971  $\text{cm}^{-1}$ 'de bulunan  $-\text{CH}_2$ 'nin gerilme pikinin önemli ölçüde arttığı görülmektedir. Benzer şekilde, 1373 ve 1560  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen piklerin pik şiddeti yapıya PPG'nin girmesinden dolayı artmıştır.



**Şekil 4. 19.** Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojenlerine ait FTIR spektrumları; (a) CHI/GLY/PPG-1, (b) CHI/GLY/PPG-2, (c) CHI/GLY/PPG-3, (d) CHI/GLY/PPG-4 ve (e) CHI/GLY/PPG-5

#### 4.2.2. Termal analiz

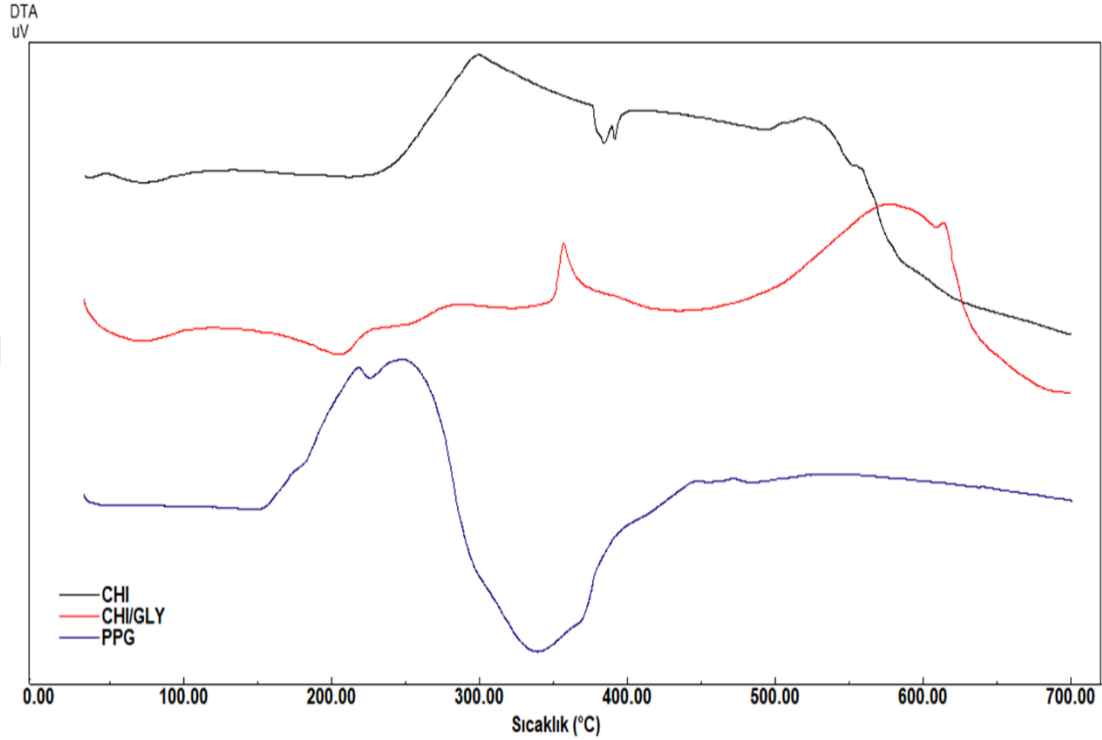
CHI, GLY ve PPG örneklerine ait TGA termogramları Şekil 4.20'de sunulmuştur. CHI ve CHI/GLY yapılarında ise kademeli bir bozunma söz konusudur. CHI yapısına ait termogramda öncelikle 100 °C civarında nemden kaynaklanan bir kütle kaybı, daha sonra ise 250-350 °C arasında CHI yapısındaki asetil gruplarının uzaklaştığı, 350-600 °C arasında ise CHI'nın termal bozunmasına ait kütle kayıpları görülmektedir. CHI/GLY termogramı incelendiğinde ek olarak GLY yapısından dolayı 120-200 °C aralığında bir kütle kaybı daha görülmektedir. Saf PPG polimerinin TGA termogramında bir tane temel kütle kaybı görülmektedir. 180-260 °C arasındaki yaklaşık %90'lık kütle kaybı PPG'nin termooksidatif degradasyonundan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4. 20. Saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait TGA termogramları

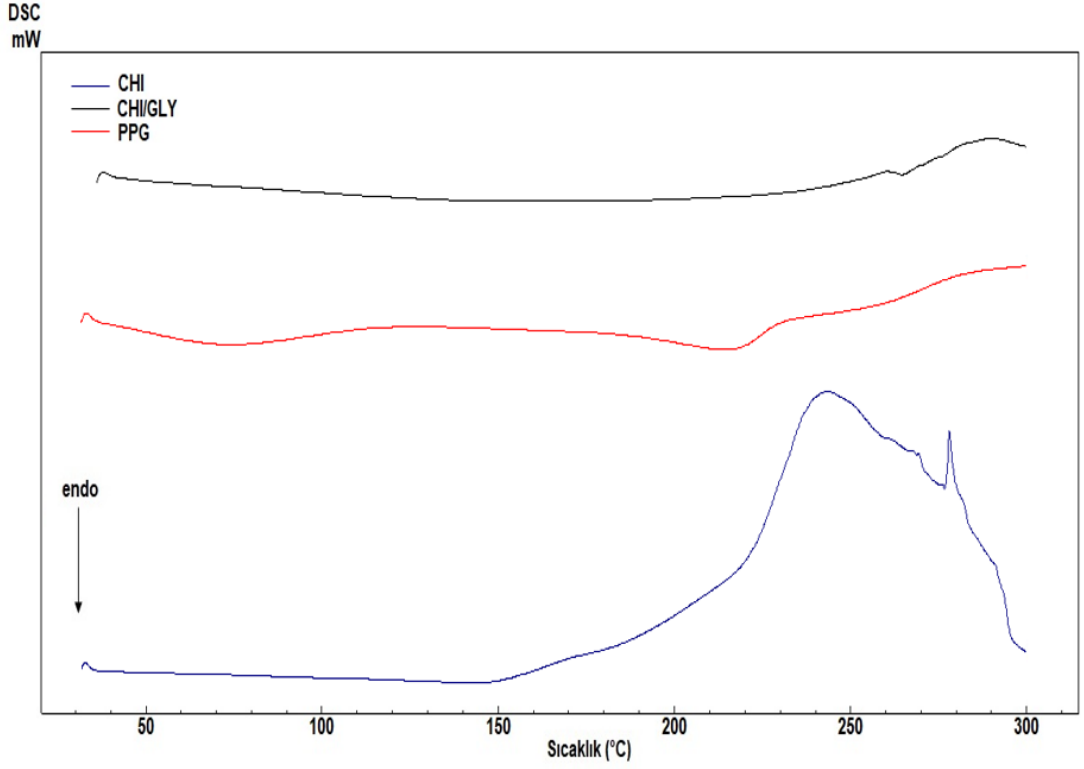
Şekil 4.21'de Saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait DTA termogramları verilmiştir. CHI'ya ait termogram yapısında 90-100 °C aralığında CHI yapısındaki nemin uzaklaşmasını endotermik geniş bir pik olarak görülmektedir. 220-370 °C aralığında CHI'nın geniş bir deasetilasyon piki görülmektedir. 370-560 °C aralığında ise CHI'nın yapısal bozunma piki görülmektedir. CHI/GLY yapısında ise

90-220 °C aralığında GLY yapısının bozunmasından kaynaklı geniş bir ekzotermik pik görülmektedir. Diğer ekzotermik pik ise CHI yapısından kaynaklanmaktadır. PPG yapısında ise 150-340 °C aralığında geniş olarak PPG'nin termooksidatif olarak bozunduğu görülmektedir.



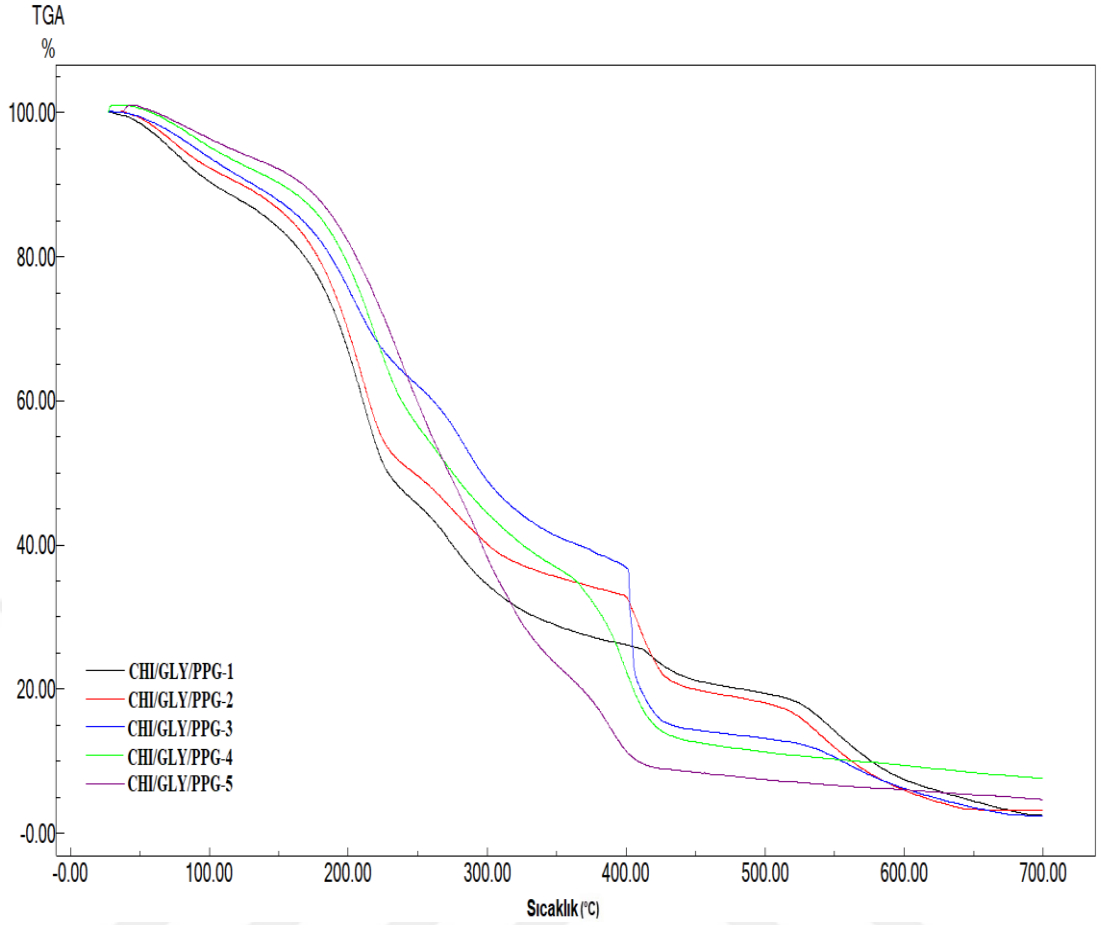
**Şekil 4. 21.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait DTA termogramları

Şekil 4.22' de CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait DSC termogramları verilmektedir. Bu termogramlarda özellikle PPG'ye ait DSC termogramında 100 °C'den başlayıp 300 °C'ye kadar geniş bir bozunma piki görülmektedir. Bu sonuçlar TGA ve DTA termogram sonuçları ile tamamen uyumludur. CHI ve CHI/GLY yapılarına ait DSC termogramlarında ise bir benzerlik görülmektedir. 90-200 °C arasında yapıdaki GLY'nin bozunmasından kaynaklı geniş bir bant ve 200 °C'den sonra CHI yapısındaki deasetilasyon pikleri görülmektedir.



**Şekil 4. 22.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PPG malzemelerine ait DSC termogramları

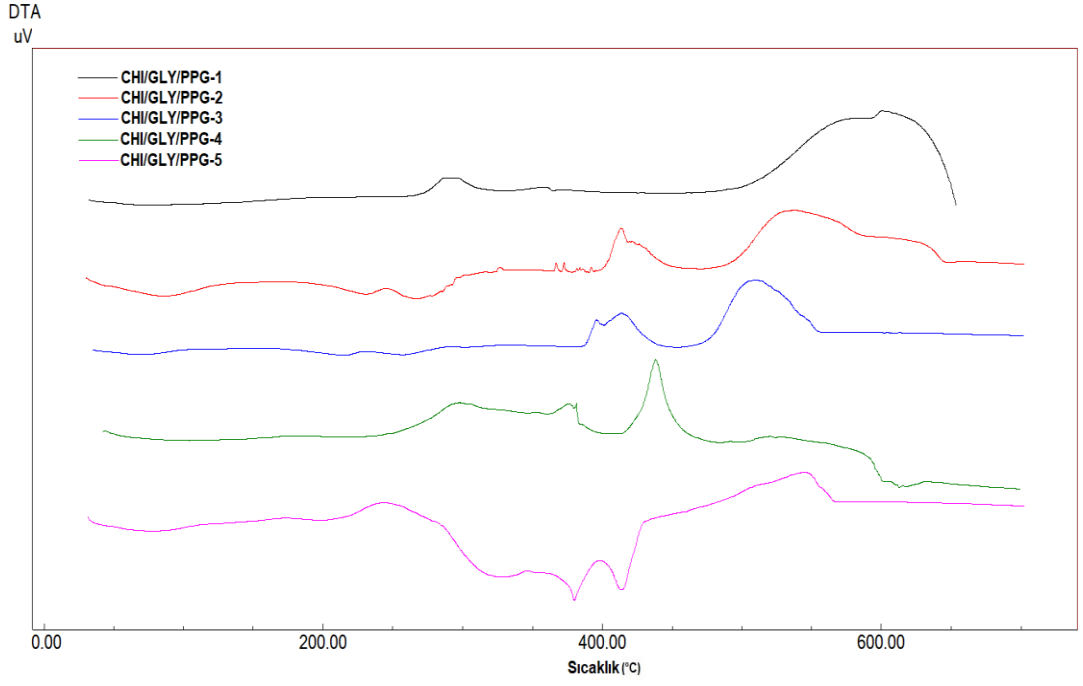
Şekil 4.23'te hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojelatine ait TGA termogramları sunulmuştur. PPG oranı arttıkça yapısal olarak spektrumunda özellikle PPG termal bozunmasına bağlı olarak 200 °C civarında kütle kaybının miktarı artmakta ve termogramın yapısal görünümü değişmektedir. Diğer kütle kayıpları CHI/GLY yapılarının TGA termogramlarıyla uyumludur. Hemen hemen tüm termogramlar 100 °C civarında nemin uzaklaşmasına ait kütle kaybı, 200 °C civarında GLY ve PPG yapılarının bozunmasından kaynaklı kütle kaybı, 250-350 °C aralığında deasetilasyona bağlı kütle kaybı ve 350 °C'den sonra ise yapısal bozunmadan kaynaklı kütle kaybı görülmektedir.



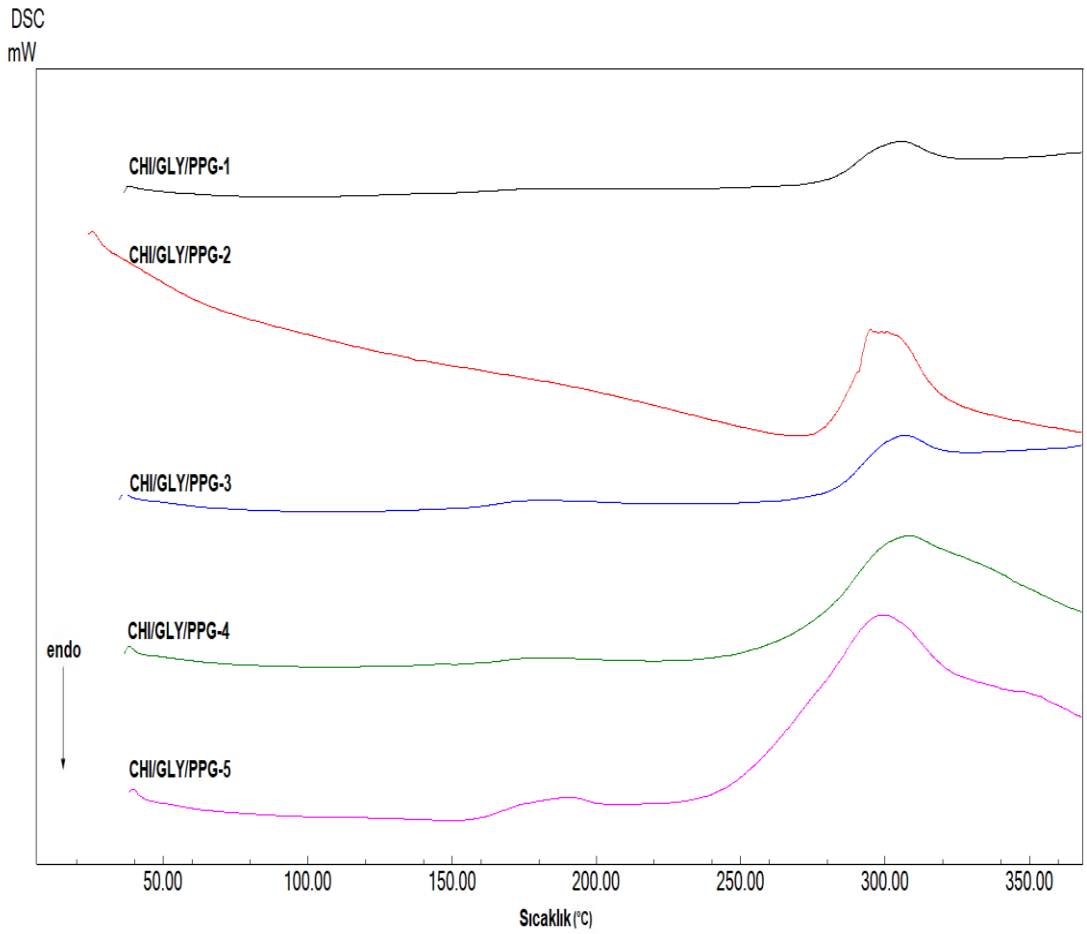
**Şekil 4. 23.** Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait TGA termogramları

Şekil 4.24'te hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait DTA termogramları sunulmuştur. Bu termogramlarda düşük PPG oranlarında termogram yapısı CHI'ya benzer şekilde iki temel kütle kaybını göstermektedir. PPG oranı arttıkça 200 °C civarındaki PPG yapısının bozunmasından kaynaklı pik genişlemektedir.

Şekil 4.25'te hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait DSC termogramları sunulmuştur. Termogramlar yapısal olarak birbirine benzemektedir. Ancak, PPG oranındaki artışla birlikte 200 °C'deki PPG bozunma piki belirginleşmektedir. Sonuç olarak, CHI/GLY/PPG hidrojellerinin tüm termal analizleri değerlendirildiğinde istenilen yapıların elde edildiği açıkça görülmektedir.



**Şekil 4. 24.** Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait DTA termogramları

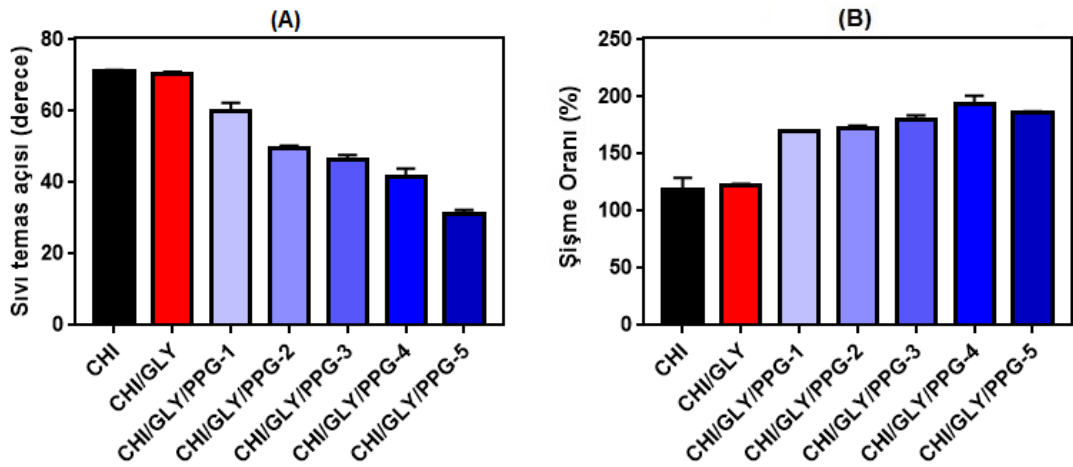


**Şekil 4. 25.** Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait DSC termogramları

#### 4.2.3. Sıvı temas açısı ve şişme derecesi

Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait sıvı temas açıları Şekil 4.26 (A)'da gösterilmiştir. CHI ve CHI/GLY için elde edilen sonuçlar 4.1.3. başlığı altında bildirilmiş ve detaylıca açıklanmıştır. Artan PPG miktarıyla birlikte elde edilen sıvı temas ölçüm değerleri sırasıyla  $59.91 \pm 2.4$ ,  $49.54 \pm 0.82$ ,  $46.20 \pm 1.58$ ,  $41.62 \pm 2.34$  ve  $31.04 \pm 1.27$  olarak ölçülmüştür. CHI/GLY/PPG filmlerin temas açısı artan PPG miktarıyla doğru orantılı olarak azaldığı görülmektedir. PPG tıpkı PEG gibi hidrofilik karakterdedir. Bundan dolayı hidrojellerdeki oranının artmasıyla hidrojel filmlerin yüzeyi daha hidrofilikleşir ve böylece filmlerin ıslanabilirliği artmaktadır. Bu sonuç literatür ile paraleldir [251].

Şişme derecesi hidrojel filmlerinin su emmesi ile ilgilidir. Hazırlanan hidrojel filmlerinin % şişme değerleri Şekil 4.26 (B)'de gösterilmiştir. CHI/GLY/PPG örneklerinin, CHI ve CHI/GLY örnekleri ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir şişme derecesi gösterdiği gözlenmiştir. Bu artış PPG'nin su emme kapasitesi ile ilişkilidir. PPG hidrofilik özellik gösterir, bu da CHI/GLY/PPG örneklerinin daha fazla şişmesine neden olmuştur [252].



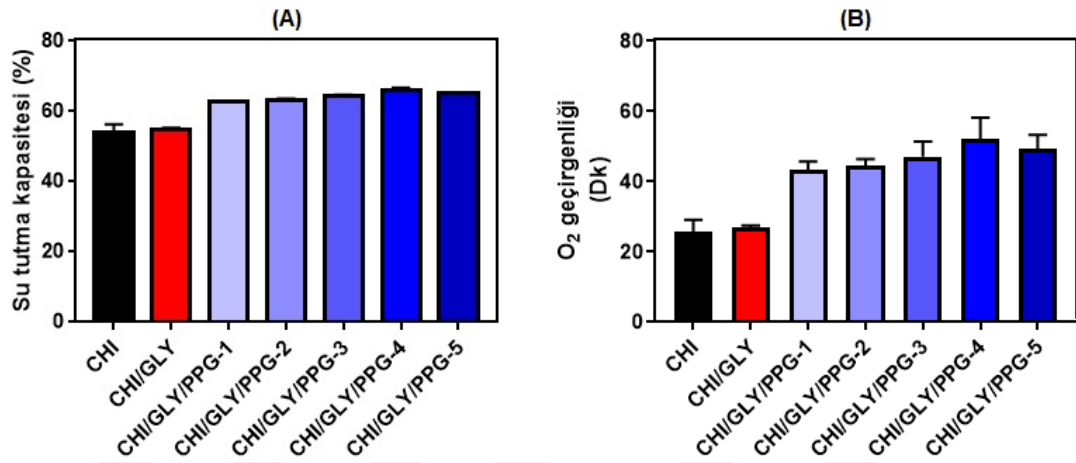
Şekil 4. 26. Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerinin (A) sıvı temas açısı ve (B) şişme oranı sonuçları

#### 4.2.4. Su tutma kapasitesi ve gaz geçirgenliği

Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerinin su tutma kapasitesi sonuçları Şekil 4.27 (A)'da gösterilmiştir. Çapraz bağlanmamış CHI pH 7.4'te %52-56 arasında bir su tutma oranına sahip olmasına rağmen, çapraz bağlanmış CHI/GLY/PPG hidrojellerinin su tutma yüzdesi %60-65 arasındadır. Dolayısıyla, PPG miktarı

hazırlanan hidrojellerin su tutma kapasitesini arttırmıştır. Elde edilen sonuçlar şişme testi ile paralellik göstermektedir.

Şekil 4.27 (B) ayrıca hidrojel filmlerin O<sub>2</sub> geçirgenliğini göstermektedir. O<sub>2</sub> örneğin içindeki su fazıyla difüze olabileceğinden dolayı örneklerin su tutma kapasiteleri ile doğru orantılıdır [244]. Yani bir hidrojel örneği ne kadar su absorbe edebilirse o örnek için O<sub>2</sub> gazının geçirgenliği de lineer olarak artar. Bu korelasyon bizim çalışmamızda da gözlenmiştir.

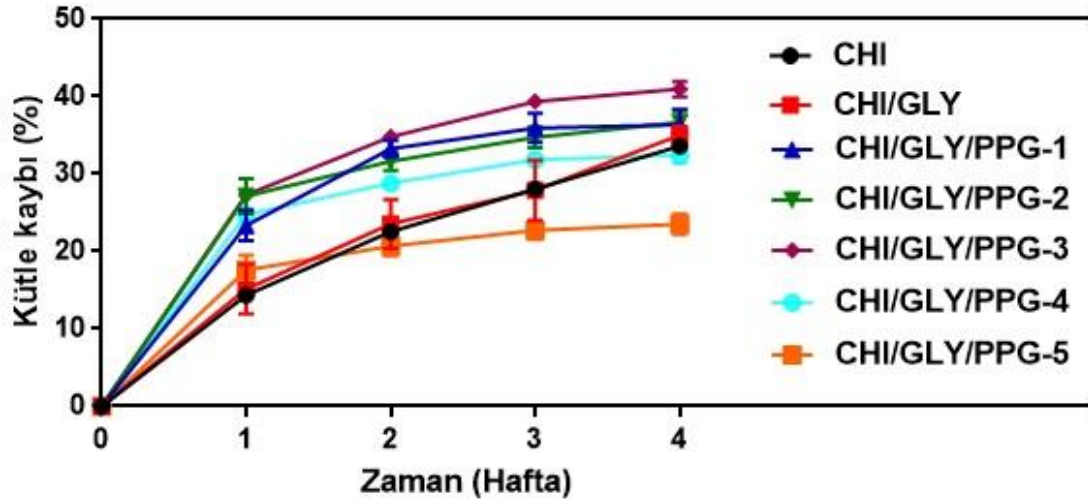


Şekil 4. 27. Hazırlanan CHI/GLY/PPG hidrojellerinin (A) su tutma kapasitesi ve (B) O<sub>2</sub> geçirgenlik testi sonuçları

#### 4.2.5. *In vitro* biyobozunurluk testi

CHI/GLY/PPG hidrojellerine ait *in vitro* biyobozunurluk sonuçları Şekil 4.28’de verilmiştir. Saf CHI dört hafta sonunda %33.58±1.11 oranında bozunma göstermiştir. CHI/GLY 4. haftanın sonunda %35.01±0.64 oranında bozunma sergilemiş olup bu bozunma oranı CHI’ninkinden yüksektir. Bozunma sürecinin ilk haftalarında bu artış daha belirgin olarak görülmektedir. GLY’nin biyobozunurluluğu arttırdığına dair literatürde çalışmalar mevcuttur. Bunun nedeni olarak GLY’nin hidrofilik karakteri gösterilmektedir. Farklı oranda PPG içeren hidrojellerin ise 4. haftanın sonunda %36.36±1.98, 36.70±1.54, 40.99±1.01, 32.42±1.03, ve 23.52±1.29 oranında bozunma sergilemiştir. Elde edilen bu sonuçlar göstermektedir ki belli bir orana kadar PPG arttıkça hidrojellerin bozunurluğu artmıştır. Ancak, PPG PEG’e göre daha hidrofobik olduğundan yüksek oranda PPG içeren hidrojel örneklerinin biyobozunurluğu düşmüştür. Literatürde, PEG ve PPG’nin biyolojik bozunma mekanizmalarının farklı

olduğu, PEG'lerin kısa homologlar oluşturarak bozunurken, PPG'nin moleküler ağırlıkların dağılımının bozunma sırasında daha sabit kaldığı rapor edilmiştir [371].



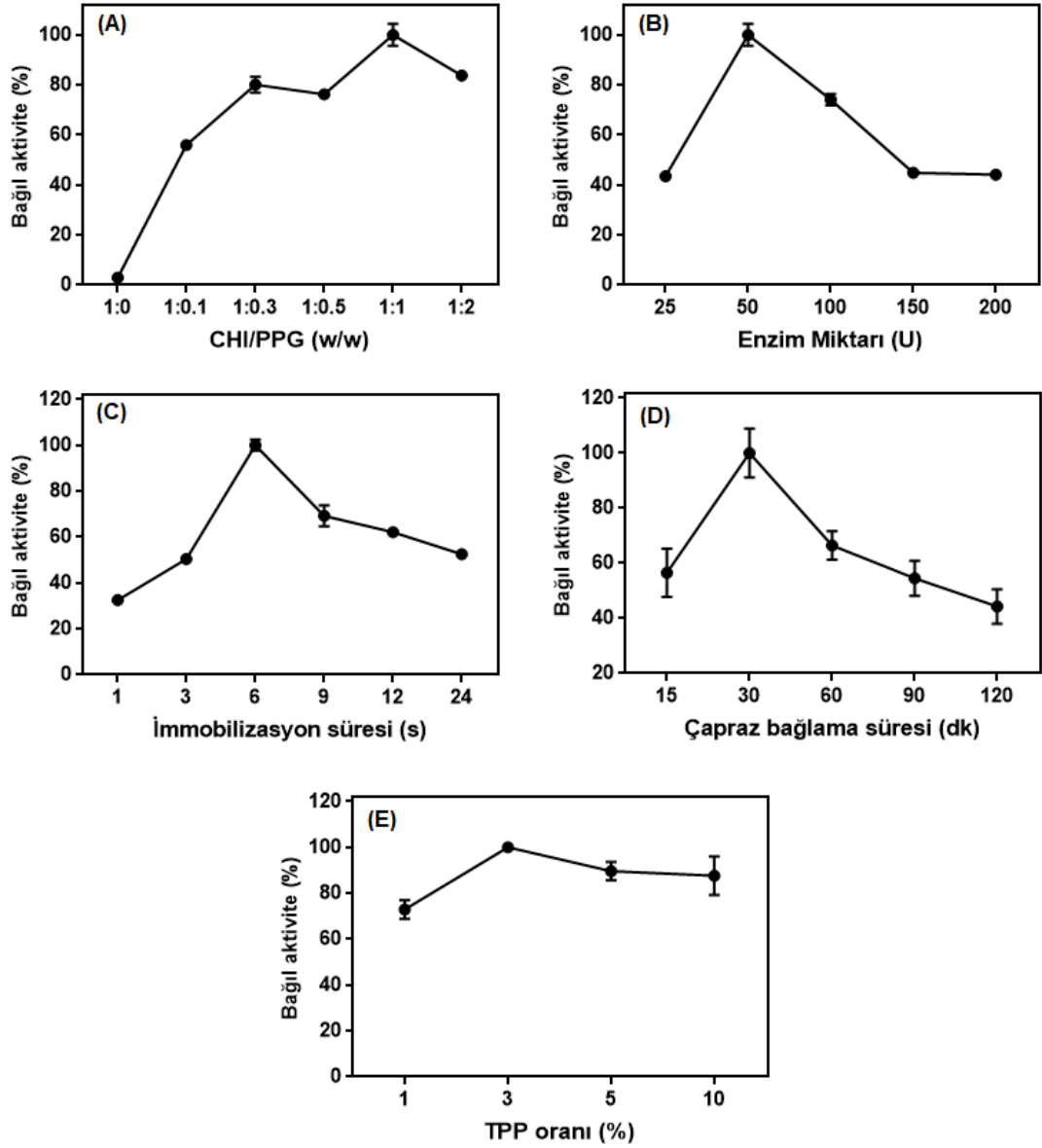
şekil 4. 28. CHI/GLY/PPG hidrojellerinin *in vitro* biyobozunurluk test sonuçları

#### 4.2.6. L-ASNaz içeren CHI/GLY/PPG formülasyonlarının hazırlanması

L-ASNaz içeren CHI/GLY/PPG formülasyonlarının hazırlanması için öncelikle enzim aktivitesi üzerine bazı parametrelerin (CHI/PPG oranı, enzim miktarı, immobilizasyon süresi, ęapraz bağlama süresi ve TPP oranı) etkisi incelenmiş ve maksimum bağlı aktivite gösteren en ideal koşullar belirlenmiştir.

PPG oranının artmasıyla enzimin bağlı aktivitesinde bariz bir artış görülmüştür (şekil 4.29 (A)). Enzim ile PPG arasındaki fiziksel veya kimyasal etkileşimler sonucu enzim aktivitesi artmış ve CHI/GLY/PPG-4 formülasyonu için maksimum değere ulaşmıştır. Bundan dolayı en uygun formülasyonun CHI/GLY/PPG-4 olduğu belirlenmiştir. Enzim konsantrasyonu, immobilizasyon işlemi sırasında enzim geri kazanım oranını etkileyen önemli bir faktördür. Bu ęalıřmada, enzim ęözeltileri (25-200 U), enzim konsantrasyonunun CHI/GLY/PPG formülasyonlarının üzerindeki etkisini analiz etmek için hazırlanmıştır. şekil 4.29 (B), stent-L-ASNaz formülasyonunun aktivitesinin, artan başlangığ enzim konsantrasyonu ile kademeli olarak arttığını göstermektedir. 50 U enzim kullanıldığında, L-ASNaz aktivitesi en yüksek bağlı aktiviteye ulaşmıştır. Ancak, enzim konsantrasyonunun artmasıyla, enzimin aktivitesi hızla azalmış ve 150 U'den sonra stabil kalmıştır. L-ASNaz geri kazanımını sağlamak amacıyla, enzim aktivitesinin en yüksek olduğu 50 U konsantrasyonu seğilmiştir. İmmobilizasyon süresi de enzim aktivitesini belirleyen

önemli bir faktördür. Şekil 4.29 (C), enzim aktivitesinin kademeli olarak arttığını ve ilk 6 saatte maksimum bağlı aktiviteye yükseldiğini göstermektedir. Enzim aktivitesi, 6 saat immobilizasyondan sonra, denatürasyon etkisinden dolayı azalmıştır. Çapraz bağlanma zamanının immobilize enzimin aktivitesi üzerindeki etkisi Şekil 4.29 (D)'da gösterilmektedir. En yüksek enzim aktivitesi, çapraz bağlama süresinin 30 dakika olduğunda görülmüştür. 30 dakikadan sonra, enzim aktivitesinde önemli bir azalma görülmektedir. Bunun nedeni, uzun süreli çapraz bağlama süresi, enzim molekülleri arasında sterik bir engellemeye yol açabilir, buda enzimin aktif bölgelerini bloke edebilir ve substrat için bağlanma bölgelerini enzime doğru kullanılamaz hale getirebilir [253]. Bu nedenle çapraz bağlama süresi maksimum olduğu 30 dakika seçilmiştir. Çapraz bağlayıcı bir ajan olan TPP inter- ve intra-moleküler çapraz bağlama reaksiyonlarında kullanılır. Ancak, aşırı çapraz bağlama, agregasyona, çökelmeye, aktivite kaybına ve enzimin üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olabilir [254]. Bu nedenle TPP konsantrasyonu enzim immobilizasyonu için önemli bir faktördür. TPP konsantrasyonunun L-ASNaz aktivitesi üzerindeki etkisini incelemek için TPP oranı %1-%10 aralığında kullanılmıştır (Şekil 4.29 (E)). CHI'nın amin grupları arasındaki bağlanma sonucunda, TPP konsantrasyonu % 3'e ulaşıldığında en yüksek enzim aktivitesi elde edilmiştir. TPP oranı %5 olduğunda enzim aktivitesinde hafif bir azalma görülmüş ve %10 olduğunda sabit kalmıştır. Bu azalma, muhtemelen, kaçınılmaz kimyasal modifikasyon ve denatürasyon etkilerine neden olabilecek aşırı TPP'den kaynaklanmaktadır. Bu bulgunun bir başka olası nedeni ise, enzimin aktif bölgelerinin bloke edilmesidir.

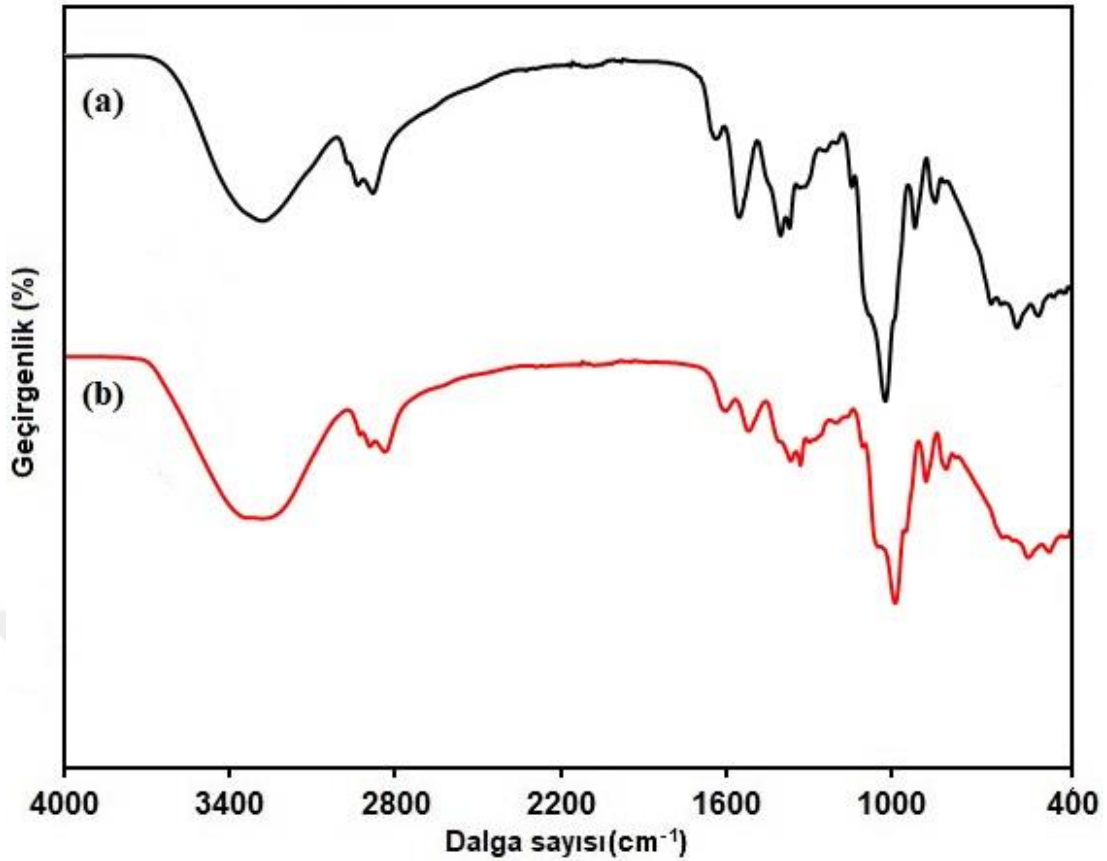


**Şekil 4. 29.** L-ASNaz içeren CHI/GLY/PPG formülasyonlarının hazırlanması için optimum parametrelerin belirlenmesi: A) CHI/PPG oranı, B) Enzim miktarı, C) İmmobilizasyon süresi, D) Çapraz bağlama süresi ve E) TPP oranı

#### 4.2.7. CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz formülasyonunun karakterizasyonu

##### 4.2.7.1. FTIR analizi

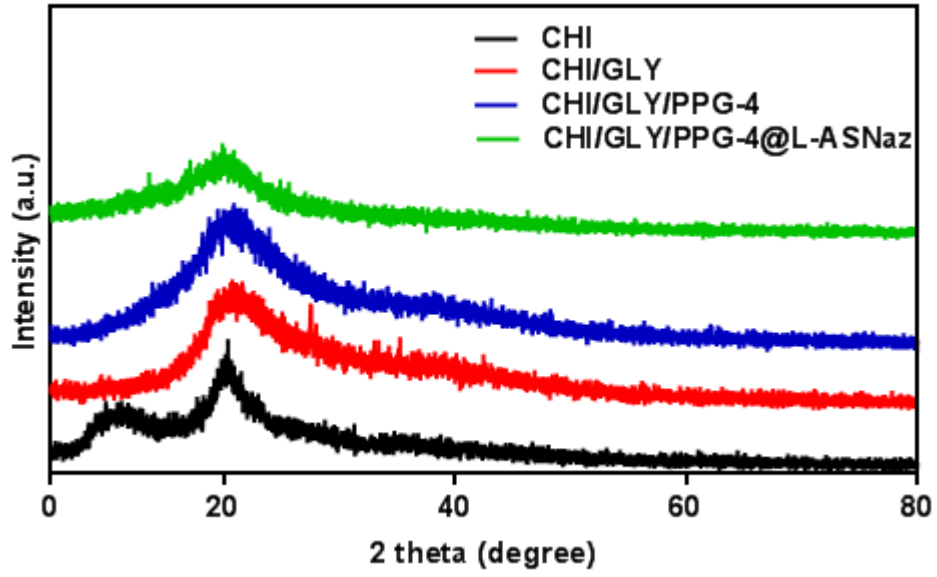
CHI/GLY/PPG-4 ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları Şekil 4.30'da gösterilmektedir. İmmobilizasyondan sonra, 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında pik şiddetinin immobilizasyondan sonra arttığı görülmüştür. Bu artışın nedeni enzimde bulunan –OH ve –NH gruplarından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4. 30. (a) CHI/GLY/PPG-4 ve (b) CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları

#### 4.2.7.2. XRD Analizi

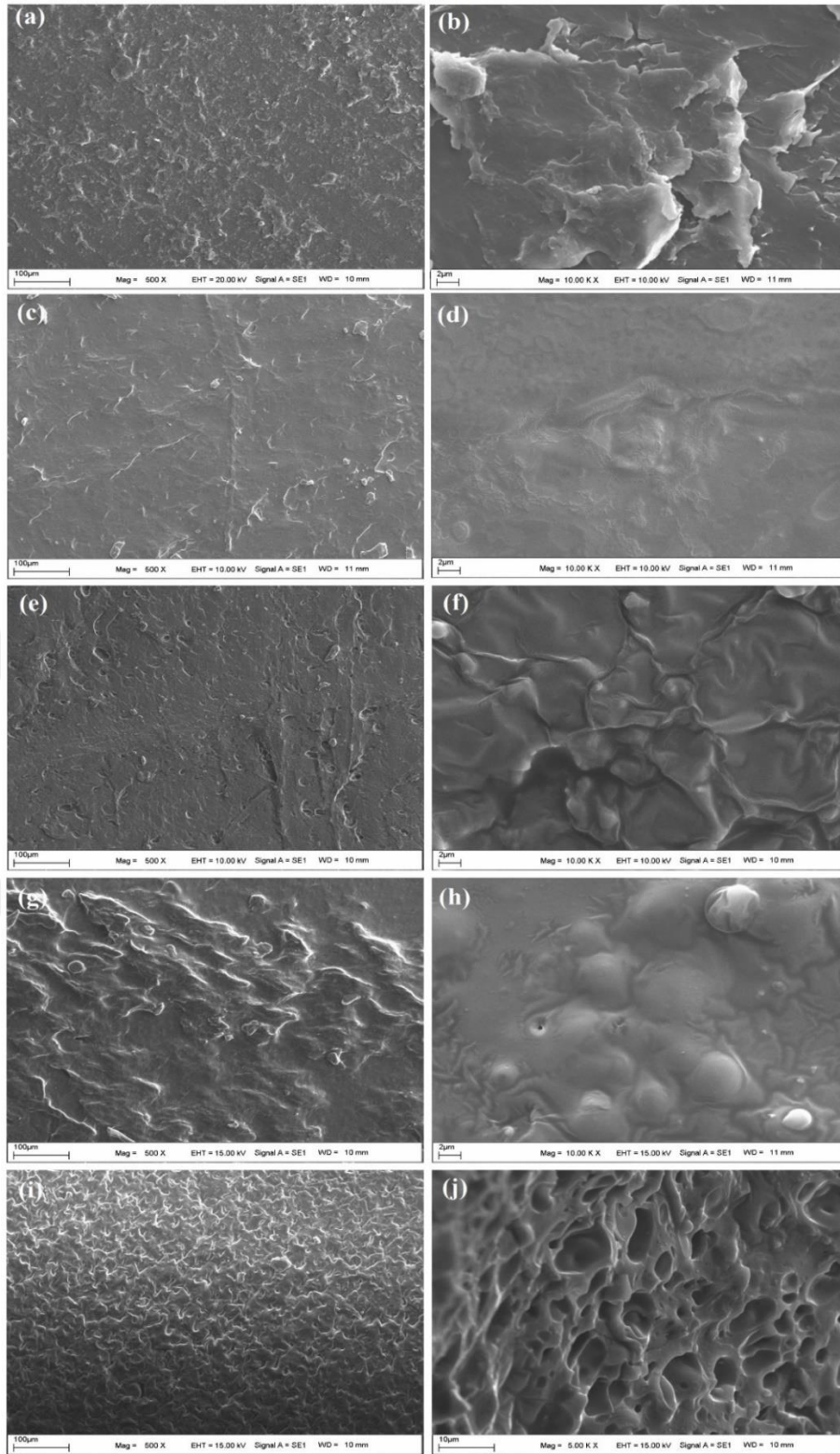
Hazırlanan CHI, CHI/GLY, CHI/GLY/PPG-4 ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneklerinin XRD ile karakterize edilmiş ve elde edilen XRD piki Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Saf CHI  $2\theta=10.1^\circ$  ve  $2\theta=20.1^\circ$ ’de iki adet karakteristik difraksiyon piki göstermiştir. Bu sonuca göre CHI’nın düşük yoğunluklu ve yarı-kristalin olduğu söylenebilir [248]. CHI/GLY filmlerinin XRD spektrumuna bakıldığında birkaç pikin kaybolduğu, sadece  $20.1^\circ$ ’de CHI’nkine göre geniş bir pike sahip olduğu görülmektedir. Buda, GLY içeren filmlerde kristalleşme derecesinin azaldığının kanıtıdır [249]. PPG eklendikten sonra ise XRD spektrumunda pikler daha geniş bir bantta görüldü, bu da kristalin bölgesinin amorf hale geldiğinin göstergesidir. CHI pikleri nispeten güçlü görünürken, PPG pikleri görünmemektedir. Bu CHI ve PPG segmentleri arasındaki karşılıklı etkileşimden kaynaklanmaktadır. CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneğinin XRD spektrumu incelendiğinde, L-ASNaz immobilizasyonundan sonra önemli bir faz değişimi olmadığı görülmüştür. Ancak, pik şiddetlerinin hafif azaldığı görülmüştür.



Şekil 4. 31. CHI, CHI/GLY, CHI/GLY/PPG-4 ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneklerinin XRD spektrumları

#### 4.2.7.3. SEM analizi

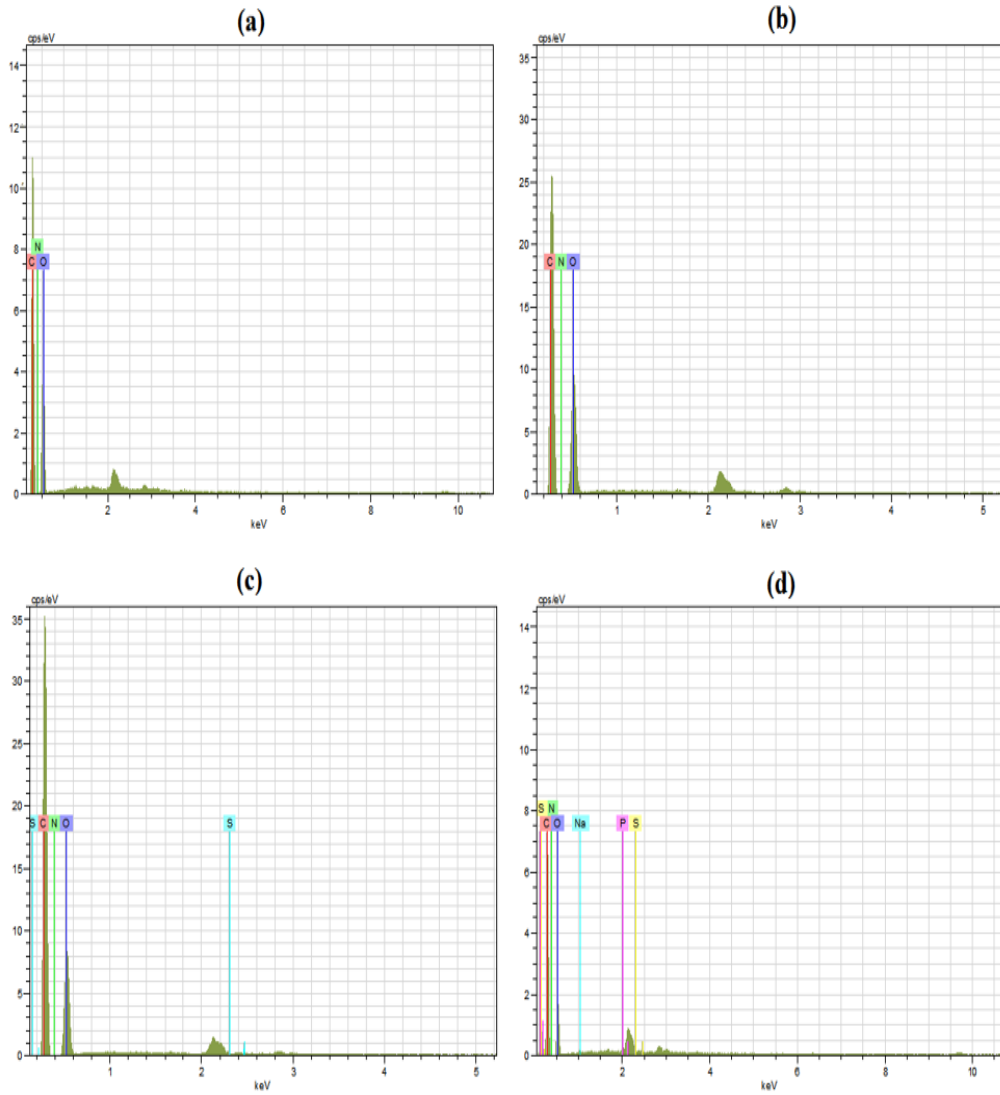
Hazırlanan hidrojel filmlerin morfolojisi, Şekil 4.31'de sunulan SEM görüntülerine dayanılarak değerlendirilmiştir. CHI'nin SEM görüntüsü incelendiğinde, CHI filmlerin yüzeyinin düzgün, sürekli ve kompakt bir yapı olduğu görülmektedir (Şekil 4.32 a, b). GLY içeren filmin mikroyapısı, CHI filmlerinin görüntülerinden farklıdır (Şekil 4.32 c, d). Bu film yüzeyinde çatlama gözlemlenmiştir. Bunun nedeni GLY'nin plastikleştirme etkisinden olduğu sonucuna varılabilir. GLY konsantrasyonu düşük olduğunda, GLY'nin tipik plastikleştirme etkisi oluşur ve kurutma sırasında yüzeyde mikro çatlama neden olur. Buda, yapının içinde daha sıkı polimerik ağ oluşmasına neden olur. Mikroyapının ve morfolojinin PPG içeriğinden ciddi şekilde etkilendiği açıkça görülmektedir. PPG'nin yapıya dâhil edilmesiyle birlikte, CHI/GLY'nin gözenek yapısı artmıştır (Şekil 4.32 e, f). Şekil 4.32 g, h ise hidrojel formülasyonuna L-ASNaz enzimi yüklendikten sonra oluşan CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneğinin morfolojik görüntüsünü yansıtmaktadır. Açıkça enzimin hidrojel formülasyonuna eklenmesinden sonra örneğin morfolojisinde büyük ölçüde bir etki oluşmamıştır. Yüzey görünümünden (Şekil 4.32 i, j), çapraz bağlanmamış ve çapraz bağlanmış örneklerin mikro yapıları oldukça farklıdır. Çapraz bağlı örneklerin yüzeylerinin daha gözenekli olduğu açıkça görülmektedir.



**Şekil 4. 32.** CHI (a, b), CHI/GLY (c, d), CHI/GLY/PPG-4 (e, f), CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz (g, h) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (i, j) SEM görüntüleri

#### 4.2.7.4. EDX analizi

Hazırlanmış hidrojel formülasyonların EDX spektrumları Şekil 4.33'de sunulmaktadır. Saf CHI için karbon (C), oksijen (O) ve azot (N) elementlerine ait pikler görülmektedir (Şekil 4.33 (a)). CHI/GLY/PPG örneğine ait EDX spektrumu incelendiğinde benzer elementlere ait pikler görülmektedir (Şekil 4.33 (b)). Ancak, PPG polimerinden dolayı bu piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.33 (c), CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz örneğine ait EDX spektrumunu göstermektedir. Bu spektrum dikkatlice incelendiğinde, enzimden kaynaklı ekstra kükürt (S) piki görülmektedir. Ayrıca, C, O ve N piklerinin şiddeti de artmıştır. Son olarak, TPP ile çapraz bağlanmış stent formülasyonlarına ait EDX spektrumunda TPP'den dolayı sodyum (Na) ve fosfor (P) elementlerinin varlığı bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.33 (d)).

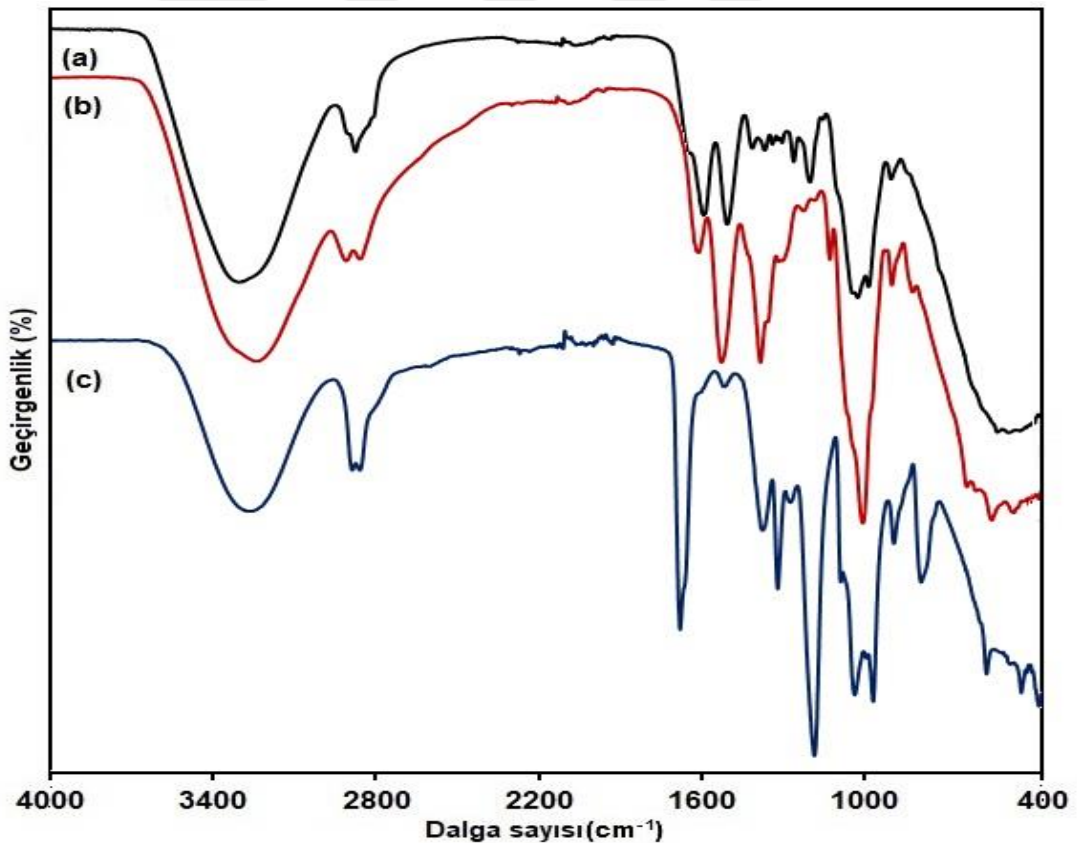


**Şekil 4.33.** CHI (a), CHI/GLY/PPG-4 (b), CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz (c) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (d) EDX spektrumları

### 4.3. CHI/GLY/PVA Hidrojellerinin Karakterizasyonu

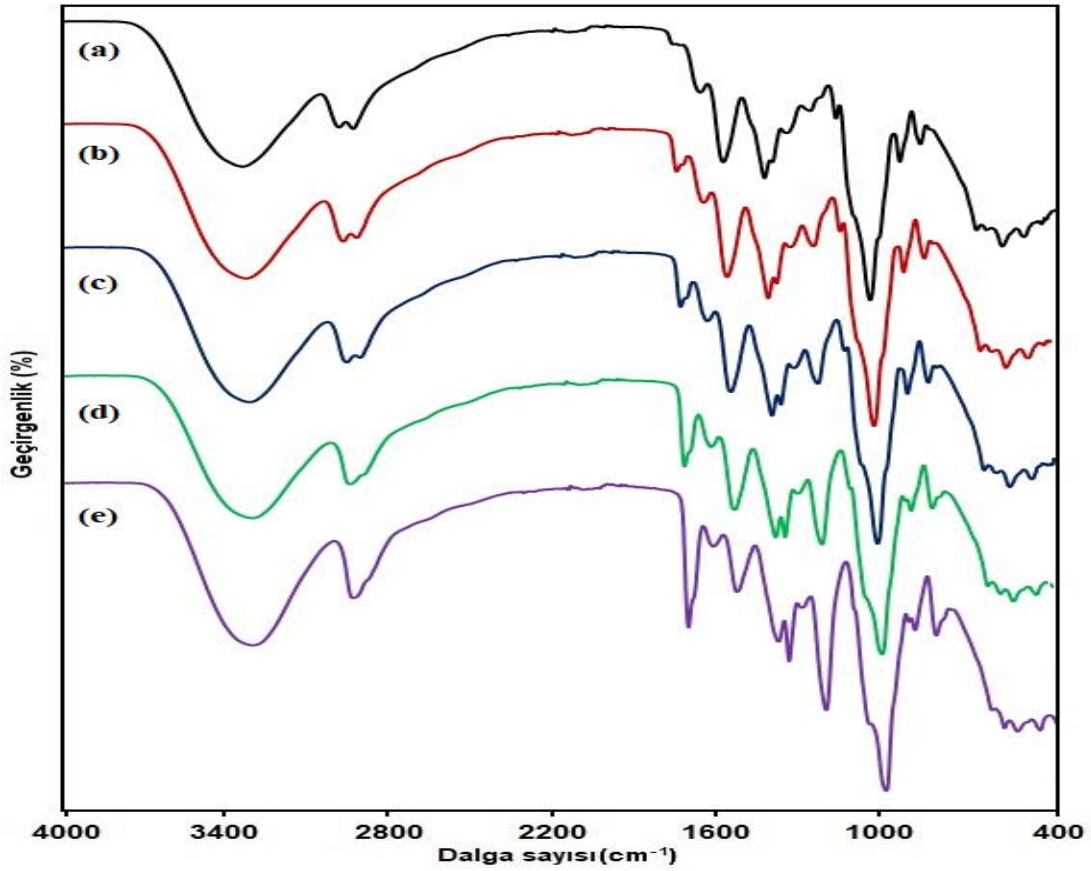
#### 4.3.1. FTIR analizi

CHI, CHI/GLY ve PVA örneklerinin FTIR spektrumu Şekil 4.34’de verilmiştir. CHI ve CHI/GLY örneklerinin FTIR analiz sonuçları 4.1.1 başlığı altında detaylı bir şekilde verilmiştir. Saf PVA’nın spektrumu (Şekil 4.34(c)) ile ilgili olarak, 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$ ’deki karakteristik geniş absorpsiyon bandı, moleküler arası ve moleküller arası hidrojen bağlarından kaynaklı O-H gerilmesi ile ilişkilidir. PVA, poli(vinil asetat)’nin hidrolizi sonucu elde edildiğinden dolayı 1430  $\text{cm}^{-1}$ ’deki band asetil ( $>\text{C}=\text{O}$ ) grubuna ait C-O-C simetrik gerilme bandıdır. 2925  $\text{cm}^{-1}$ ’deki band, asimetrik  $\text{CH}_2$  gruplarının gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1732  $\text{cm}^{-1}$ ’de gözlemlenen band, PVA’nın karakteristik karbonil grubunun bandıdır. Bunların yanı sıra, 1090, 842, 1560 ve 1238  $\text{cm}^{-1}$ ’de gözlemlenen bandlar sırasıyla C-O gerilme, C-C gerilme, C=C gerilme ve C-H gerilme titreşimlerine aittir [255,256].



Şekil 4. 34. Saf CHI (a), CHI/GLY (b) ve saf PVA (c) örneklerine ait FTIR spektrumları

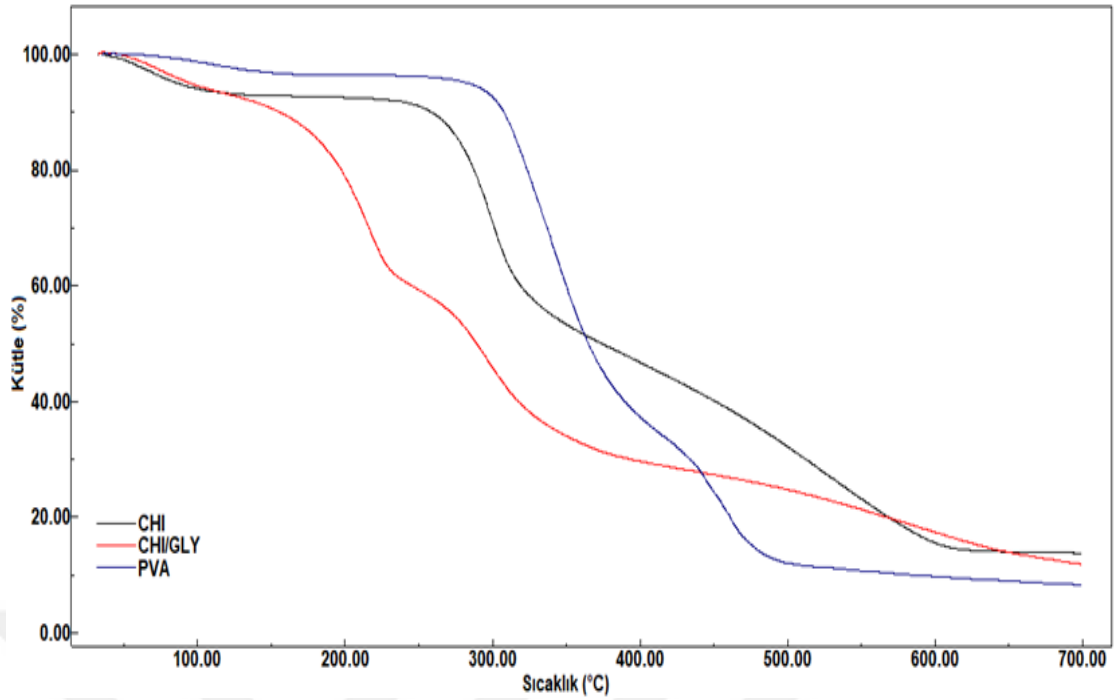
Kütlece farklı oranlarda PVA içerecek şekilde hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojenlerinin FTIR spektrumları Şekil 4.35'te gösterilmiştir. FTIR spektrumu incelendiğinde tüm hidrojenler saf CHI, CH/GLY ve saf PVA polimerinin karakteristik piklerini göstermektedir. Hidrojenlerdeki PVA oranı arttıkça bazı pikler değişiklik göstermektedir. Örneğin, 2923  $\text{cm}^{-1}$ 'deki C-H gerilme titreşim piki PVA oranı arttıkça artmaktadır. Benzer şekilde, pik şiddeti artan diğer pik 1732  $\text{cm}^{-1}$ 'de ortaya çıkan PVA'nın karakteristik C=O piki. Ayrıca kütlece PVA oranı arttıkça 1238  $\text{cm}^{-1}$ 'deki C-H germe titreşimlerine ait pikin şiddeti de artmaktadır. Diğer yandan, 842  $\text{cm}^{-1}$ 'deki C-C gerilme pikinin şiddeti is PVA oranı arttıkça azalmaktadır. Pik şiddetlerindeki bu artış veya azalışın en olası sebebi CHI'nın -OH ve -NH grupları ile PVA'nın -OH grupları arasında moleküller arası hidrojen bağlarının oluşmasıdır [29]. Elde edilen FTIR sonuçlarına dayanarak CHI ve PVA polimerlerinin homojen bir şekilde karıştırıldığı ve CHI/GLY/PVA hidrojenlerinin başarılı bir şekilde hazırlandığı söylenebilir.



**Şekil 4. 35.** Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojenlerine ait FTIR spektrumları; (a) CHI/GLY/PVA-1, (b) CHI/GLY/PVA-2, (c) CHI/GLY/PVA-3, (d) CHI/GLY/PVA-4 ve (e) CHI/GLY/PVA-5

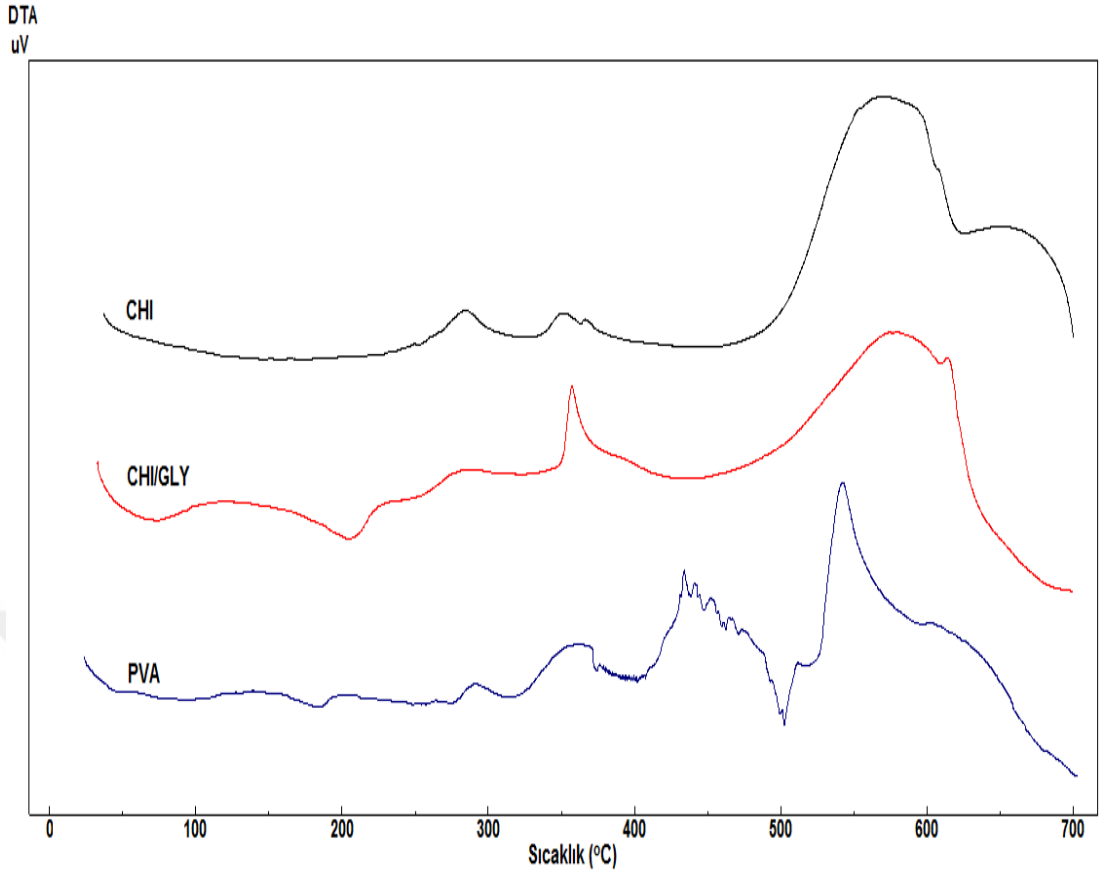
#### 4.3.2. Termal analiz

Saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait TGA termogramları Şekil 4.36'da gösterilmiştir. Saf CHI'ya ait TGA termogramında üç kademeli bir termogram görülmektedir. Öncelikle 30-100 °C arasında yaklaşık %7 civarında yapıdaki nemin uzaklaşmasından kaynaklı bir kütle kaybı görülmektedir. 250 °C'den başlayarak 313 °C'ye kadar süren %35 civarında ikinci bir kütle kaybı görülmektedir. 313 °C'den başlayarak 600 °C'ye kadar sürmekte olan ikinci kütle kaybı deasetilasyon pikidir. Bu pik CHI gruplarının yapısındaki asetil gruplarının degradesyonudur [258]. Üçüncü kütle kaybı ise %45 civarında olup tüm CHI yapısının termal degradesyondan kaynaklanır. CHI/GLY yapısının CHI'ninkine benzer bir termogram sergilemektedir. Ancak, termal stabilitesi düşük olan GLY yapılarının yapıya katılmasıyla yapının termal kararlılığı da düşmüştür. Özellikle bu yapı üzerinde dört farklı kütle kaybı görülmektedir. Bu kütle kayıpları birincisi %7 civarında görülen yapısal nemden kaynaklanmaktadır. İkinci kütle kaybı yapıdaki GLY yapılarının bozunmasından kaynaklanmaktadır. Üçüncü kütle kaybı yapı üzerindeki CHI gruplarının deasetilasyonudur. 350 ve 650 °C arasında görülen son kütle kaybı ise tüm yapının oksidatif bozunmasından kaynaklanmaktadır. Saf PVA üç aşamalı bir bozunma profili göstermiştir. İlk kütle kaybı, fiziksel ve kimyasal olarak adsorbe edilen suyun uzaklaştırılmasına bağlı olarak 150 °C'nin altında ortaya çıkmıştır. 300 °C civarında başlayan ikinci kütle kaybı, PVA omurgasının bozulması ile ilişkilidir. Ayrışmanın üçüncü fazı, PVA'nın vinil asetat gruplarının bozunmasının bir sonucu olarak 400-500 °C'de meydana gelmiştir [259].



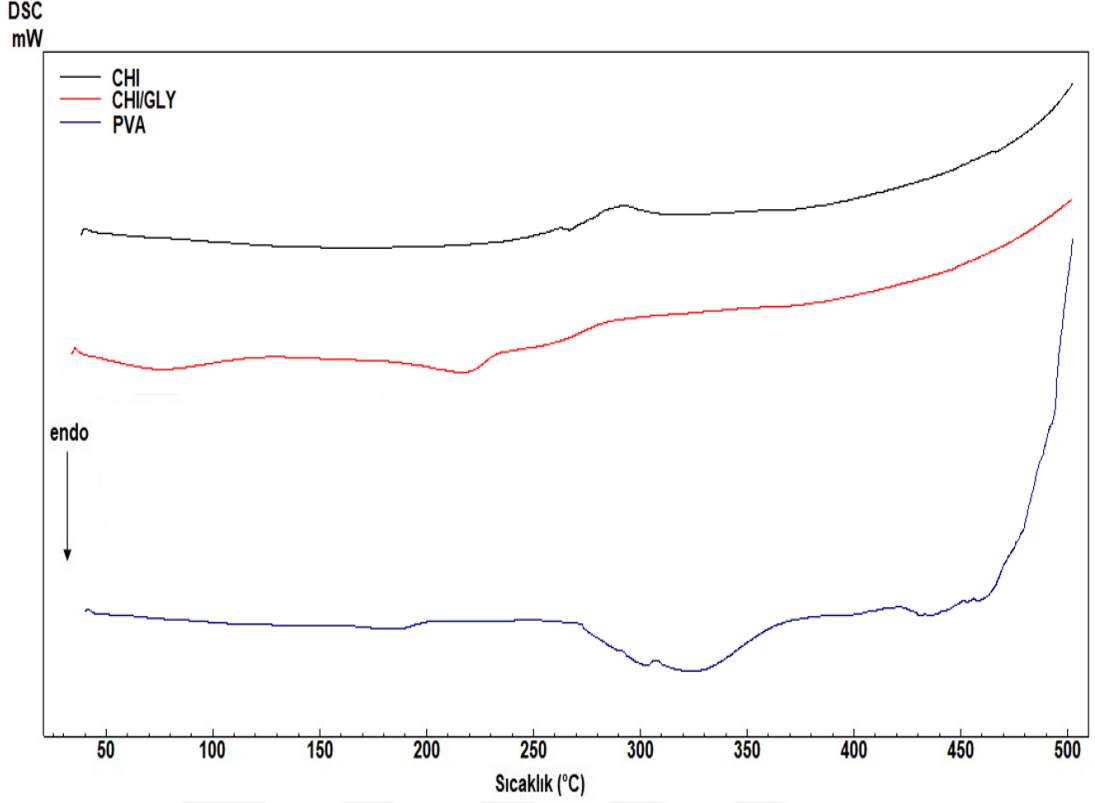
**Şekil 4. 36.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait TGA termogramları

Şekil 4.37’de saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait DTA termogramları görülmektedir. Bu termogramlarda TGA termogramlarıyla uyumlu olarak CHI yapısında üç temel kütle kaybı tespit edilmektedir. 200-300 °C arasında deasetilasyon, 300-400 °C arasında yapısal bozunma ve 500-620 °C arasında ise karbonizasyon görülmektedir. CHI/GLY yapısında nemin kaybı 100-200 °C aralığında GLY yapısının bozunması 200 °C’den sonra ise klasik CHI termogram yapısı görünmektedir. Sırasıyla 230-310 °C arasında deasetilasyona ait termogram, 330-410 °C arasında yapısal bozunma ve 500-620 °C arasında yapısal karbonlaşma ekzotermeleri görülmektedir. Saf PVA yapısına ait termogramda ise 90 °C civarında Tg geçişi görülmektedir. Ayrıca 190 °C’de erime piki belirgin olarak görülmektedir. Yaklaşık 290-400 °C arasında ikili bir pik olarak yüzey neminin uzaklaşması, 400-500 °C arasında termooksidatif dekompozisyon görülmektedir.



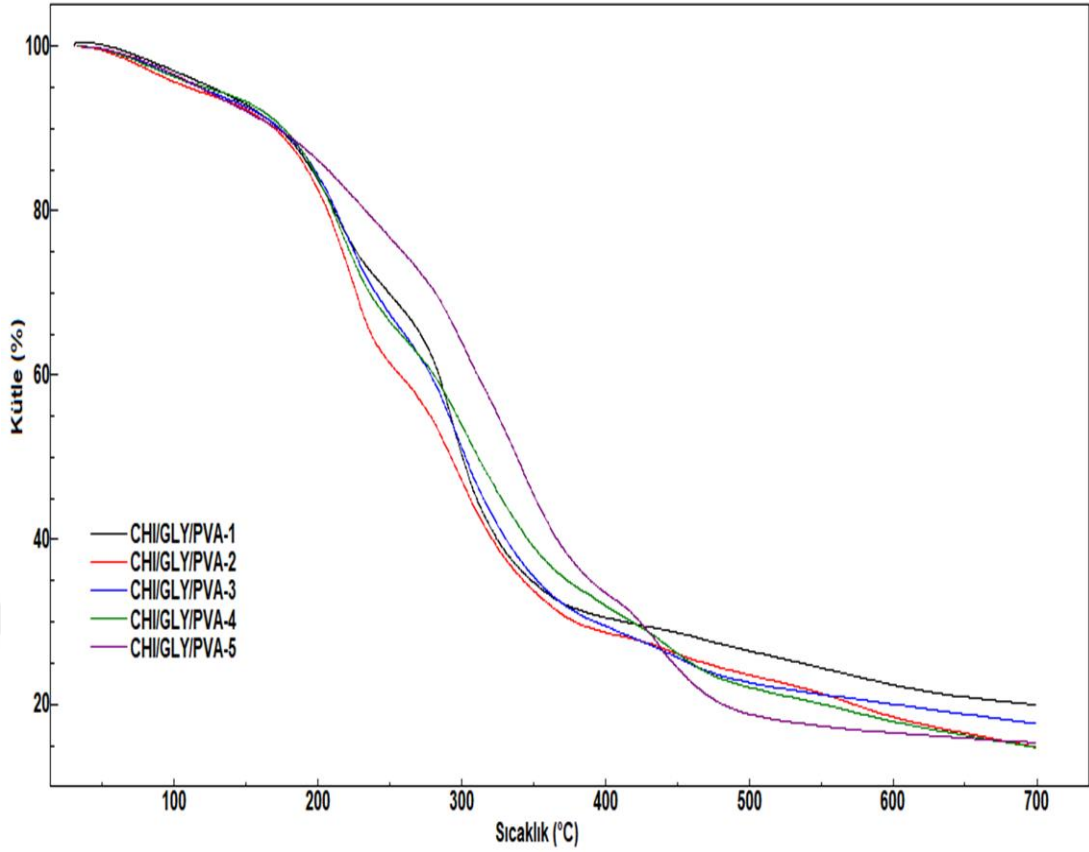
**Şekil 4. 37.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait DTA termogramları

Şekil 4.38’de CHI, CHI/GLY ve saf PVA örneklerine ait DSC termogramları gösterilmiştir. CHI’ya ait DSC termogramında 250-300 °C arasında asetil gruplarının deasetilasyonu görülmektedir. CHI/GLY yapısında ise benzer değişim 220-300 °C arasında yaygın bir pik olarak görülmektedir [260]. Yine bu yapıda 50-100 °C arasında yapısal nemin uzaklaşması 100 °C civarında ise GLY yapısının bozunmasından kaynaklı pikler görülmektedir. PVA yapısına ait termogram ise literatürle uyumludur. 94°C’ de Tg geçişi görülmektedir. Ayrıca, PVA’nın DSC termogramında, PVA kristallerinin erimesine bağlı olarak 190 °C’nin yakınında zayıf bir endotermik tepe bulunur [261].



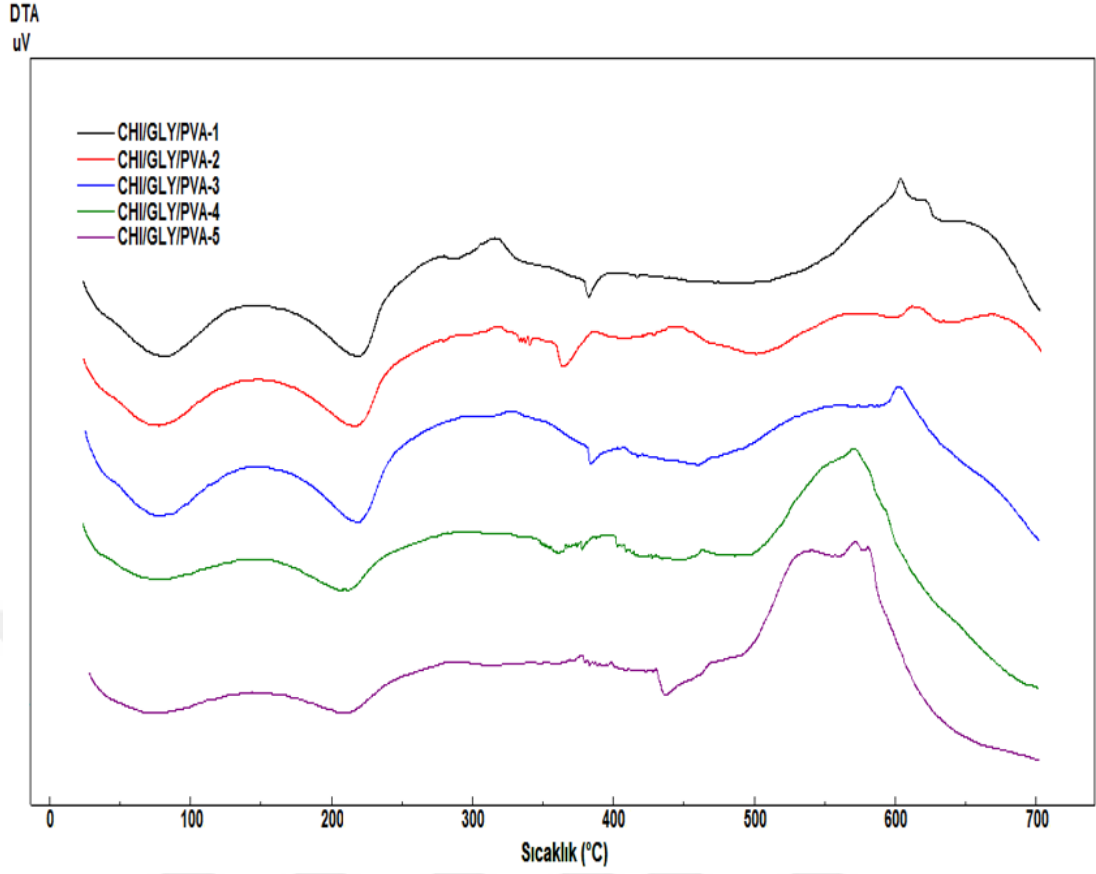
**Şekil 4. 38.** Saf CHI, CHI/GLY ve saf PVA malzemelerine ait DSC termogramları

Şekil 4.39’da hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait TGA termogramları verilmiştir. Bu termogramlar incelendiğinde düşük oranda PVA içeren örneklerde dört temel kütle kaybı görülürken yüksek oranda PVA içeren örneklerde üç temel kütle kaybı görülmektedir. Tüm yapılarda 100 °C civarında yaklaşık %10’luk bir nem kaybı piki görülmektedir. Düşük oranda PVA içeren örneklerde stokiometrik olarak daha çok GLY yapısı içerdiğinden dolayı 150-250 °C arasındaki GLY’ye ait bozunma piki belirgindir. PVA yapısı arttıkça stokiometrik olarak GLY yapısı düştüğünden dolayı bu pikin değeri de azalmaktadır. 300 °C civarındaki kütle kaybı ise PVA yapısından kaynaklanmakta olup PVA yapısındaki artışla birlikte büyümektedir. Son kütle kaybı ise tüm yapının bozunmasından kaynaklanmaktadır.



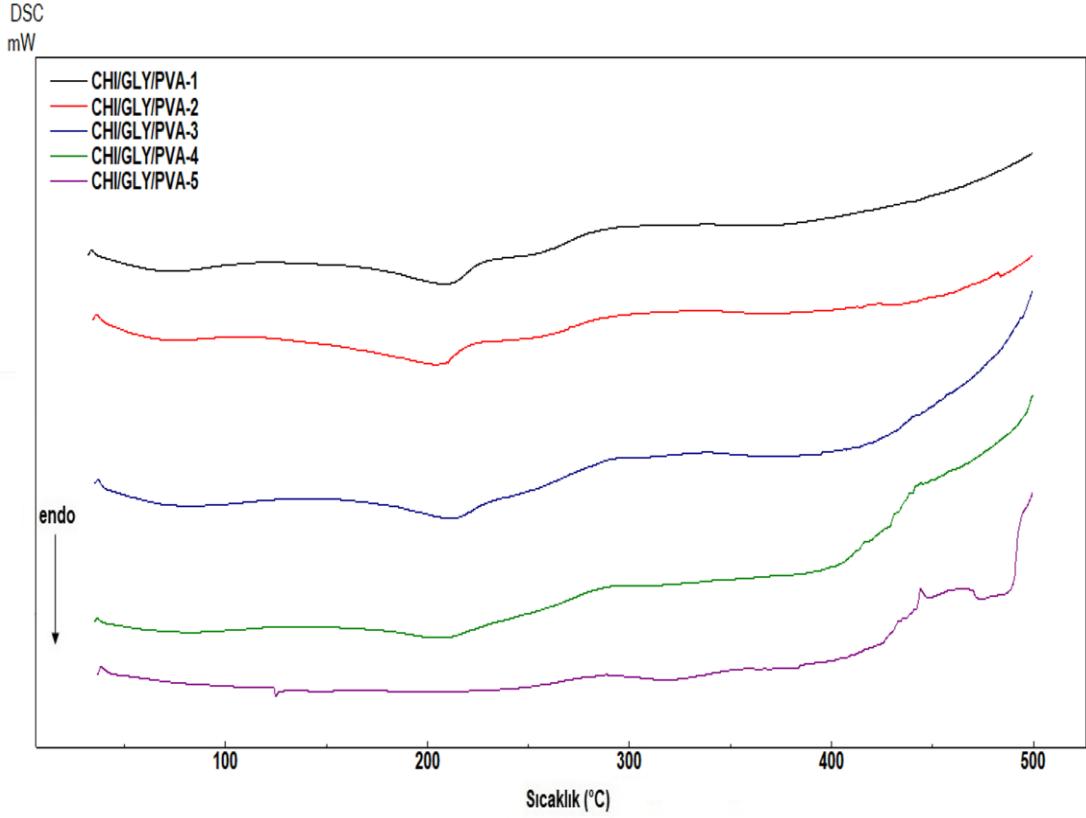
**Şekil 4. 39.** Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait TGA termogramları

Şekil 4.40 hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait DTA termogramlarını göstermektedir. Bu termogramlarda PVA yapısı arttıkça 100 ve 200 °C arasındaki GLY yapısından kaynaklı olan pik küçülmektedir. 200-400 °C aralığındaki genel CHI yapısından kaynaklı pikler görülmektedir. 450-600 °C arasında ise yapısal karbonlaşma pikleri net bir şekilde görülmektedir. Sonuç olarak PVA yapısının artışıyla birlikte anlamlı termogram değişimleri görülmektedir.



Şekil 4. 40. Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait DTA termogramları

Şekil 4.41’de farklı oranlarda PVA içeren CHI/GLY/PVA hidrojellerine örneklerine ait DSC termogramları gösterilmektedir. Bu termogramlarda, CHI/GLY/PVA-1 ve CHI/GLY/PVA-2 termogramları birbirine benzerdir. Ancak, PVA oranı arttıkça 100 °C ve 200 °C civarındaki geniş bantın azaldığı ve 400-500 °C aralığındaki bantın artan PVA oranından dolayı genişlediği görülmektedir.



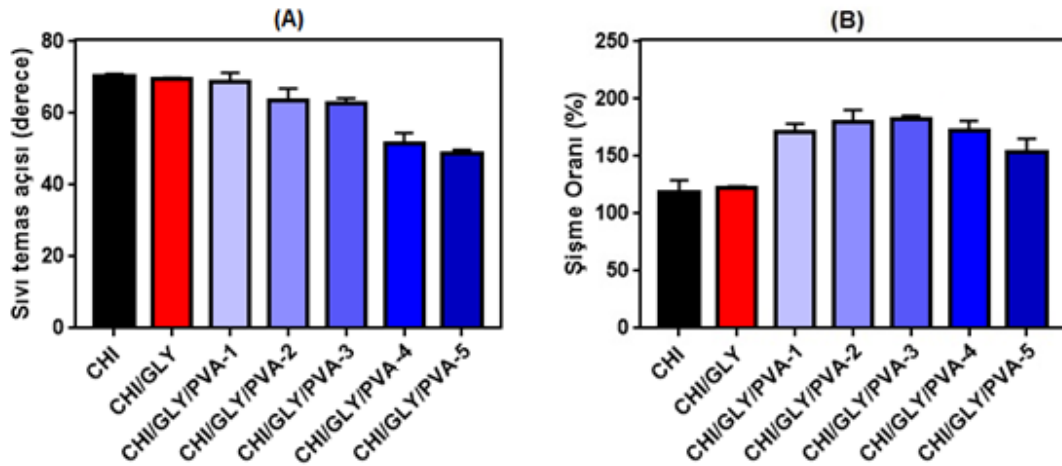
**Şekil 4. 41.** Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait DSC termogramları

#### 4.3.3. Sıvı temas açısı ve şişme derecesi

CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait sıvı temas açıları Şekil 4.42(A)'da gösterilmektedir. Hazırlanan hidrojel filmlerin temas açıları PVA oranının artışıyla doğru orantılı olarak sırasıyla  $68.7^{\circ} \pm 2.6$ ,  $63.6^{\circ} \pm 3.3$ ,  $62.8^{\circ} \pm 1.3$ ,  $51.7^{\circ} \pm 2.7$  ve  $48.9^{\circ} \pm 0.8$ 'dir. Sıvı teması açısında artan PVA miktarına bağlı olarak bir azalma görülmüştür. Bu azalmanın nedeni PVA'nın doğal hidrofilik karakterinden dolayıdır. Dolayısıyla PVA oranı arttıkça hidrojellerin hidrofiliği ve ıslanabilirliği artmaktadır. Ayrıca, hazırlanan hidrojel filmlerin sıvı temas açılarının  $90^{\circ}$ 'den daha az olması bu filmlerin hidrofilik karakterde olduğunun göstergesidir. Elde edilen sonuçlar literatürde CHI/PVA blendleri için rapor edilen sıvı temas açılarıyla tamamen paraleldir [262].

Şekil 4.42B'de, CHI/GLY/PVA hidrojel filmlerinin şişme oranları gösterilmiştir. CHI, CHI/GLY, CHI/GLY/PVA-1, CHI/GLY/PVA-2 ve CHI/GLY/PVA-3 denge şişme değerleri sırasıyla  $118.26 \pm 10.70$ ,  $122.02 \pm 1.76$ ,  $171.38 \pm 7.07$ ,  $180.45 \pm 10.09$  ve  $182.79 \pm 2.45$ 'dir. Şekilden de anlaşıldığı üzere, PVA içeren hidrojel filmlerinin % şişme değerleri ve hidrofilitesi saf CHI ve CHI/GLY filmlerine kıyasla daha yüksektir. Bu artış, hidrojeldeki PVA içeriğinden kaynaklanmaktadır. PVA suda

çözünen bir polimerdir ve PVA ile CHI'nin karıştırılması ile hidrofilik gruplar (-OH) artar ve bundan dolayı % şişme oranı da artmıştır. Bu sonuçlar literatür ile tamamen paralellik göstermektedir. Örneğin, El-Hefian vd. ile Ramakrishna vd. hazırladıkları CHI/PVA filmlerinin % şişme oranlarının PVA içeriği ile doğru orantılı olarak arttığını rapor etmişlerdir [257,263]. Ancak, PVA konsantrasyonunun aşırı artması şişme oranında bir azalmaya sebep olmuştur. CHI/GLY/PVA-4 ve CHI/GLY/PVA-5 örnekleri için % şişme değerleri sırasıyla  $172.51 \pm 8.49$  ve  $154.35 \pm 11.24$  olarak hesaplanmıştır. Şişme, hidrojel ağlarının gözenekliliği ile doğrudan bağlı olan bir parametredir. Gözenek hacmi fraksiyonunu, gözenek boyutlarını ve bunların ara bağlantılarını kontrol eden temel faktörler, ağ polimer zincirlerinin ve çapraz bağlama yoğunluğunun bileşimidir. Polimerin belirli bir hacimde artan konsantrasyonu, polimer zincirlerinin sayısında bir artışa ve dolayısıyla ağda gözenekliliğin azalmasına neden olur, bu da büyük olasılıkla hidrojellerin su tutma kapasitesinin azalmasına nedenidir. Gupta vd. yayınladıkları çalışmada şişme oranındaki azalmanın yüksek PVA oranından kaynaklandığını belirtmişlerdir [264,265].



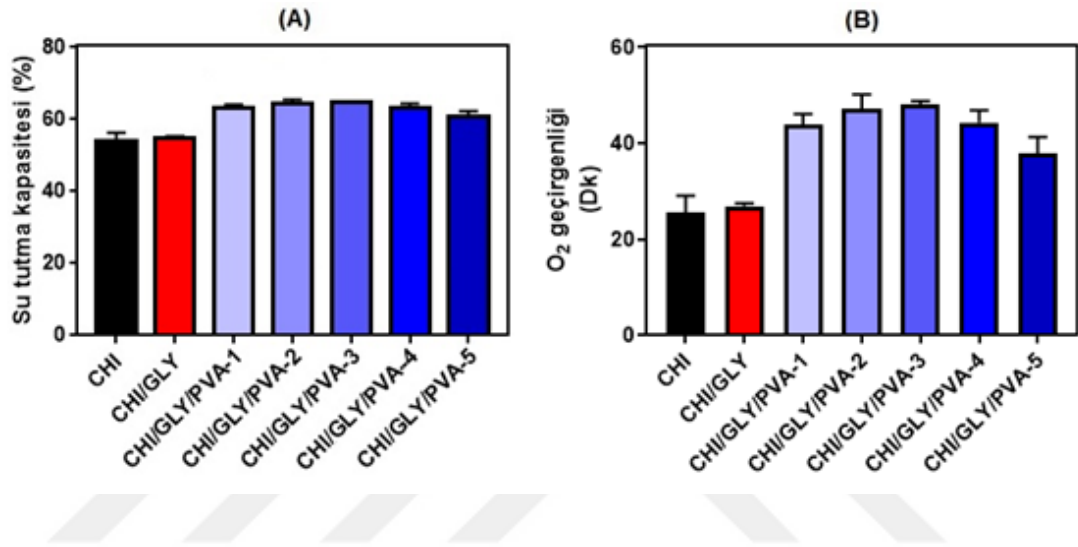
**Şekil 4. 42.** Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerinin (A) sıvı temas açısı ve (B) şişme sonuçları

#### 4.3.4. Su tutma kapasitesi ve gaz geçirgenliği

Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerinin su tutma kapasitesi sonuçları Şekil 4.43A'da gösterilmiştir. Çapraz bağlanmamış CHI pH 7.4'de %52-56 oranında bir su tutma oranına sahip olmasına rağmen, çapraz bağlanmış CHI/GLY/PVA hidrojellerinin su tutma yüzdesi %60-64 arasındadır. Dolayısıyla, PVA miktarı hazırlanan hidrojellerin su tutma kapasitesini arttırmıştır. Bu artış CHI omurgasına

hidrofilik segmentin (PVA) dâhil edilmesinden kaynaklanır. Elde edilen sonuçlar şişme testi ile paralellik göstermektedir.

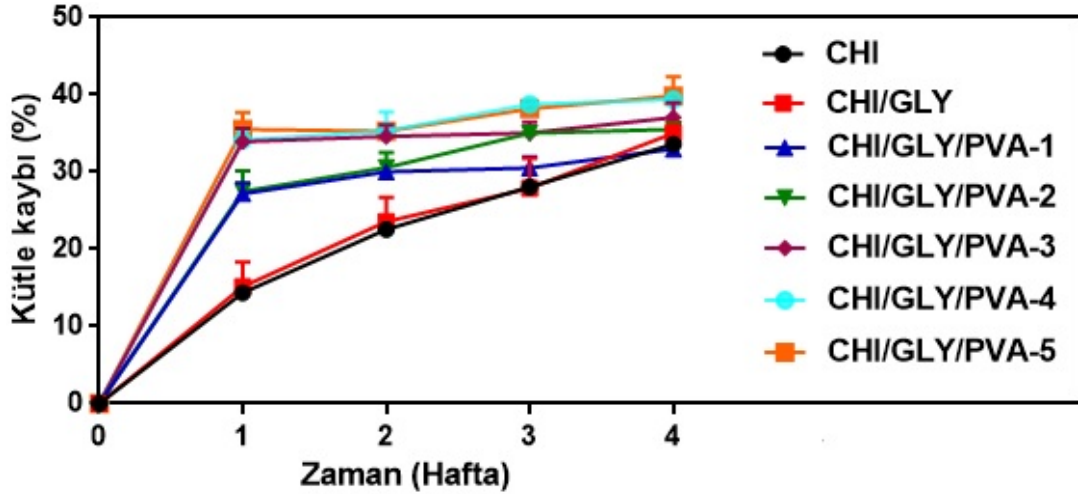
Şekil 4.43 (B) ayrıca hidrojel filmlerin O<sub>2</sub> geçirgenliğini göstermektedir. O<sub>2</sub> örneğin içindeki su fazıyla difüze olabileceğinden dolayı örneklerin su tutma kapasiteleri ile doğru orantılıdır [244]. Yani bir hidrojel örneği ne kadar su absorbe edebilirse o örnek için O<sub>2</sub> gazının geçirgenliği de lineer olarak artar. Bu korelasyon bizim çalışmamızda da gözlenmiştir.



Şekil 4. 43. Hazırlanan CHI/GLY/PVA hidrojellerinin (A) su tutma kapasitesi ve (B) O<sub>2</sub> geçirgenlik testi sonuçları

#### 4.3.5. *In vitro* biyobozunurluk

CHI/GLY/PVA hidrojellerine ait *in vitro* biyobozunurluk sonuçları Şekil 4.44'de verilmiştir. Saf CHI dört hafta sonunda  $33.58 \pm 1.11$  oranında bozunma göstermiştir. CHI/GLY 4. haftanın sonunda  $35.01 \pm 0.64$  oranında bozunma sergilemiş olup bu bozunma oranı CHI'ninkinden yüksektir. Bozunma sürecinin ilk haftalarında bu artış daha belirgin olarak görülmektedir. GLY'nin biyobozunurluğu arttırdığına dair literatürde çalışmalar mevcuttur. Bunun nedeni olarak GLY'nin hidrofilik karakteri gösterilmektedir. Farklı oranda PVA içeren hidrojellerin ise 4. haftanın sonunda  $32.97 \pm 0.5$ ,  $35.52 \pm 0.7$ ,  $37.04 \pm 1.88$ ,  $39.37 \pm 0.71$ , ve  $39.85 \pm 2.51$  oranında bozunma sergilemiş olup haftalara göre baktığımızda bozunma oranı lineere yakındır. Elde edilen bu sonuçlar göstermektedir ki PVA oranı arttıkça hidrojellerin bozunurluğunun buna paralel olarak arttığı da gözlenmiştir. PVA suda çözünebilir, biyobozunur ve biyouyumlu bir polimerdir. Bundan dolayı farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

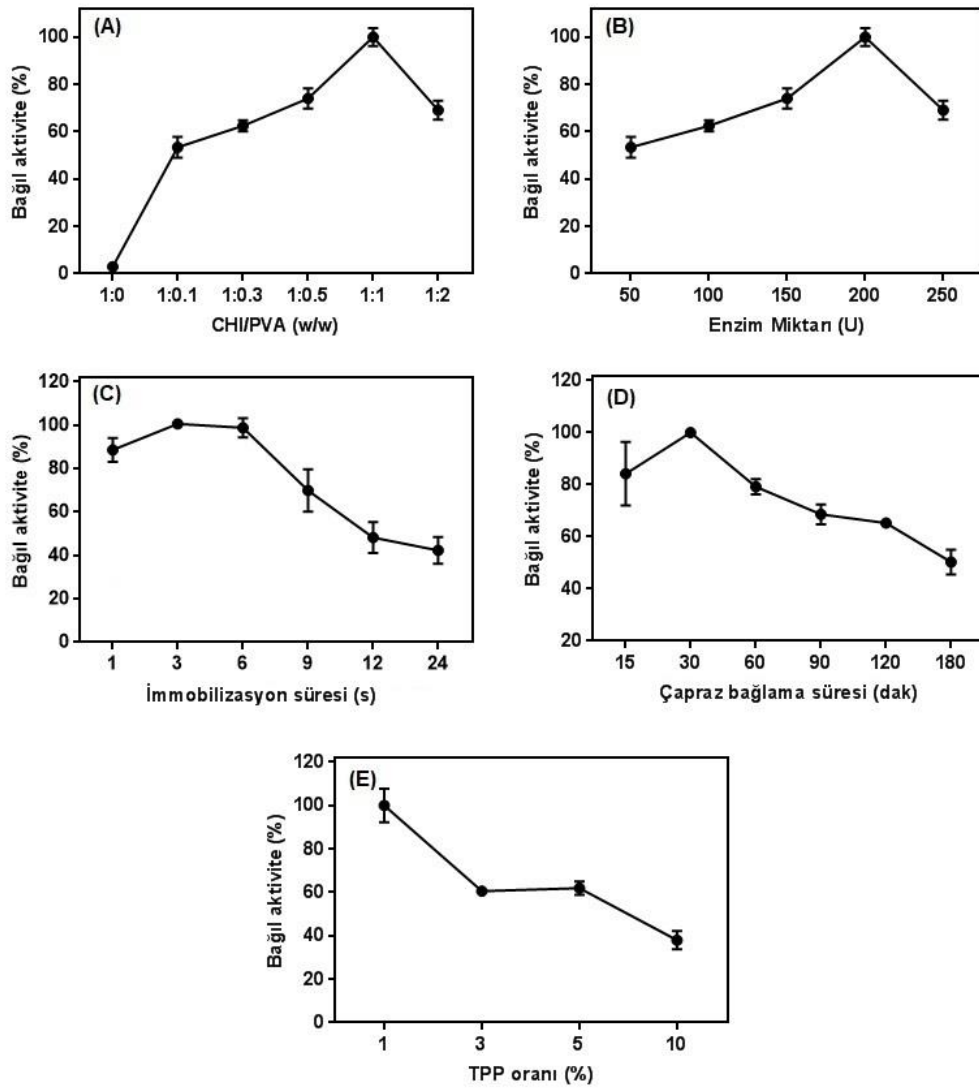


Şekil 4. 44. CHI/GLY/PVA hidrojellerinin *in vitro* biyobozunurluk test sonuçları

#### 4.3.6. L-ASNaz İçeren CHI/GLY/PVA Formülasyonlarının Hazırlanması

Bilindiği gibi, immobilizasyon koşulları immobilizasyon etkinliğini ve immobilize enzimin aktivitesini etkiler. Bundan dolayı, öncelikle en ideal CHI/GLY/PVA@L-ASNaz formülasyonu seçilmiş ve daha sonra ise enzim miktarı, immobilizasyon süresi, çapraz bağlama süresi ve TPP oranının enzim aktivitesi üzerine etkileri sırasıyla incelenmiştir. Şekil 4.45A'da görüldüğü üzere PVA oranının artmasıyla beraber enzimin bağıl aktivitesinde bariz bir artış görülmüştür. Bu artışın nedeni PVA miktarının artmasıyla beraber enzimin etkileşeceği fonksiyonel grupların sayısı artmıştır. Bundan dolayı en uygun formülasyonun CHI/GLY/PVA-4 olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.45B'de gösterildiği gibi, enzim miktarının artması, aktiviteyi önemli bir şekilde arttırmıştır. 200 U enzim kullanıldığında maksimum aktiviteye ulaşıldığından optimum enzim miktarı 200 U olarak belirlenmiştir. Immobilizasyon süresinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 1 ile 24 saat zaman aralığında incelenmiştir (Şekil 4.45C). İlk 3 saat içinde enzim aktivitesi lineer bir şekilde artmış ve maksimum seviyeye ulaşmıştır. Ancak, bundan sonra, enzim aktivitesi azalmıştır. Sonuç olarak, en uygun immobilizasyon süresi olarak 3 saat seçilmiştir. Belirli bir konsantrasyon aralığında, çapraz bağlayıcının oranı enzim aktivitesini artırabilir. Ancak, yüksek orandaki çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, enzim denatürasyonu, enzimin aktif bölgelerinin çapraz bağlanma yapısı ile tıkanması nedeniyle immobilize edilmiş enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açabilir. Bağıl enzim aktivitesine karşı çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve süresine ait veriler, Şekil 4.45D ve Şekil 4.45E'de sunulmaktadır. Şekil 4.45D, çapraz bağlama süresinin enzim aktivitesi üzerindeki etkisini

göstermektedir. Enzim aktivitesi 15 ile 180 dakika arasında artan çapraz bağlama süresince ölçülmüştür. Çapraz bağlama süresi 30 dakikadan sonra enzim aktivitesinde bir azalmaya yol açmıştır ve çapraz bağlama süresinin artmasıyla enzim aktivitesinin sürekli olarak azaldığı görülmüştür. Bu nedenle, CHI/GLY/PVA formülasyonu için optimum çapraz bağlama süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. Belli bir konsantrasyonda, TPP enzim immobilizasyonunu arttırdığı literatürde rapor edilmiştir. Ancak, TPP konsantrasyonu daha da arttıkça, aşırı çapraz bağlanma çoğu zaman enzim moleküllerinin konformasyonel değişikliklerine neden olmakta, bu da aktif bölgeye zarar vermekte ve böylece immobilizasyon verimliliğini engellemektedir [266]. Şekil 4.45E'deki verilere göre, maksimum enzim aktivitesi %1.0'lik (w/v) TPP konsantrasyonunda görülmüştür bu nedenle optimum TPP oranı olarak seçilmiştir.

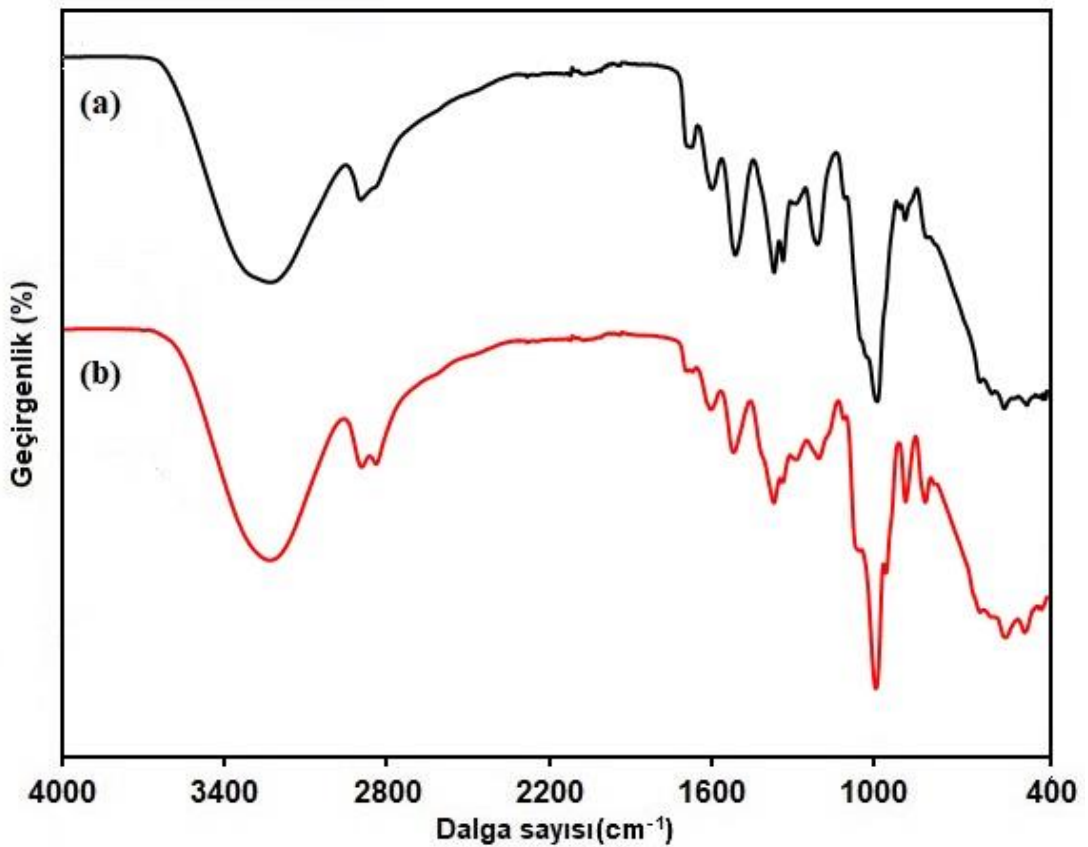


**Şekil 4. 45.** L-ASNaz içeren CHI/GLY/PVA formülasyonlarının hazırlanması için optimum parametrelerin belirlenmesi: A) CHI/PVA oranı, B) Enzim miktarı, C) İmmobilizasyon süresi, D) Çapraz bağlama süresi ve E) TPP oranı

### 4.3.7. CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz formülasyonunun karakterizasyonu

#### 4.3.7.1. FTIR analizi

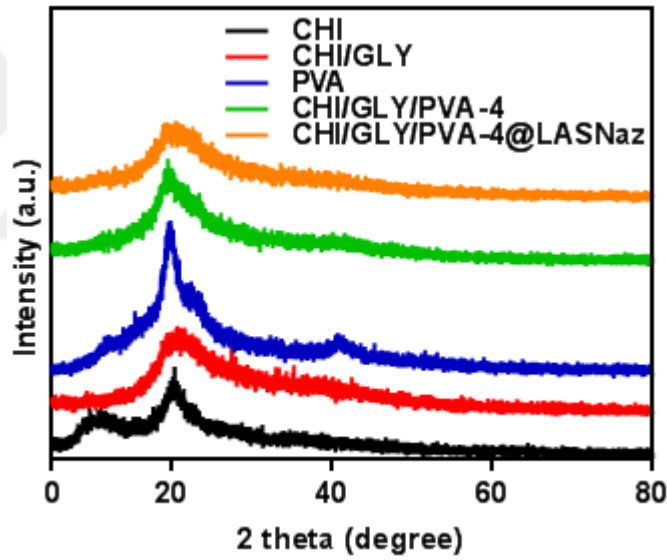
L-ASNaz'ın varlığını yapısal olarak kanıtlamak için CHI/GLY/PVA-4 ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları kaydedildi (Şekil 4.46). L-ASNaz immobilizasyonundan sonra elde edilen FTIR spektrumu incelendiğinde 3000–3600  $\text{cm}^{-1}$  aralığında pik şiddetinin immobilizasyondan sonra arttığı görülmüştür. Bu artışın nedeni enzimde bulunan –OH ve –NH gruplarından kaynaklanmaktadır. 2881-2926  $\text{cm}^{-1}$ 'de aralığında bulunan pik yoğunluğu da enzimdeki hidrokarbonların asimetrik ve simetrik titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, 1560 ve 1650  $\text{cm}^{-1}$ 'de, sırasıyla amid I'e (C = O bağlarının titreşimi) ve amid II'ye (sırasıyla protein omurgasında C-N germe ve N-H titreşiminin bir kombinasyonu) atfedilebilecek iki pik göstermiştir. Bu arada, L-ASNaz immobilizasyonundan sonra C-H ve C-N bağlarını temsil eden 925 ve 1100  $\text{cm}^{-1}$ 'de iki yeni pik ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar L-ASNaz enziminin başarılı bir şekilde immobilize edildiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4. 46. CHI/GLY/PVA-4 ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneklerinin FTIR spektrumları

#### 4.3.7.2. XRD analizi

CHI, CHI/GLY, PVA, CHI/GLY/PVA-4 ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneklerinin XRD sonuçları Şekil 4.47'de verilmiştir. CHI ve CHI/GLY örneklerinin XRD sonuçları 4.2.7.2 başlığı altında detaylıca anlatılmıştır. Saf PVA'nın XRD spektrumunda, 20.4°de tipik bir kristalin zirvesi vardır [267]. CHI/GLY/PVA-4 örneğinin XRD spektrumu incelendiğinde pik şiddetlerinde hafif bir azalma görülmektedir. Kristallikteki bu düşüş muhtemelen CHI ve PVA makromolekülleri arasındaki hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. L-ASNaz immobilizasyonundan hazırlanan formülasyonun kristalliğini kontrol etmek için XRD analizi de yapılmıştır. CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneğinin XRD spektrumu incelendiğinde, L-ASNaz immobilizasyonundan sonra önemli bir faz değişimi olmadığı görülmüştür. Ancak, pik şiddetlerinin hafif azaldığı görülmüştür.

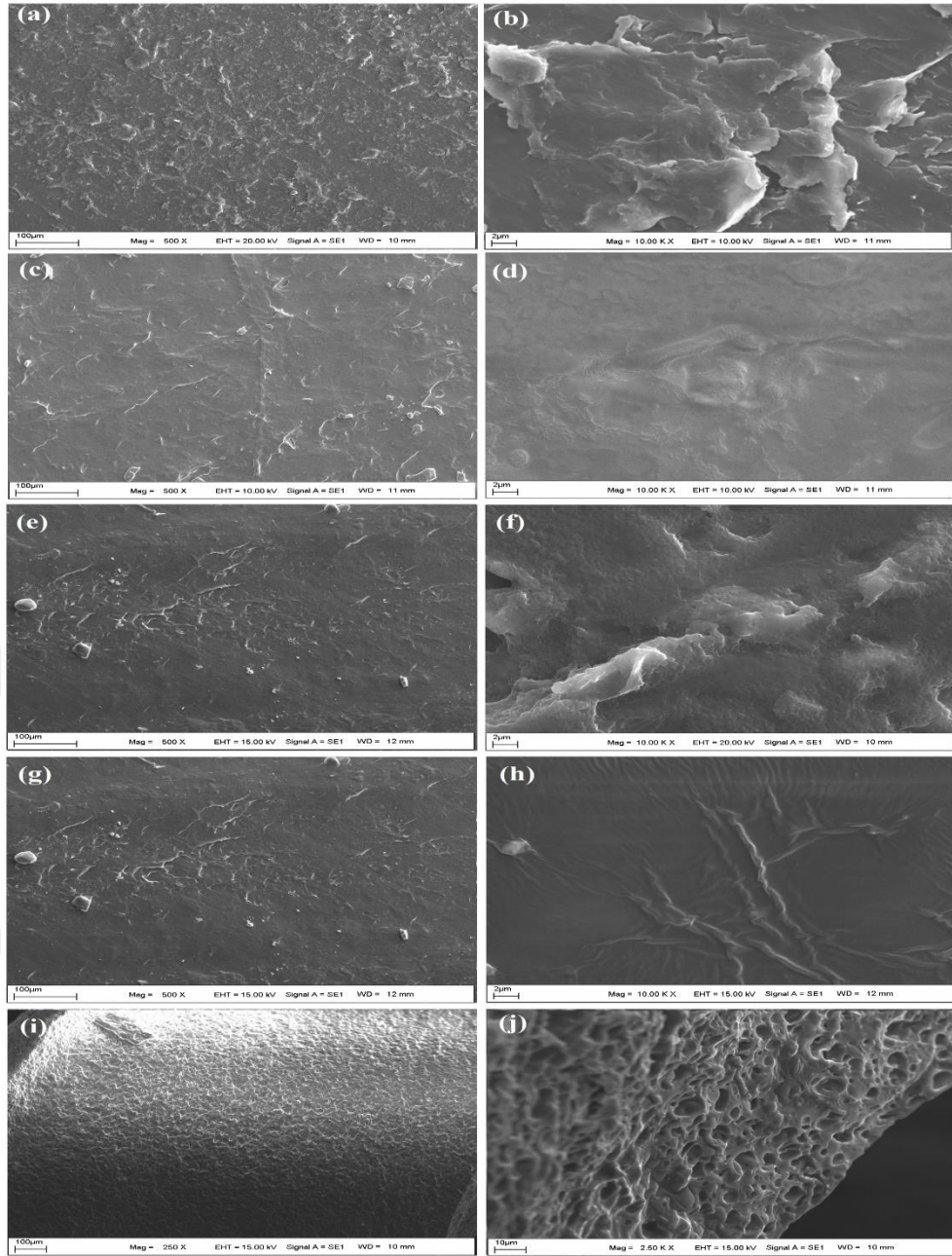


Şekil 4. 47. CHI, CHI/GLY, PVA, CHI/GLY/PVA-4 ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneklerinin XRD spektrumları

#### 4.3.7.3. SEM analizi

Hazırlanan hidrojel filmlerin morfolojisi, Şekil 4.47'de sunulan SEM görüntülerine dayanılarak değerlendirilmiştir. CHI'nin SEM görüntüsü incelendiğinde, CHI filmlerin yüzeyinin düzgün, sürekli ve kompakt bir yapı olduğu görülmektedir (Şekil 4.48 a, b). GLY içeren filmin mikroyapısı, CHI filmlerinin görüntülerinden farklıdır (Şekil 4.48 c, d). Bu film yüzeyinde çatlama gözlemlenmiştir. Bunun nedeni GLY'nin plastikleştirme etkisinden olduğu sonucuna

varılabilir. GLY konsantrasyonu düşük olduğunda, GLY'nin tipik plastikleşme etkisi oluşur ve kurutma sırasında yüzeyde mikro çatlama neden olur. Bu durum, yapının içinde daha sıkı polimerik ağ oluşmasına neden olur. Mikroyapının ve morfolojinin PVA içeriğinden ciddi şekilde etkilendiği açıkça görülmektedir. PVA'nın yapıya dâhil edilmesiyle birlikte, CHI/GLY'nin gözenek yapısı artmıştır (Şekil 4.48 e, f). Şekil 4.48 g, h ise hidrojel formülasyonuna L-ASNaz enzimi yüklendikten sonra oluşan CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneğinin morfolojik görüntüsünü yansıtmaktadır. Açıkça enzimin hidrojel formülasyonuna eklenmesinden sonra örneğin morfolojisinde büyük ölçüde bir etki oluşmamıştır. Ancak, hidrojel örneği TPP ile çapraz bağlandıktan sonra film yüzeyi bariz bir şekilde değişmiştir (Şekil 4.48 i, j). Film yüzeyinin gözenekliliği çapraz bağlama işleminden sonra artmıştır. Bu CHI ve PVA arasındaki etkileşimin varlığını kanıtlamaktadır ve elde edilen sonuçlar literatür ile tamamen paraleldir [268].

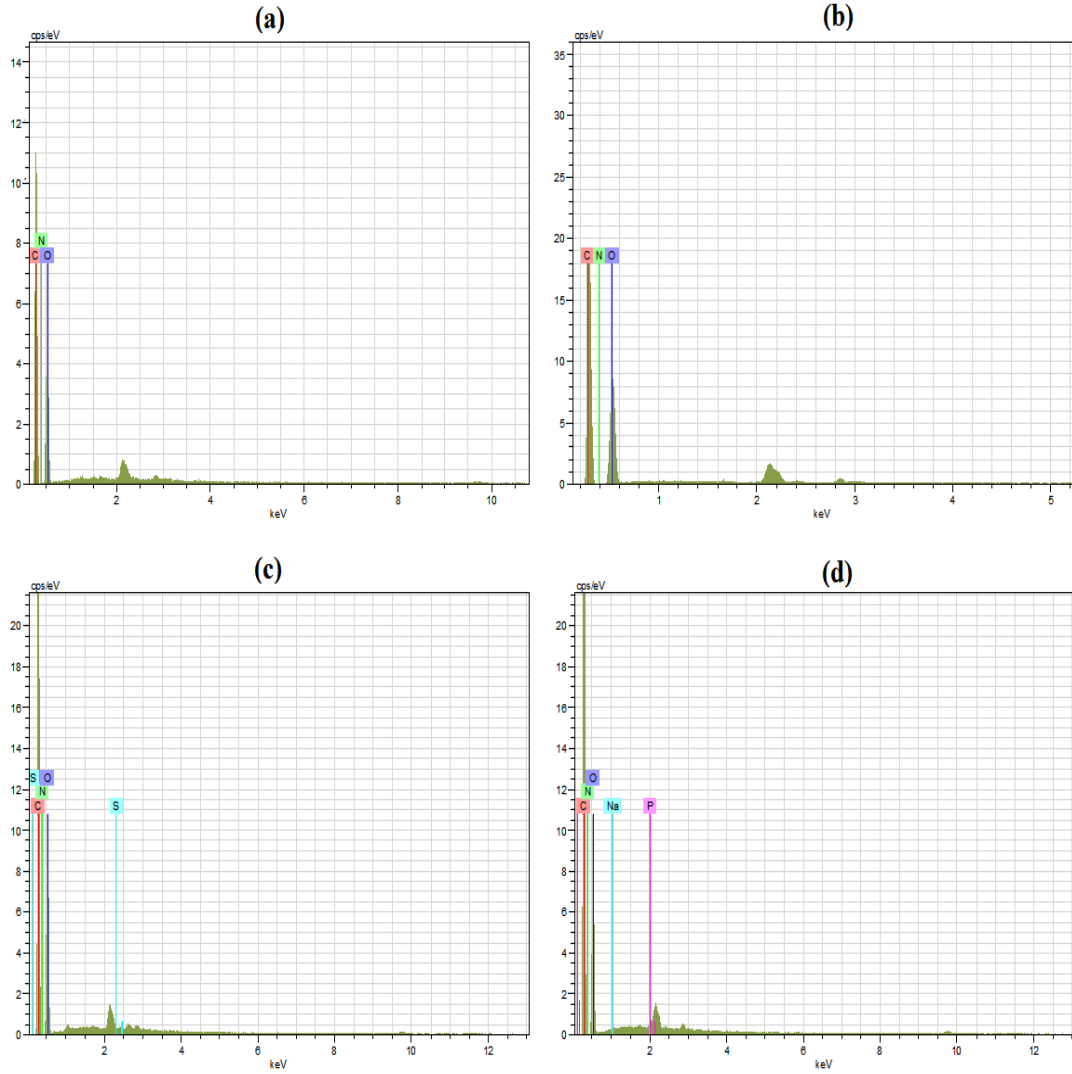


**Şekil 4. 48.** CHI (a, b), CHI/GLY (c, d), CHI/GLY/PVA-4 (e, f), CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz (g, h) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (i, j) SEM görüntüleri

#### 4.3.7.4. EDX analizi

Hazırlanmış hidrojel formülasyonların EDX spektrumları Şekil 4.49'da sunulmaktadır. Saf CHI için karbon (C), oksijen (O) ve azot (N) elementlerine ait pikler görülmektedir (Şekil 4.49a). CHI/GLY/PVA örneğine ait EDX spektrumu incelendiğinde benzer elementlere ait pikler görülmektedir (Şekil 4.49b). Ancak, PVA polimerinden dolayı bu piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.49c, CHI/GLY/PVA-4@L-

ASNaz örneğine ait EDX spektrumunu göstermektedir. Bu spektrum dikkatlice incelendiğinde, enzimden kaynaklı ekstra kükürt (S) piki görülmektedir. Ayrıca, C, O ve N piklerinin şiddeti de artmıştır. Son olarak, TPP ile çapraz bağlanmış stent formülasyonlarına ait EDX spektrumunda TPP'den dolayı sodyum (Na) ve fosfor (P) elementlerinin varlığı bariz bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.49d).



**Şekil 4. 49.** CHI (a), CHI/GLY/PVA-4 (b), CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz (c) ve çapraz bağlanmış polimerik stent örneklerinin (d) EDX spektrumları

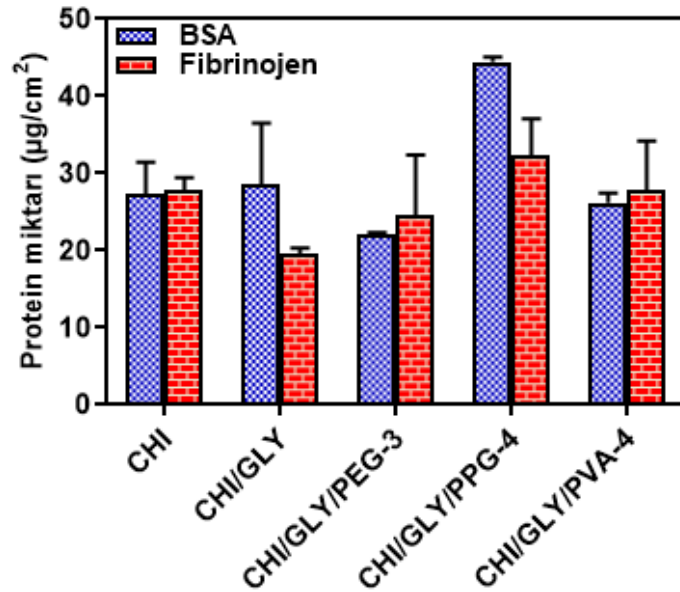
#### 4.3.8. Enzim aktivitesi sonucu seçilmiş örneklerin ileri karakterizasyonları

Yapılan optimum parametre çalışmaları sonucu en yüksek aktiviteye sahip olan CHI/GLY/PEG-3, CHI/GLY/PPG-4 ve CHI/GLY/PVA-4 örnekleri seçilmiştir. Seçilen örnekleri daha detaylı karakterize etmek için protein adsorpsiyonu, porozite,

su buharı geçirgenliği, mekanik özellikler ve *in vitro* sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve aşağıda sırasıyla elde edilen sonuçlar sunulmuştur.

#### 4.3.8.1. Protein adsorbsiyonu

Vücuda bir biyomalzeme implante edildiğinde, vücudun mikro ortamı ile etkileşir. Fizyolojik sıvılarda bulunan farklı proteinler, sadece temasa geçmekle kalmayıp aynı zamanda biyomalzemelerin yüzeyinde adsorbe olan ana bileşenlerden biridir. Bu adsorbe edilmiş proteinler çeşitli biyolojik tepkilere aracılık eder ve ayrıca iskelet yüzeyindeki hücrelerin bağlanmasına, büyümesine ve çoğalmasına yardımcı olur. BSA, yapısal ve fonksiyonel olarak insan serum albümininkine benzer bir glikoproteindir [269] ve bu nedenle protein adsorpsiyonunu değerlendirmek için kullanılmıştır. Ayrıca, *in vivo* durumu taklit etmek için fibrinojen protein adsorpsiyonu çalışmasını yapmak için kullanılmıştır. Hazırlanan hidrojel filmlerinin yüzeylerinde adsorbe edilen BSA ve fibrinojen miktarları Şekil 4.50'de gösterilmektedir. Saf CHI'ya kıyasla CHI/GLY, CHI/GLY/PEG-3 ve CHI/GLY/PVA-4 örneklerinde adsorbe olan protein miktarı hidrofikliğin artmasından dolayı azalmıştır. Ancak, PPG PEG ve PVA'ya nazaran daha hidrofobik olduğu için CHI/GLY/PPG-4 örneğinde adsorbe olan protein miktarı artmıştır. Elektrostatik kuvvet ve hidrofobik etkileşim, CHI/GLY/PPG-4 örneğinde daha fazla protein-yüzey afinitesine neden olmuştur.



Şekil 4. 50. Hazırlanan hidrojel örneklerinin protein (BSA ve fibrinojen) adsorpsiyon sonuçları

#### 4.3.8.2. Porozite ve Su Buharı Geçirgenliği

Porozite, doku mühendisliğinde kullanılan biyomateryaller için önemli bir rol oynar. Çünkü bu gözenekler hücreler ve dokular için oksijen ve besin sağlar. Bundan dolayı biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere hazırlanan malzemelerin yüksek gözeneklilik derecesine sahip olması istenir. Doku mühendisliğinde toplam gözenekliliğin %85'den büyük olduğu malzemelerin daha avantajlı olduğu rapor edilmiştir. Porozite ölçümü sıvı yer değiştirme yöntemiyle gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Tablo 4.1'de sunulmuştur. CHI'nin porozite değeri  $76.03 \pm 4.45$  olarak bulunurken yapıya PEG, PPG ve PVA katkılanması poroziteyi arttırmıştır. CHI/GLY/PEG-3, CHI/GLY/PPG-4 ve CHI/GLY/PVA-4 hidrojelleri için porozite değerleri sırasıyla  $87.25 \pm 0.56$ ,  $82.37 \pm 1.50$  ve  $81.88 \pm 4.45$  olarak hesaplanmıştır. Bu değerler hazırlanan hidrojellerin genel porozitesinin yüksek ve avantajlı bir orana sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, hazırlanan hidrojel filmlerin porozitesinin arttığı SEM görüntüleriyle de kanıtlandığından dolayı elde edilen bu sonuçlar birbirini desteklemektedir.

Hazırlanan membranların su buharı geçirgenliğini belirlemek için su buharı iletim hızı ölçülmüştür ve Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Sonuçlar, saf CHI membranının su buharı geçirgenliği hızı  $34.60 \pm 1.50$  iken, CHI/GLY membranının su buharı geçirgenliği hızı  $70.88 \pm 0.07$  olarak ölçülmüştür. Bu artışın nedeni CHI ve GLY arasındaki etkileşimlere bağlanabilir. Bilindiği gibi CHI, hidrojen bağları oluşturarak suya afiniteyi artırma potansiyelini gösteren  $-NH_2$  ve  $-OH$  hidrofilik gruplarını içermektedir. Ancak, hidrofilik grupların çoğu, CHI membranlar için işgal edilmiştir, bu da serbest grupların suyla bağlanma eksikliğine yol açar. GLY mikro molekülünün matrikse sokulmasıyla, CHI zincirinin mesafesi genişlediğinden, su ile bağlanacak daha serbest amino grupları serbest bırakılır. Sonuç olarak, su buharı geçirgenliği GLY ilavesiyle büyük ölçüde geliştirilmiştir.

Bununla birlikte, Tablo 4.1'de, yapıya yine bir plastikleştirici olarak PEG eklendiği zaman filmlerin farklı morfolojisine bağlı olan WVTR değeri PEG'in GLY ve CHI arasındaki farklı etkileşimi nedeniyle azalmıştır. Bozdemir ve Tutaş yaptıkları bir çalışmada GLY içeren polisakkarit bazlı filmlerin WVTR değeri yüksek iken, PEG 200 içeren filmlerin daha düşük WVTR değerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [270]. Benzer sonuçlar PPG ve PVA içinde kaydedilmiştir.

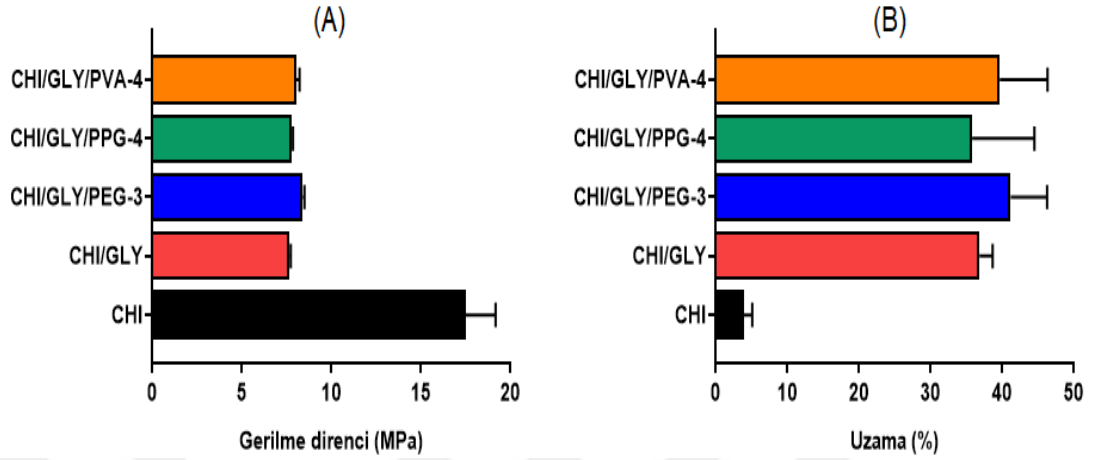
**Tablo 4.1.** Hazırlanan hidrojellerin sıvı yer değiştirme yöntemiyle elde edilen porozite değerleri ve su buharı iletim hızı sonuçları

Örnek Kodu	Porozite (%)	Su Buharı İletim Hızı (g.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )
CHI	76.03±4.45	34.60±1.50
CHI/GLY	86.52±0.37	70.88±0.07
CHI/GLY/PEG-3	87.25±0.56	51.10±3.71
CHI/GLY/PPG-4	82.37±1.50	52.67±2.57
CHI/GLY/PVA-4	81.88±4.45	52.00±7.68

#### 4.3.8.3. Mekanik özellikler

Hazırlanan membranların mekanik özelliklerini incelemek için bir mekanik test analizörü kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.51’de gösterilmiştir. Ayrıca, sonuçlar CHI ve CHI/GLY ile kıyaslanmıştır. Şekil 4.51A’da görüldüğü üzere, CHI’nın gerilme direnci 17.47 MPa iken gerinim uzaması %3.93’dir. GLY eklenmesiyle, gerinim uzaması artarken (%36.82), gerilme direnci (7.65 Mpa) azalmıştır. Bu sonuçlar, CHI ve GLY arasındaki hidrojen bağlanmasından dolayı film yapısının transformasyonu ile açıklanabilir. CHI içinde tekrarlanan *N*-glukozaminin her bir biriminde sunulan -NH<sub>2</sub> ve -OH grupları, CHI molekülleri arasında hidrojen bağları oluşturabilir ve böylece nispeten düzenli bir yapı oluşturur. GLY, CHI ile kolayca karışabilir, bu nedenle GLY’nin eklenmesi, CHI’nın -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> ile GLY’nin -OH arasında hidrojen bağlarının oluşumunu destekleyebilir. Bu ilave hidrojen bağlarının, filmdeki sıralı CHI ağını bozduğunu, dolayısıyla doğal CHI zarlarının sertliğini azaltan sert zincir esnekliği ile sonuçlandığını tahmin ediyoruz. CHI/GLY/PEG-3 malzemesi için gerilme direnci 8.4 MPa iken, gerinim uzama değeri %41.18 olarak ölçülmüştür. GLY gibi PEG polimeri plastikleştirici etki göstermiştir. PEG ilavesinin, CHI/GLY moleküler zincirlerinin tokluğunu ve mobilitesini arttırmıştır. Benzer şekilde, CHI/GLY/PPG-4 7.8 MPa gerilme direncine ve %35.78 gerinim uzama değerine sahip olduğu bulunmuştur. PPG ve PEG genellikle benzer etkiler göstermektedir. CHI/GLY/PVA-4 örneği için, gerinim uzama değeri %3.93’ten % 39.64’e yükselirken, gerilme direnci değeri 17.47’den 25 MPa’ya yükselmiştir. Sonuç olarak, PVA’nın malzemenin gerilme direncini düşürdüğünü, ancak malzemenin tokluğunu ve esnekliğini arttırdığını göstermiştir. PEG, PPG ve PVA CHI ve GLY arasındaki

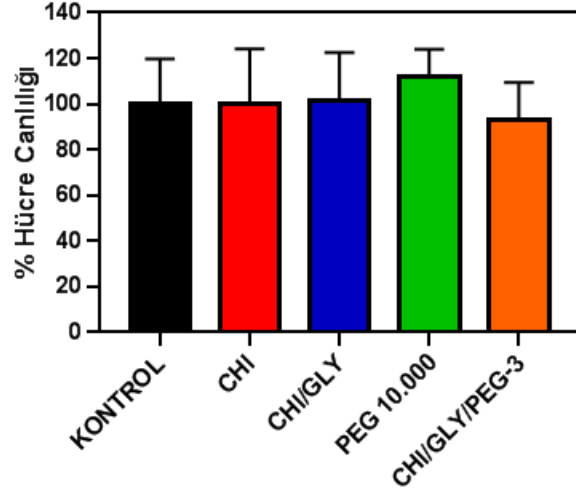
moleküller arası kuvveti azaltır. Moleküller arası kuvvetin azaltılması, karışım filminin esnekliğini artıracaktır. Elde edilen sonuçlar literatür ile tamamen uyumludur [271,272].



**Şekil 4. 51.** Hazırlanan hidrojellerin mekanik test sonuçları; (A) gerilme direnci, (B) % uzama

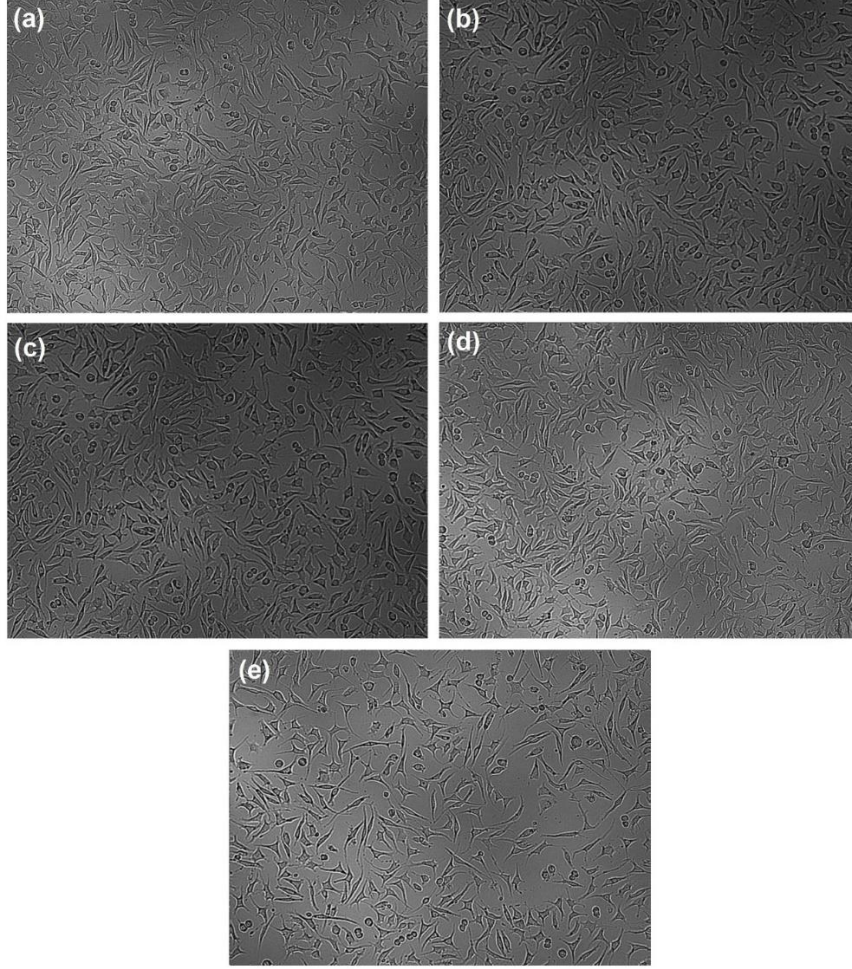
#### 4.3.8.4. *In vitro* sitotoksosite

Hazırlanan örneklerin *in vitro* sitotoksitesini MTT testi kullanılarak kolorimetrik olarak test edilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.52'de gösterilmiştir. Sitotoksite çalışmalarında hücre canlılığı <% 50 toksik, % 51 ile 70 hafif sitotoksik, >% 71 sitotoksik olmayan olarak sınıflandırılır [273]. Kontrolle kıyaslandığında, CHI, CHI/GLY, PEG 10.000 ve CHI/GLY/PEG-3 örneklerinin hücre canlılık oranları sırasıyla 100.3, 101.7, 111.6 ve 93.2 olarak bulunmuştur. Zaten, CHI, GLY ve PEG biyoyoumlulukları bilinen malzemelerdir. Elde edilen MTT testi sonuçları da bunu doğrulamaktadır. CHI/GLY/PEG-3 örneği de yüksek oranda biyoyoumluluk göstermiştir.



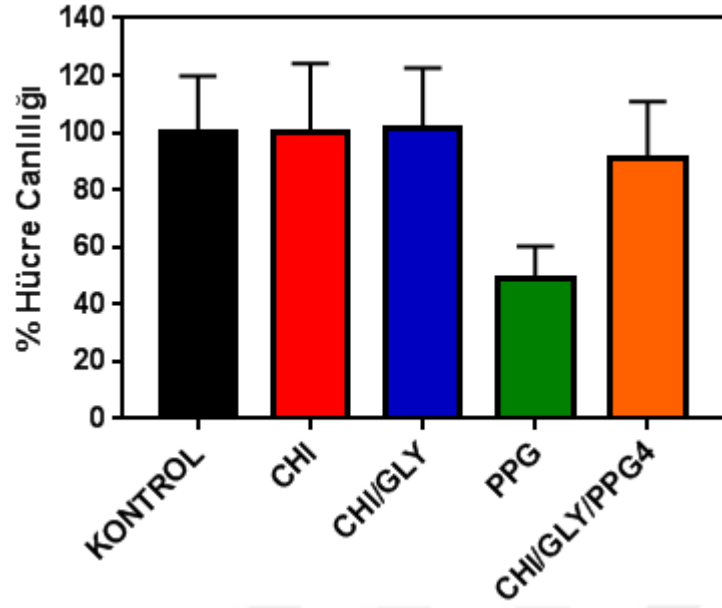
**Şekil 4. 52.** CHI, CHI/GLY, PEG 10.000 ve CHI/GLY/PEG-3 örneklerinin L929 fare hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları

Ayrıca, inkübasyon sonrası örnek ekstraktları ile muamele edilen hücrelerin morfolojileri Şekil 4.53'de verilmiştir. Hücrelerin morfolojik yapısında değişme görülmemiştir. Sonuç olarak, hazırlanan CHI/GLY/PEG-3 ekstraktlarının hücre canlılığı üzerinde in vitro olarak toksik etkisinin olmadığı görülmüştür.



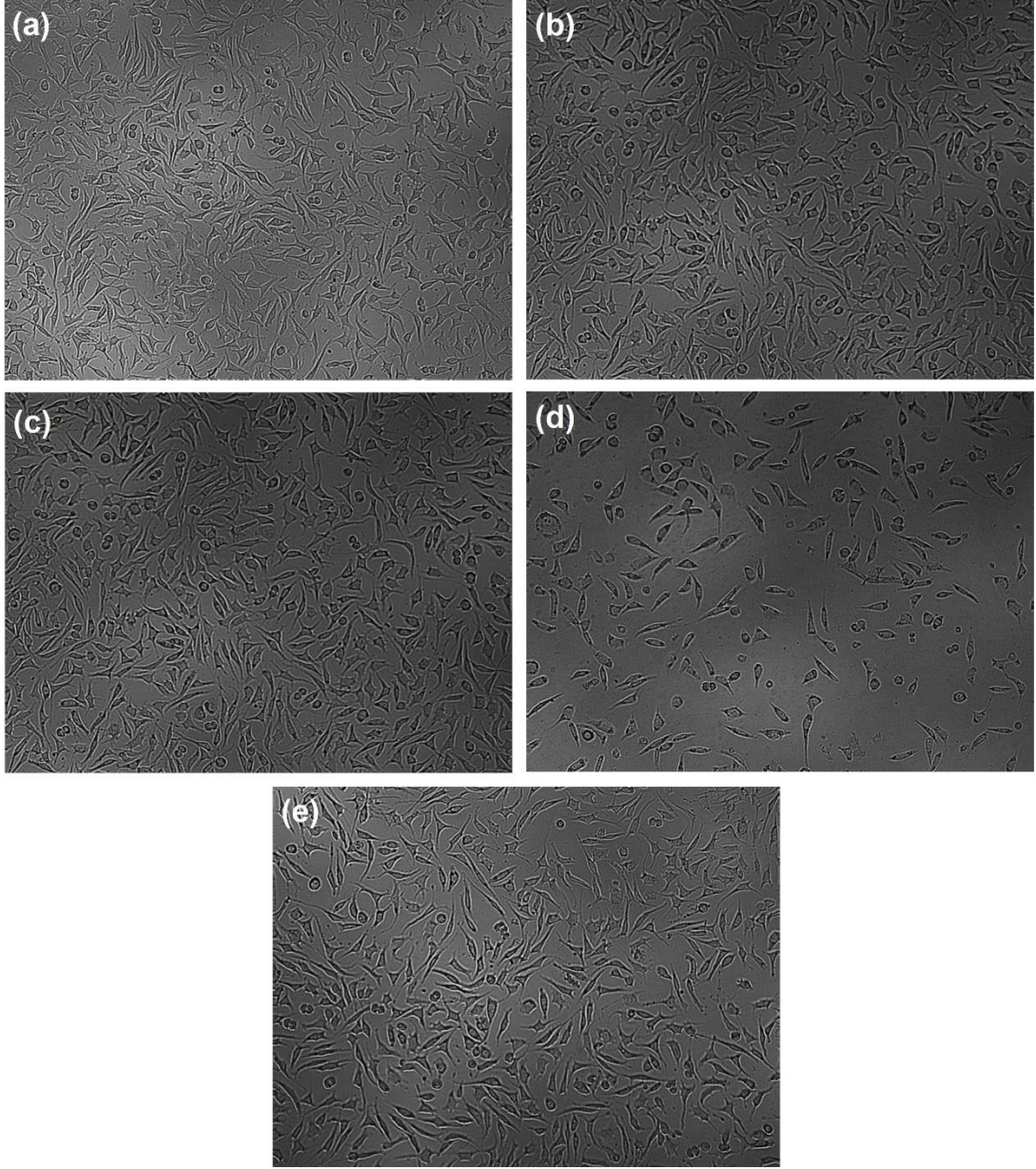
**Şekil 4. 53.** L929 fibroblast hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (a) Kontrol, (b) CHI, (c) CHI/GLY, (d) PEG ve (e) CHI/GLY/PEG-3

Hazırlanan örneklerin *in vitro* sitotoksitesi MTT testi kullanılarak kolorimetrik olarak test edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.54'de gösterilmiştir. Kontrolle kıyaslandığında, CHI, CHI/GLY, PPG ve CHI/GLY/PPG-4 örneklerinin hücre canlılık oranları sırasıyla 100.3, 101.7, 49.0 ve 90.7 olarak bulunmuştur. CHI ve GLY biyoyumlulukları bilinen malzemelerdir. PPG'nin ise biyoyumluluğu molekül ağırlığına bağlıdır. Literatürde PPG'nin düşük molekül ağırlığına sahip olduğunda toksik, yüksek molekül ağırlığına sahip olduğunda ise daha biyoyumlu olduğu bildirilmiştir [274]. Elde edilen MTT testi sonuçları da bunu doğrulamaktadır. Ancak, hazırlanan CHI/GLY/PPG-4 örneği yüksek oranda biyoyumluluk göstermiştir.



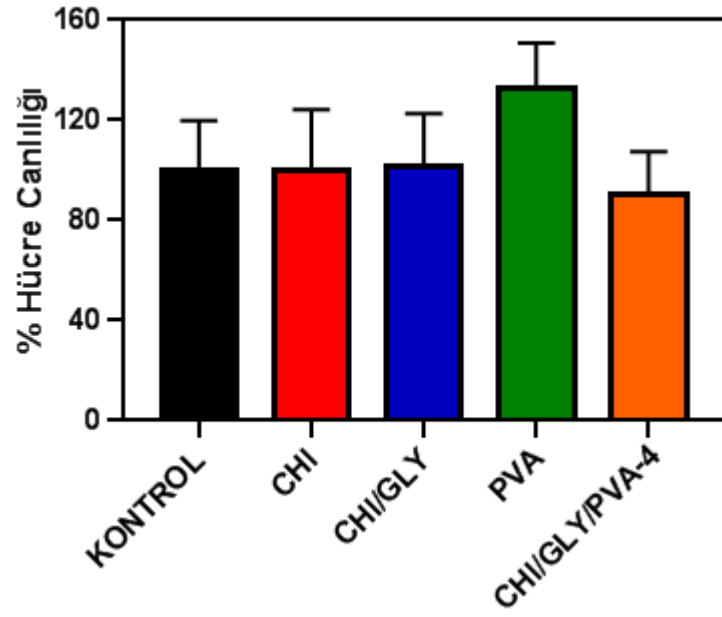
**Şekil 4. 54.** CHI, CHI/GLY, PPG ve CHI/GLY/PPG-4 örneklerinin L929 fare hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları

Ayrıca, inkübasyon sonrası örnek ekstraktları ile muamele edilen hücrelerin morfolojileri Şekil 4.55’de verilmiştir. Hücrelerin morfolojik yapısında değişme görülmemiştir. Sonuç olarak, hazırlanan CHI/GLY/PPG-4 ekstraktlarının hücre canlılığı üzerinde *in vitro* olarak toksik etkisinin olmadığı görülmüştür.



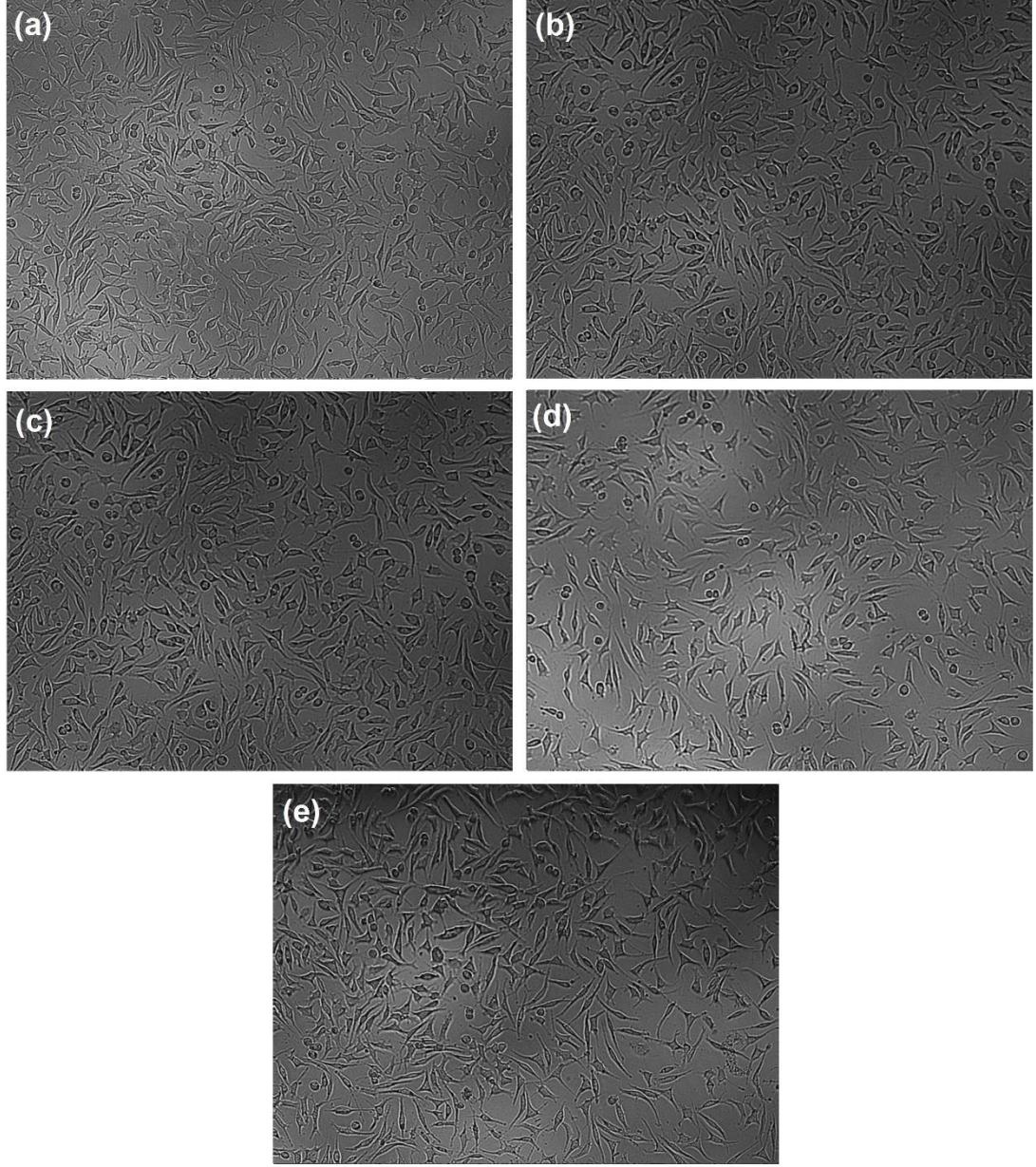
**Şekil 4. 55.** L929 fibroblast hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (a) Kontrol, (b) CHI, (c) CHI/GLY, (d) PPG ve (e) CHI/GLY/PPG-4

Hazırlanan örneklerin *in vitro* sitotoksitesi MTT testi kullanılarak kolorimetrik olarak test edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.56'da gösterilmiştir. Kontrole kıyaslandığında, CHI, CHI/GLY, PVA ve CHI/GLY/PVA-4 örneklerinin hücre canlılık oranları sırasıyla 100.3, 101.7, 133.1 ve 90.1 olarak bulunmuştur. Zaten, CHI, GLY ve PVA ( $M_w$ :9.000-10.000) biyoyumlulukları bilinen malzemelerdir. Elde edilen MTT testi sonuçları da bunu doğrulamaktadır.



**Şekil 4. 56.** CHI, CHI/GLY, PVA ve CHI/GLY/PVA-4 örneklerinin L929 fare hücrelerinde hücre canlılık testi sonuçları

Ayrıca, inkübasyon sonrası örnek ekstraktları ile muamele edilen hücrelerin morfolojileri Şekil 4.57’de verilmiştir. CHI/GLY/PVA-4 örneği de yüksek oranda biyoyumluluk göstermiştir. Hücrelerin morfolojik yapısında değişme görülmemiştir. Sonuç olarak, hazırlanan CHI/GLY/PVA-4 ekstraktlarının hücre canlılığı üzerinde *in vitro* olarak toksik etkisinin olmadığı görülmüştür.



**Şekil 4. 57.** L929 fibroblast hücrelerinin morfolojik görüntüsü, (a) Kontrol, (b) CHI, (c) CHI/GLY, (d) PVA ve (e) CHI/GLY/PVA-4

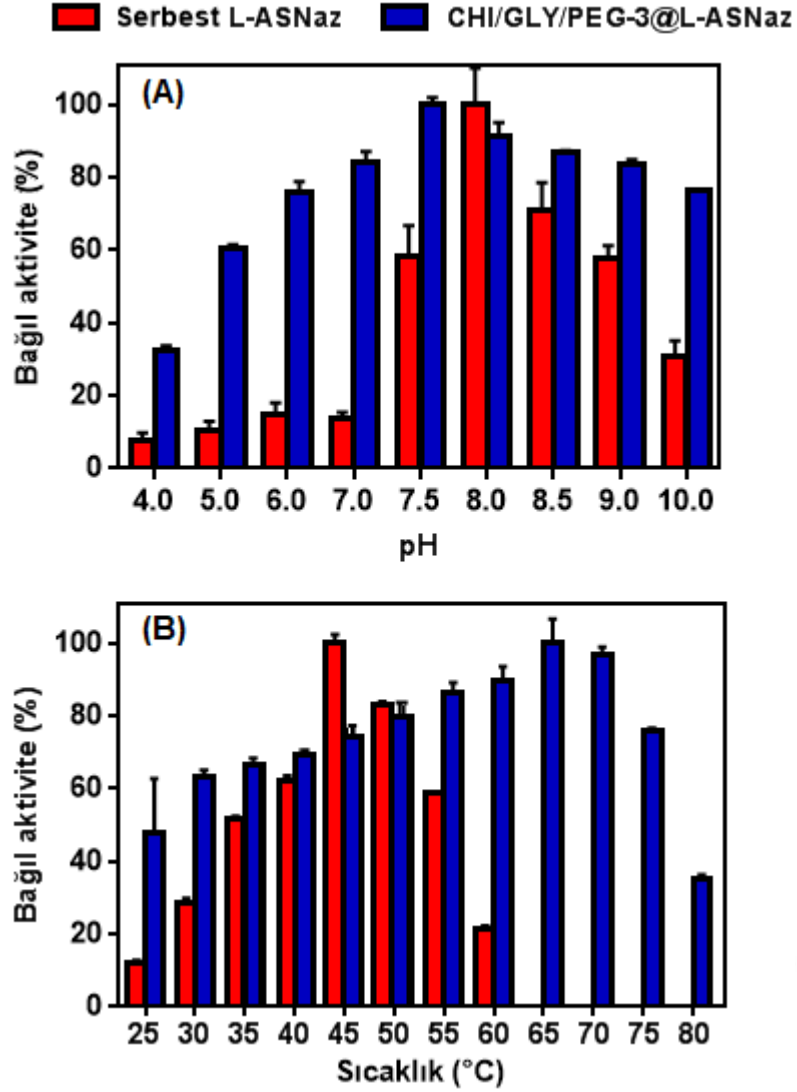
#### **4.3.9. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonunun immobilizasyon parametreleri**

##### **4.3.9.1. Optimum pH ve optimum sıcaklık**

pH, enzim aktivitelerini etkileyen başlıca parametrelerden biridir. Serbest L-ASNaz ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun, optimum pH değerini belirlemek için aktiviteleri pH:4 ile 10 aralığında ölçülmüştür. Şekil 4.58(A)'da görüldüğü üzere, serbest L-ASNaz ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonunun maksimum aktiviteleri sırasıyla pH 8.0 ve 7.5'de elde edilmiştir.

Genellikle, immobilizasyondan sonra enzimlerin konformasyonel değişimlerine bağlı olarak optimum pH'da değişimler olabilir. Optimum pH değerindeki bu değişim, enzimin aktif bölgesini saran mikro çevredeki asidik ve bazik amino asit yan zincir iyonizasyonundaki değişiklikten kaynaklanabilir. Ayrıca, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun temel bileşeni olan CHI'nın amino gruplarının reaktivitesi de pH değişimlerinden etkilenir. L-ASNaz enzimi bazik pH'da daha aktif bir enzimdir. Şekilden de görüldüğü üzere her iki enzimin de bazik bölgedeki aktivitesi asidik bölgeye göre daha yüksektir. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun bağlı aktivitesi serbest enziminkinden çok daha yüksektir. Bu immobilizasyon işleminin temel avantajıdır. İmmobilizasyon sayesinde enzim daha kararlı hale gelir ve çevresel faktörlerden serbest enzime kıyasla daha az etkilenir.

Serbest L-ASNaz ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun optimum sıcaklığı da 25-80 °C arasında araştırılmış ve elde edilen bulgular Şekil 4.58 (B)'de gösterilmiştir. Serbest enzimin maksimum bağlı aktivitesi 45 °C'de elde edilmiştir. Sıcaklık 60 °C'ye yükseltildiğinde, serbest enzim tamamen denatüre olurken, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonu yaklaşık %90 bağlı aktiviteye ulaşmış ve 65 °C'de maksimum aktivite göstermiştir. Ayrıca, 80 °C'de bile bağlı aktivitesinin yaklaşık %40'ını korumuştur. Bu sonuçlar, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun çok daha yüksek termal direncine sahip olduğunu göstermiştir.

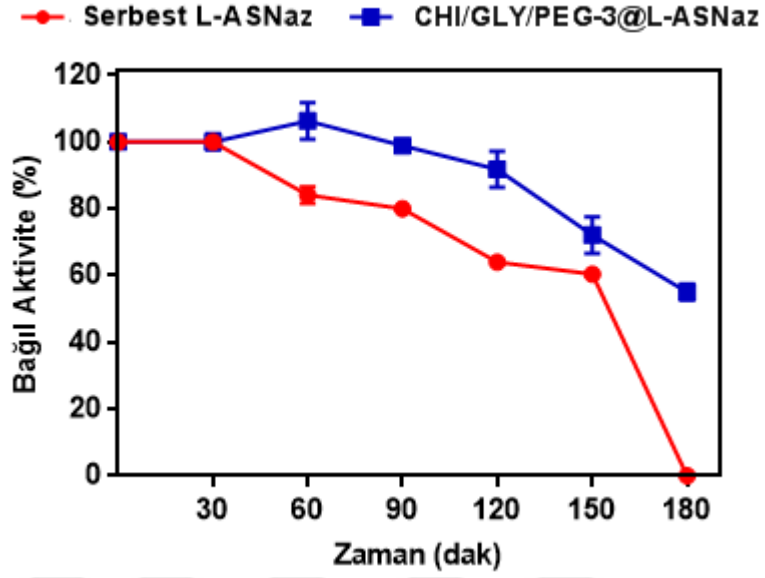


Şekil 4. 58. Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun (A) optimum pH ve (B) sıcaklık grafiği

#### 4.3.9.2. Termal kararlılık ve aktivasyon enerjisi

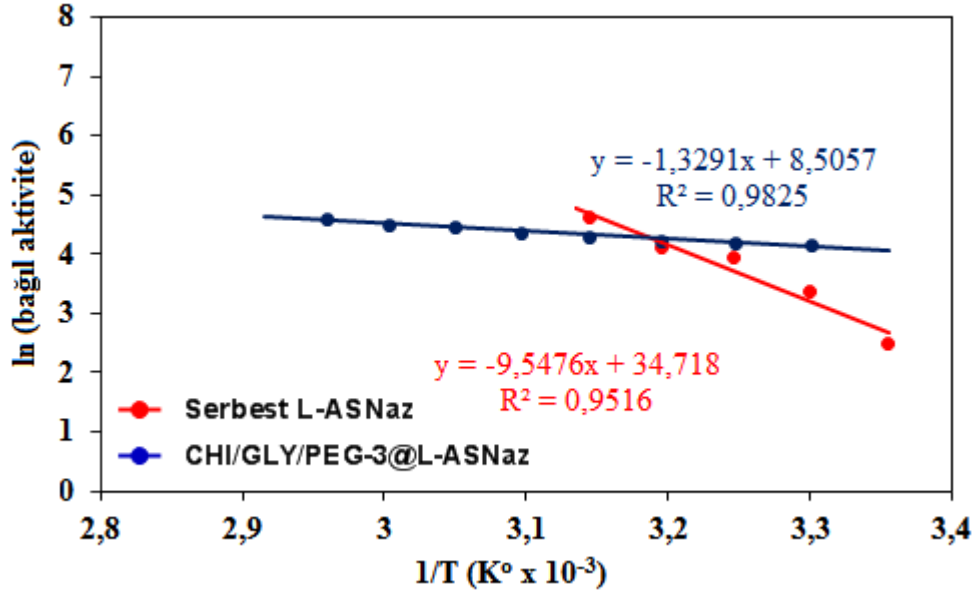
Termal kararlılık, serbest enzime kıyasla immobilize enzimlerin en önemli avantajlarından biridir. Şekil 4.59 hem serbest hem de CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun termal kararlılık sonuçlarını göstermektedir. 3 saat sonra 50 °C'de, serbest L-ASNaz başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını kaybederken, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonu başlangıç aktivitesinin %60'ını korumuştur. Sıcaklığa karşı dayanıklılıktaki bu iyileşme, hazırlanan formülasyon desteklerine L-ASNaz'ın immobilizasyonu nedeniyle, enzimin moleküler hareketliliğin ve konformasyonel değişikliklerin azalmasından kaynaklanmış olabilir. Bu sonuçlar immobilizasyonun termal kararlılığı önemli ölçüde iyileştirdiğini,

enzimin serbest enzimden fazla kararsız olduğu yüksek sıcaklıklarda bile kullanılması için umut vaat ettiğini göstermektedir.



**Şekil 4. 59.** Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları

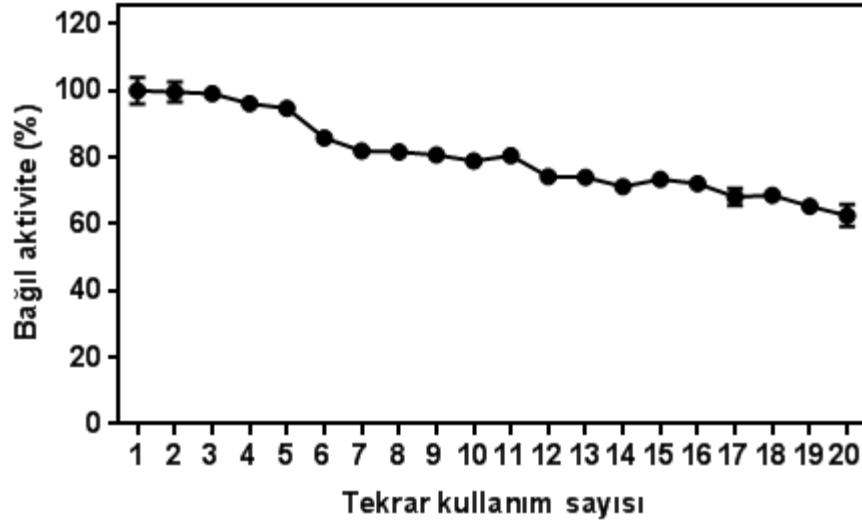
Arrhenius denklemi ile hesaplanan  $E_a$  değerleri, serbest enzim için  $79.38 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonu için  $11.05 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.60). İmmobilize edilmiş enzimler için  $E_a$  değerleri, serbest enzimden daha küçüktür, bu da immobilize edilmiş enzimlerin sıcaklığa daha az duyarlı oldukları anlamına gelir. Bir enzim reaksiyonunun aktivasyon enerjisi, immobilizasyon işleminin bir sonucu olarak değişebilir veya değişmeyebilir. Serbest enziminkinden daha düşük olan aktivasyon enerjisinin, immobilize edilmiş enzim durumunda ürün ve substratın difüzyon direncinin bir göstergesi olduğu düşünülebilir.



Şekil 4. 60. Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun Arrhenius grafiği

#### 4.3.9.3. Tekrar kullanılabilirlik

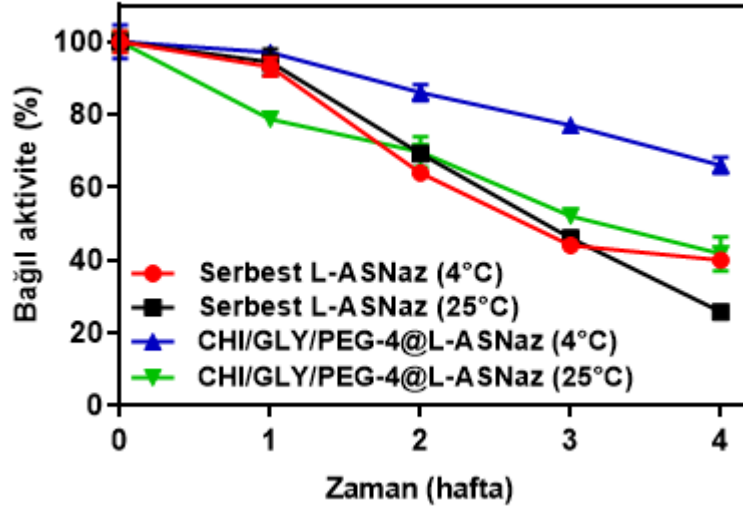
Tekrar kullanılabilirlik, immobilizasyon işleminin en önemli özelliklerden biridir. Şekil 4.61, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonunun tekrar kullanılabilirliğini göstermektedir. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz aktivitesi 3 döngüden sonra azalmaya başlamasına rağmen, başlangıç aktivitesinin %60'ından fazlasını 20 döngüden sonra bile hala korumuştur. Sonuçlardan da görüleceği üzere, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonu tekrar kullanım açısından daha iyidir. Aktivitenin azalması, bağların zayıflamasına ve sonuç olarak enzimin sızmasına sebep olmuş olabilir. Ayrıca, substratın tekrarlayan atağı nedeniyle protein konformasyonunun bozulmasına yol açarak, katalitik etkinliği azaltmış olabilir.



**Şekil 4. 61.** CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun tekrar kullanılabilirliği

#### 4.3.9.4. Depolama kararlılığı

Depolama kararlılığı, bir enzimin ticari ölçekte uygulanması için çok önemli bir parametredir ve depolama sırasında çözeltideki enzimin stabil olmadığı ve aktivitenin zamanla kendiliğinden azaldığı iyi bilinmektedir. Bundan dolayı hem serbest hem de CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun depolama kararlılığı her hafta ölçüm yapılmak üzere 4 haftalık süre boyunca 4 ve 25 °C'de araştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.62'de verilmiştir. Depolama koşulları altında, serbest enzim başlangıç aktivitesinin yaklaşık %60'ını ve %75'ini sırasıyla 4 ve 25 °C'de kaybetmiştir. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonu ise aynı süre zarfında başlangıç aktivitesinin %40 ve %60'ını 4 ve 25 °C'de kaybetmiştir. Bu dönemde enzimatik aktivitenin kaybı, uzun süreli depolama sırasında protein denatürasyonuna ve bozunmasına bağlanabilir. Bu sonuçlar, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun depolama kararlılığının hem 4 hem de 25 °C'de serbest enzim ile karşılaştırıldığında daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu deney sayesinde, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz formülasyonunun uzun süreli depolama kararlılığı sayesinde umut verici ve alternatif bir taşıyıcı matriks malzemesi olabileceği gösterilmiştir.

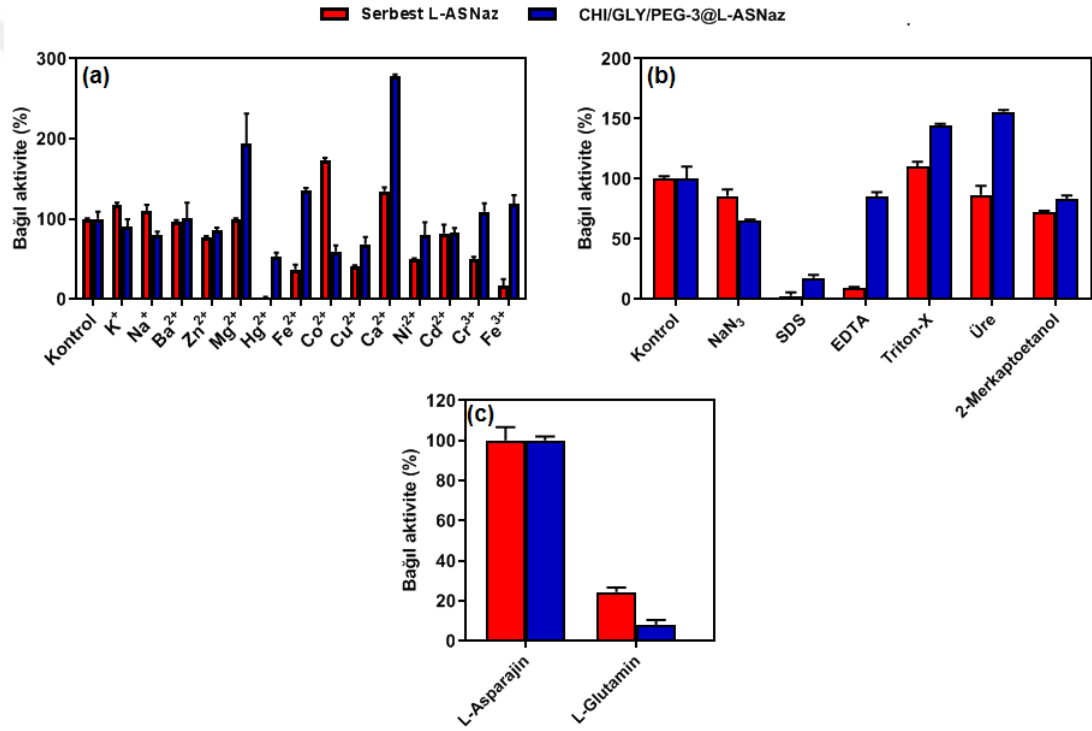


Şekil 4. 62. Serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz stent formülasyonunun +4 °C ve oda koşullarında depolama kararlılığı grafiği

#### 4.3.9.5. Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat spesifikliğı

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesine metal iyonlarının etkisini belirlemek için, enzim örnekleri farklı metal iyonlarıyla inkübe edilmiştir. Daha sonra kalan aktivite optimum koşullarda ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.63a'da gösterilmiştir.  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  gibi monovalent ve  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  divalent katyonların L-ASNaz aktivitesini arttırdığı literatürde rapor edilmiştir [275].  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ve  $\text{Ba}^{2+}$  gibi divalent katyonlarının ve  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Cr}^{3+}$  metal iyonlarının ise enzim aktivitesini inhibe ettiğine dair çalışmalar vardır [276–278]. Bizim çalışmamızda,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  sırasıyla enzim aktivitesini yaklaşık olarak %9, %17, %72 ve %34 oranında arttırmıştır.  $\text{Mg}^{2+}$  ise serbest enzim aktivitesini önemli ölçüde değiştirmemiştir. Diğer taraftan,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ve  $\text{Cr}^{3+}$  iyonları ise enzim aktivitesini sırasıyla yaklaşık olarak %50, %60, %70, %98, %20, %20, %5, %80 ve %50 oranında inhibe etmiştir. Immobilize enzimin aktivitesi ise serbest enzime benzer şekildedir. Ancak, immobilize enzim aktiviteyi inhibe eden metal iyonlarından serbest enzim kadar etkilenmemiştir. Bu kararlılık, zaten immobilizasyon yönteminin en önemli avantajı olan çevresel faktörlerden en az etkilenme olayıdır. Örneğin,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  sırasıyla serbest enzimin bağıl aktivitesini %98, %60, %50, %80, %50 ve %60 oranında azaltmıştır. Immobilize enzimin bağıl aktivitesini  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  metal çözeltileri yaklaşık olarak %50, %30 ve %20 oranında azaltırken  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  sırasıyla %20, %9 ve %35 oranında arttırmıştır. Sonuç olarak, immobilize enzimin aktivitesi serbest enzime

kıyasla daha fazladır ve elde edilen sonuçlar literatür ile tamamen uyum içerisindedir [277]. Ayrıca, serbest ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz enzim örneklerine farklı reaktiflerin aktiviteleri üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 4.63b). Özellikle SDS ve EDTA serbest enzimi neredeyse tamamen inhibe ederken, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz'ın aktivitesi serbest enzime kıyasla daha yüksektir. Sonuçlar, immobilizasyonun enzimi bazı kimyasalların inhibe edici etkilerine karşı koruduğunu göstermiştir. Serbest ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz doğal substratına, yani L-asparajine karşı yüksek bir özgüllük sergilemiştir. Bununla birlikte, L-glutamine karşı sırasıyla yaklaşık %20 ve %8 oranında bağlı aktivite gözlemlenmiştir (Şekil 4.63c). Her iki enzimle, etkileşime giren başka bir substrat bulunamamıştır.

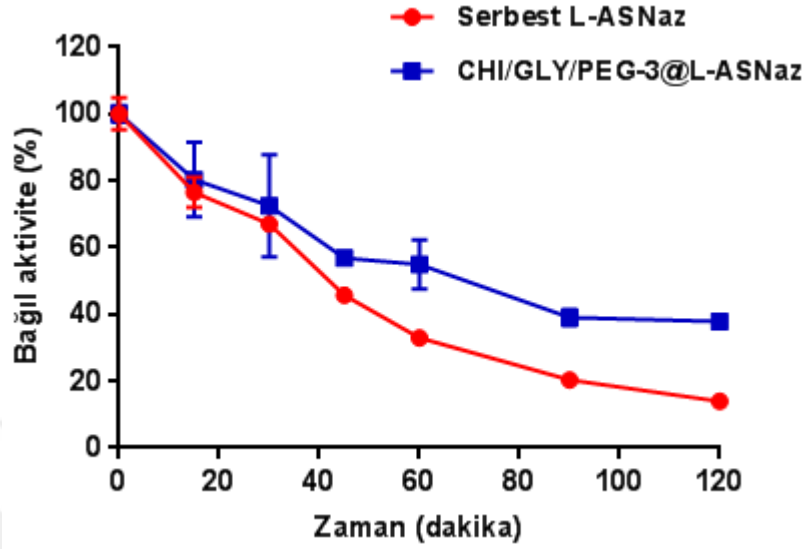


**Şekil 4. 63.** Kimyasal parametrelerin serbest enzim ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz'ın üzerindeki etkisi a) Metal iyonlarının (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; b) İnhibitörlerin (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; c) Substrat (10 mM) özgüllüğü

#### 4.3.9.6. Tripsin direnci

Hem serbest enzimin hem de CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direnci Şekil 4.64'te gösterilmiştir. Sonuçlar, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direncinin, serbest forma kıyasla büyük ölçüde geliştiğini göstermiştir. Tripsin ilavesiyle 120 dakika hidrolizden sonra, serbest L-

ASNaz neredeyse tamamen hidroliz olurken, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz orijinal aktivitesinin %40'ını korumuştur.



Şekil 4. 64. Serbest ve CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direnci

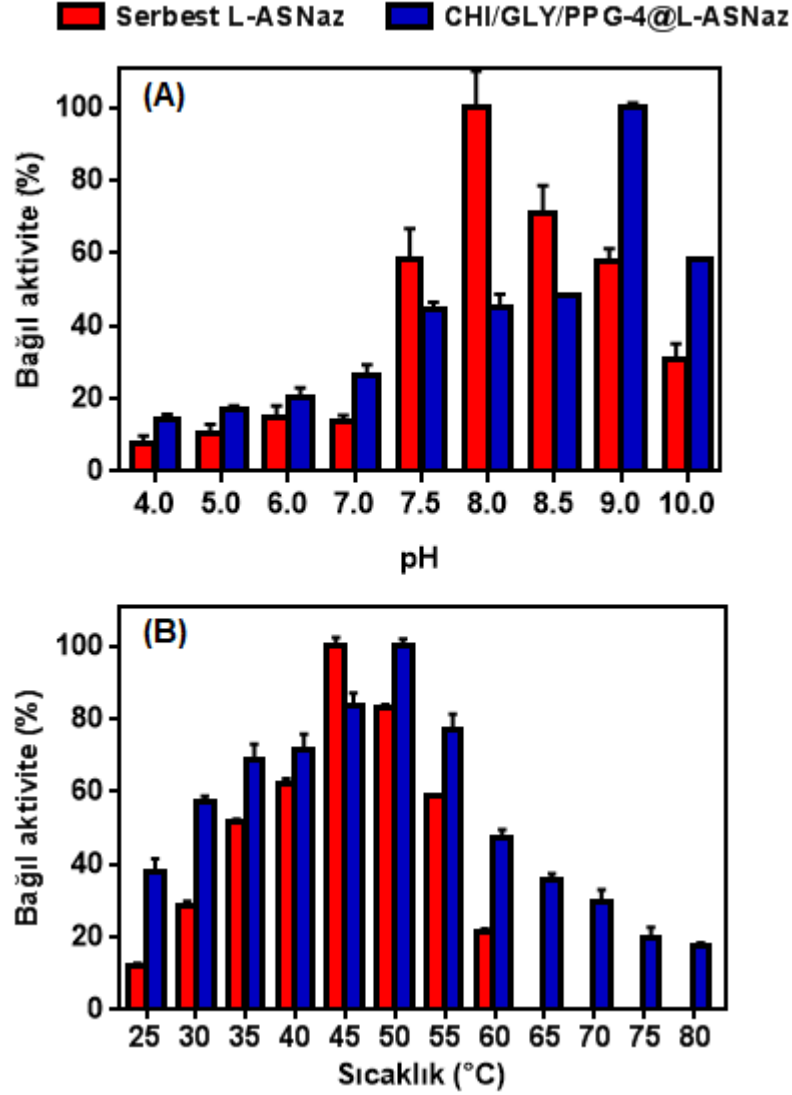
#### 4.3.10. CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz formülasyonunun immobilizasyon parametreleri

##### 4.3.10.1. Optimum pH ve optimum sıcaklık

Serbest enzim için optimum pH 8.0 iken, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz için optimum pH değerinin 9.0'a yükseldiği görülmüştür (Şekil 4.65A). Bu değişimin nedeni olarak, enzim ile formülasyon arasındaki fiziksel veya kimyasal etkileşimlerden kaynaklanan enzimdeki yapısal konformasyonel değişimler gösterilebilir. Serbest enzim ile karşılaştırıldığında, immobilize edilmiş enzim, bağlı aktivitenin %40'ından fazlasını, 7.5 ile 10.0 arasında daha geniş bir pH aralığında göstermiştir. İmmobilize edilmiş enzimin yüksek pH direnci, enzim ile formülasyon arasındaki güçlü bağlanmalardan kaynaklanmış olabilir.

Serbest ve immobilize enzimin aktivitesi üzerindeki sıcaklık etkisi Şekil 4.65B'de gösterilmiştir. İmmobilize enzimin bağlı aktivitesinin, serbest enzimin optimum sıcaklığı hariç tüm sıcaklıklarda serbest enziminkinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, immobilizasyonun enzimin hareketini sınırladığını ve konformasyonel bütünlüğü arttırdığını göstermektedir. Serbest enzim için optimum sıcaklık 45 °C iken bu değer, immobilize enzim için 50 °C'ye yükselmiştir. Optimum

sıcaklığın artması, enzim ve hazırlanan CHI/GLY/PPG-4 formülasyonu arasında gerçekleşen etkileşimlerden dolayı enzimin substrata olan afinitesi artmış ve enzim yapısının konformasyonel bütünlüğünün değişmesinden kaynaklanmış olabilir.

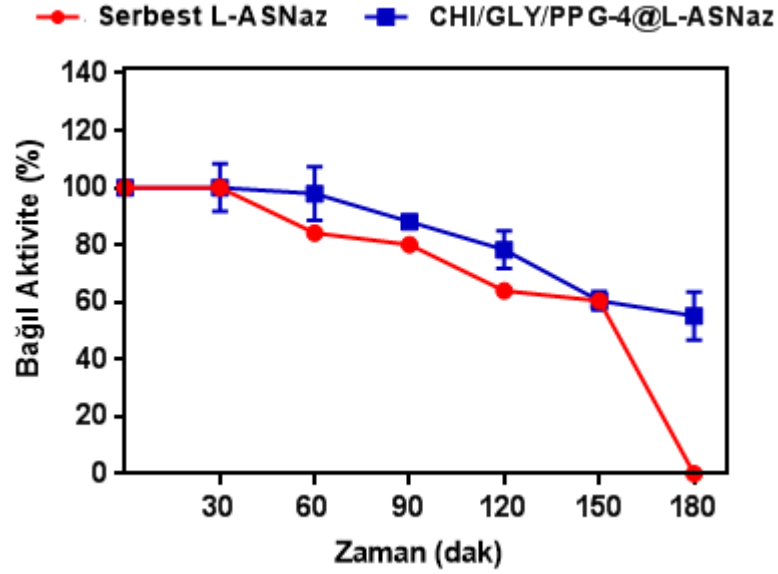


**Şekil 4.65.** Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun (A) optimum pH ve (B) sıcaklık grafiği

#### 4.3.10.2. Termal kararlılık ve aktivasyon enerjisi

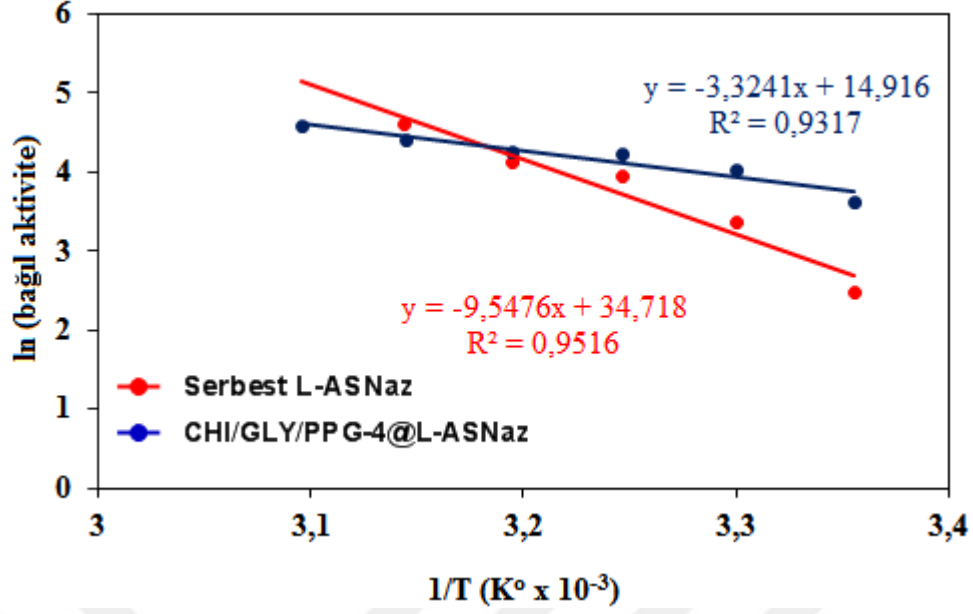
Termostabilite, pratik uygulamalarda enzim bazlı materyaller için en önemli özelliklerden biridir. Serbest L-ASNaz ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNazın termostabilitesi, sırasıyla 50 ve 55 °C'de 30 dakika aralıklarla 0-180 dakika inkübe edilmesiyle araştırılmıştır (Şekil 4.66). Serbest enzim 180 dakika içinde tamamen denatüre olurken immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %60'dan fazlasını

korumayı başarmıştır. Sonuç olarak, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz serbest enzimden çok daha termostabil olduğu bulunmuştur. Bu olağanüstü stabilite, enzimlerin amino asit zincirinin açılmasını önleyen enzim konformasyonunu stabilize eden, CHI/GLY/PPG-4 formülasyonuna enzimlerin dahil edilmesine bağlanabilir.



**Şekil 4. 66.** Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları

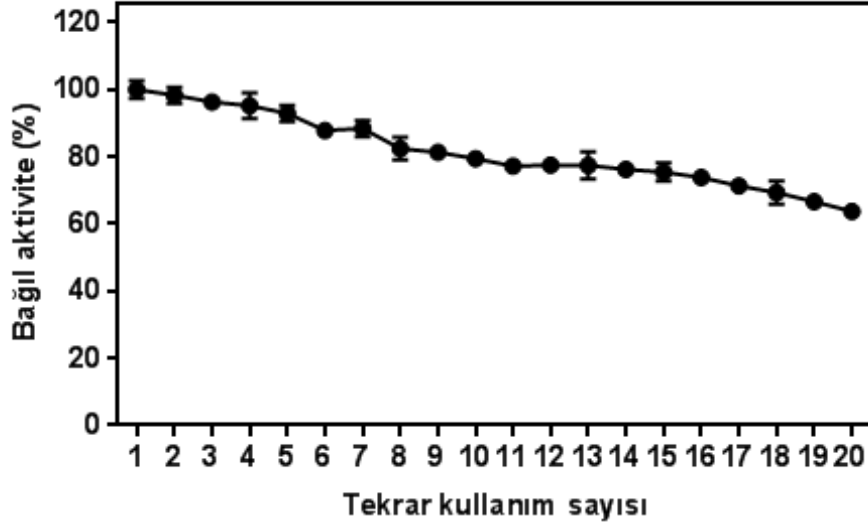
Arrhenius denklemi ile hesaplanan  $E_a$  değerleri, serbest enzim için  $79.38 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonu için  $27.63 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.67). İmmobilize edilmiş enzimler için  $E_a$  değerleri, serbest enzimden daha küçüktür, bu da immobilize edilmiş enzimlerin sıcaklığa daha az duyarlı oldukları anlamına gelir. Bir enzim reaksiyonunun aktivasyon enerjisi, immobilizasyon işleminin bir sonucu olarak değişebilir veya değişmeyebilir. Serbest enziminkinden daha düşük olan aktivasyon enerjisinin, immobilize edilmiş enzim durumunda ürün ve substratın difüzyon direncinin bir göstergesi olduğu düşünülebilir.



Şekil 4. 67. Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun Arrhenius grafiği

#### 4.3.10.3. Tekrar kullanılabilirlik

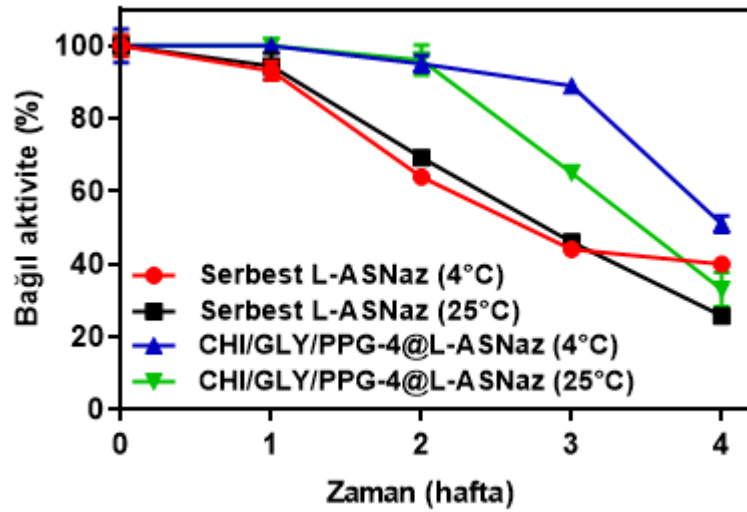
Enzimatik membranların uzun süreli kullanımı istenilen bir özelliktir. Bu nedenle, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz formülasyonunun yeniden kullanılabilirliği test edilmiştir. Başlangıç aktivitesinin ölçülmesinden sonra, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz formülasyonu 15 dakika süreyle taze substrat çözeltisiyle inkübe edilmiş ve daha sonra aktivitesi test edilmiştir. Bu işlem 20 kez tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.68'de sunulmuştur. CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ardışık 20 döngü gerçekleştirdikten sonra bile başlangıç aktivitesinin %69.70'ini korumuştur. Ayrıca, yıkanmış çözeltide hiçbir aktivite gözlenmemiştir, bu da filmlerden L-ASNaz kaybı olmadığını göstermiştir. Tekrar kullanılabilirlik test işleminde enzimatik aktivitenin azalması, immobilize enzimin deaktive edilmesine atfedilebilir.



Şekil 4. 68. CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun yeniden kullanılabilirliği

#### 4.3.10.4. Depolama kararlılığı

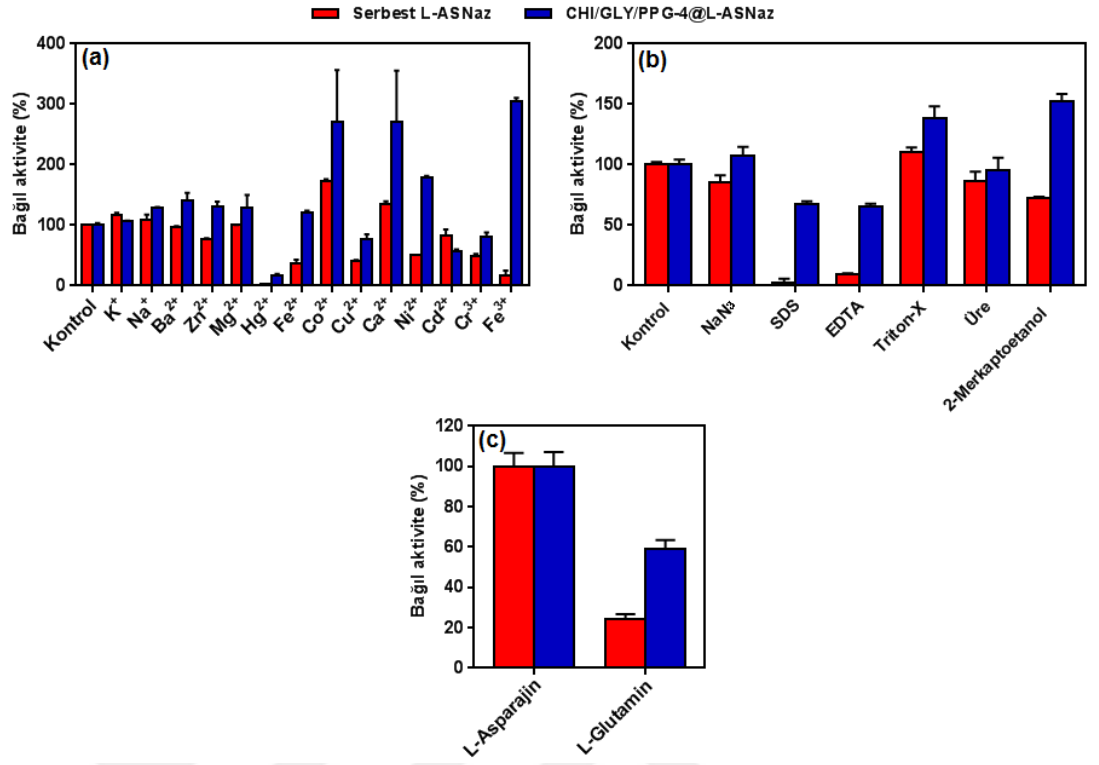
Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz formülasyonunun depolama stabilitelerini araştırmak için, enzimler 4 ve 25 °C'de depolanmış ve kalan aktiviteler L-ASNaz aktivitesi analizi bölümünde tarif edildiği gibi ölçülmüştür. Şekil 4.69'da gösterildiği gibi, 4 haftalık depolamadan sonra, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz 4 ve 25 °C'de başlangıçtaki aktivitelerinin sırasıyla %51 ve %33'ünü korumuştur. Serbest enzim ise ilk aktivitesinin sırasıyla %40 ve %25'ini korumuştur. Özellikle, 4 °C'de immobilize enzim daha yüksek depolama kararlılığı göstermiştir.



Şekil 4. 69. Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun +4 °C ve oda koşullarında depolama kararlılığı grafiği

#### 4.3.10.5. Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat spesifikliği

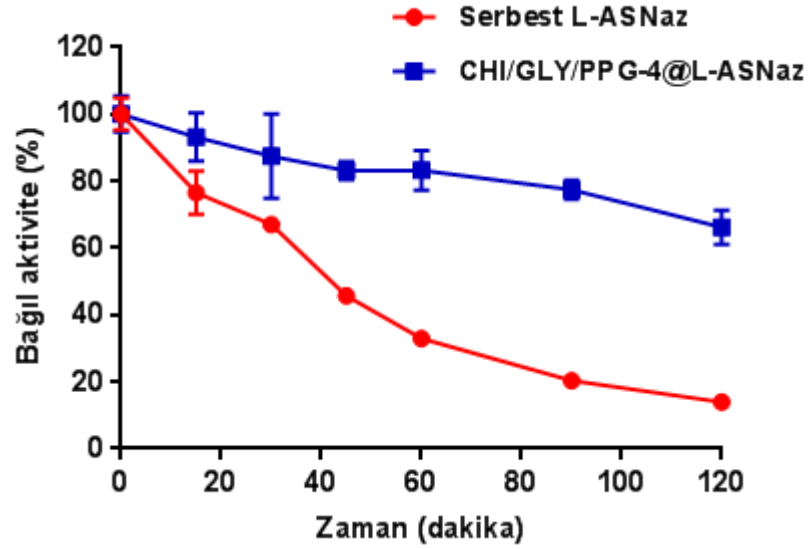
Serbest ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz enzimlerinin aktivitesine metal iyonlarının etkisini belirlemek için, enzim örnekleri farklı metal iyonlarıyla inkübe edilmiştir. Daha sonra kalan aktivite optimum koşullarda ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 70a'da gösterilmiştir. Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> gibi monovalent ve Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> divalent katyonların L-ASNaz aktivitesini arttırdığı literatürde rapor edilmiştir [275]. Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve Ba<sup>2+</sup> gibi divalent katyonlarının ve Fe<sup>3+</sup> ve Cr<sup>3+</sup> metal iyonlarının ise enzim aktivitesini inhibe ettiğine dair çalışmalar vardır [276–278]. Bizim çalışmamızda, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> sırasıyla serbest enzim aktivitesini yaklaşık olarak %9, %17, %72 ve %34 oranında arttırmıştır. Mg<sup>2+</sup> ise serbest enzim aktivitesini önemli ölçüde değiştirmemiştir. Diğer taraftan, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Cr<sup>3+</sup> iyonları ise serbest enzim aktivitesini sırasıyla yaklaşık olarak %50, %60, %70, %98, %20, %20, %5, %80 ve %50 oranında inhibe etmiştir. İmmobilize enzimin aktivitesi ise serbest enzime benzer şekildedir. Ancak, immobilize enzim aktiviteyi inhibe eden metal iyonlarından serbest enzim kadar etkilenmemiştir. Bu kararlılık, zaten immobilizasyon yönteminin en önemli avantajı olan çevresel faktörlerden en az etkilenme olayıdır. Örneğin, Co<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> sırasıyla immobilize enzimin aktivitesini yaklaşık olarak %271 oranında arttırmıştır. Ayrıca, Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup> iyonları serbest enzimi inhibe ederken immobilize enzimin aktivitesini inhibe etmemiştir. Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> iyonları ise immobilize enzimin aktivitesini sırasıyla %24, %83 ve %44 oranında inhibe etmiştir. Sonuç olarak, immobilize enzimin aktivitesi serbest enzime kıyasla daha fazladır ve elde edilen sonuçlar literatür ile tamamen uyum içerisindedir [277]. Ayrıca, serbest ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz enzim örneklerine farklı reaktiflerin aktiviteleri üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 4.70b). Özellikle SDS ve EDTA serbest enzimi neredeyse tamamen inhibe ederken, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz'ın aktivitesi serbest enzime kıyasla daha yüksektir. Sonuçlar, immobilizasyonun enzimi bazı kimyasalların inhibe edici etkilerine karşı koruduğunu göstermiştir. Serbest ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz doğal substratına, yani L-asparajine karşı yüksek bir özgülük sergilemiştir. Bununla birlikte, L-glutamine karşı sırasıyla yaklaşık %20 ve %60 oranında bağıl aktivite gözlemlenmiştir (Şekil 4.70c). Her iki enzimle, etkileşime giren başka bir substrat bulunamamıştır.



**Şekil. 4. 70.** Kimyasal parametrelerin serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz'ın üzerindeki etkisi a) Metal iyonlarının (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; b) İnhibitörlerin (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; c) Substrat (10 mM) özgüllüğü

#### 4.3.10.6. Tripsin direnci

Hem serbest enzimin hem de CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direnci Şekil 4.71'de gösterilmektedir. Sonuçlar, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direncinin, serbest forma kıyasla büyük ölçüde geliştiğini göstermiştir. Tripsin ilavesiyle 120 dakika hidrolizden sonra, serbest L-ASNaz neredeyse tamamen hidroliz olurken, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz orijinal aktivitesinin yaklaşık %70'ini korumuştur.



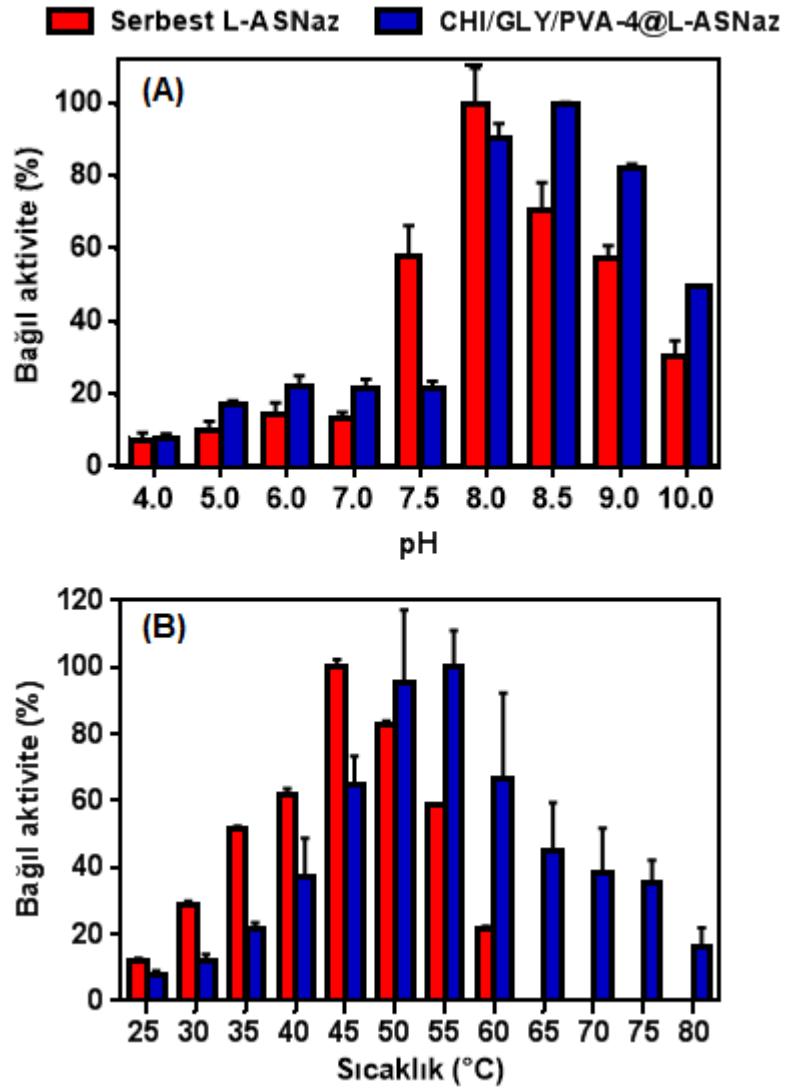
Şekil 4. 71. Serbest enzim ve CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz stent formülasyonunun tripsin direncinin grafiği

#### 4.3.11. CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz formülasyonunun immobilizasyon parametreleri

##### 4.3.11.1. Optimum pH ve optimum sıcaklık

Serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri üzerindeki pH etkisi Şekil 4.72A'da gösterildiği gibi, serbest ve immobilize enzim sırasıyla pH 8.0 ve 8.5'de maksimum aktivite sergilemişlerdir. Dahası, alkali pH'da (8.5-10.0) immobilize enzimin serbest formuna göre çok daha kararlı olduğu görülmektedir. Zaten, L-ASNaz'ın bazik bölgede daha aktif olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı immobilize enzim serbest enzime göre çok daha avantajlıdır.

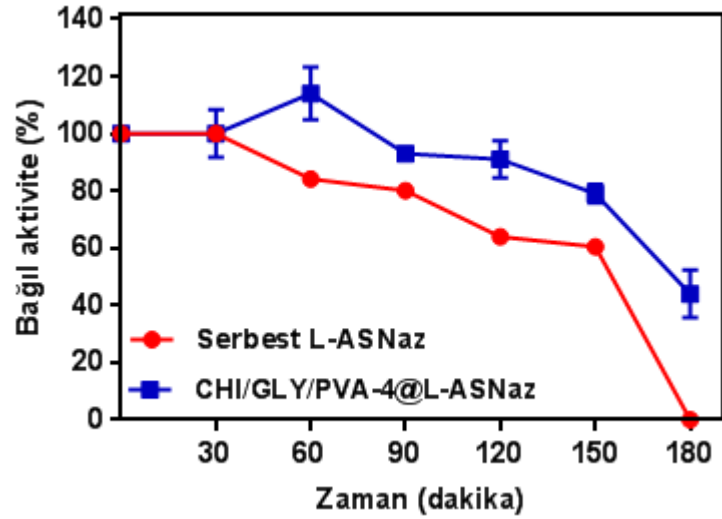
Sıcaklığın serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri üzerindeki etkisi Şekil 4.72B'de gösterilmiştir. Serbest enzim için optimum sıcaklık 45 °C iken, immobilize enzim için bu değer 55 °C'ye kaydığı bulunmuştur. Yani, sıcaklık değişiminin immobilize enzimin katalitik aktivitesi üzerinde daha az bir etkisi vardır.



**Şekil 4. 72.** Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun (A) optimum pH ve (B) sıcaklık grafiği

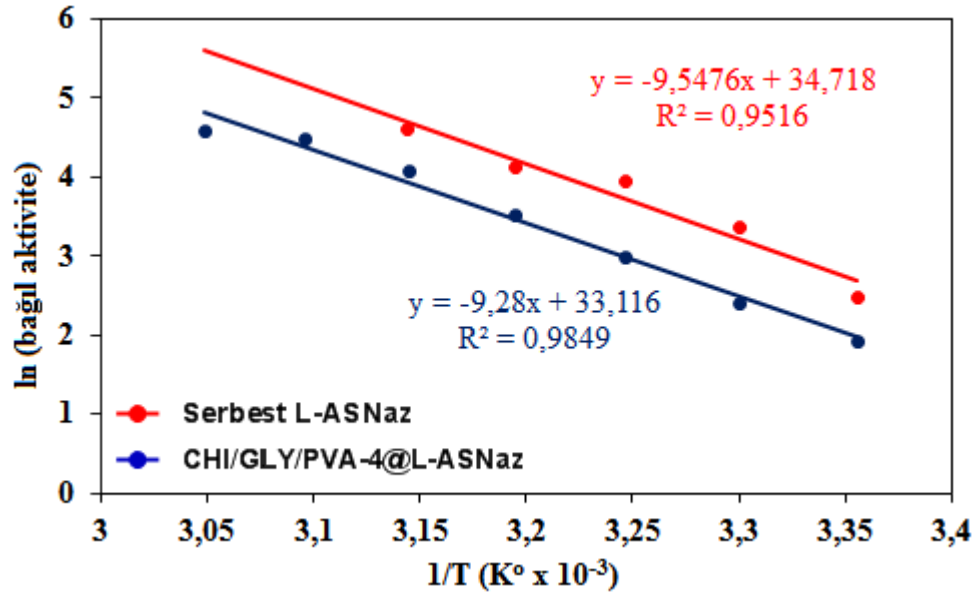
#### 4.3.11.2. Termal kararlılık ve aktivasyon enerjisi

Sıcaklığın serbest ve immobilize enzimin kararlılığına etkisi Şekil 4.73’de gösterilmiştir. Hem serbest hem de immobilize enzimin aktiviteleri uzun süreli inkübasyondan olumsuz etkilenmişlerdir. Kalan aktivite 180 dakikada önemli ölçüde düşmüştür. Ancak, serbest enzimle karşılaştırıldığında, immobilize enzim daha az aktivite kaybetmiştir. 180 dakika inkübasyondan sonra immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %56’sını korurken, serbest enzim ise tüm aktivitesini kaybetmiştir. İmmobilize enzimin bu artan termal kararlılığı onun mikro çevresiyle alakalıdır. Polimerik taşıyıcı matriksle konjuge edilmiş enzim molekülleri için daha sert dış bir omurga oluşturulmuştur. Bu koruyucu tabaka sayesinde enzimatik konfigürasyon bozukluklarına ve ısı değişimiyle oluşabilecek hasarlara karşı enzim korunmuştur.



**Şekil 4. 73.** Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının inkübasyon zamanına bağlı termal kararlılıkları

Arrhenius denklemi ile hesaplanan  $E_a$  değerleri, serbest enzim için  $79.38 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonu için  $77.15 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.74). CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz için  $E_a$  değeri, serbest enzimdekine çok yakındır. Yani immobilizasyondan sonra, enzimin  $E_a$  değeri etkilenmemiştir.

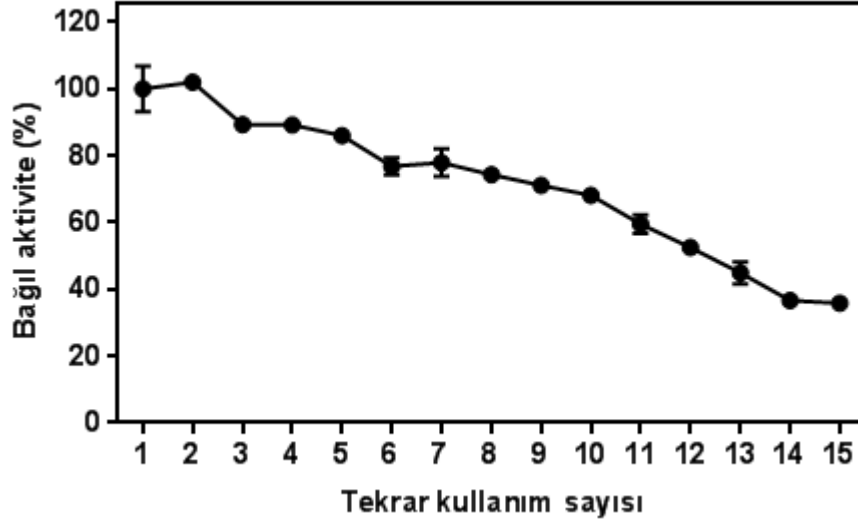


**Şekil 4. 74.** Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun Arrhenius grafiği

#### 4.3.11.3. Tekrar kullanılabilirlik

Yeniden kullanılabilirlik, immobilize enzimlerin en önemli avantajlarından biridir. Şekil 4.75, oda sıcaklığında immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliğini

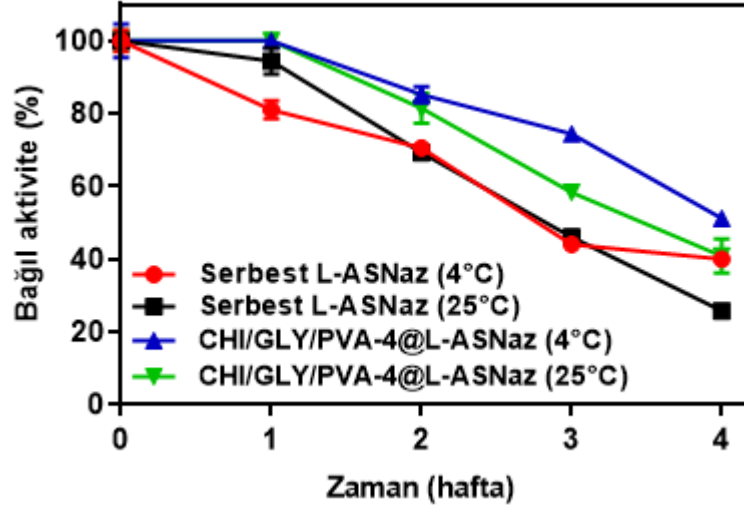
göstermektedir. 5 döngüden sonra, immobilize enzim başlangıç aktivitesinin yaklaşık %85'ini muhafaza etmiştir. 10 döngüden sonra başlangıç aktivitesinin yaklaşık %60'ını ve 15 tekrar kullanımdan sonra ise başlangıç aktivitesinin %36'sını korumuştur. Immobilize enzimdeki aktivitenin kaybı, yeniden kullanım sırasında konformasyonel değişikliklerden veya taşıyıcı matriksinden sızıntıdan kaynaklanmış olabilir.



Şekil 4. 75. CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun yeniden kullanılabilirliği

#### 4.3.11.4. Depolama kararlılığı

Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz formülasyonunun depolama stabilitesini araştırmak için, enzimler 4 ve 25 °C'de depolanmış ve kalan aktiviteler L-ASNaz aktivitesi analizi bölümünde tarif edildiği gibi ölçülmüştür. Şekil 4.76'da gösterildiği gibi, 4 haftalık depolamadan sonra, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz 4 ve 25 °C'de başlangıçtaki aktivitelerinin sırasıyla %51 ve %40'ını korumuştur. Serbest enzim ise ilk aktivitesinin sırasıyla %40 ve %25'ini korumuştur. Özellikle, 4 °C'de immobilize enzim daha yüksek depolama kararlılığı göstermiştir.

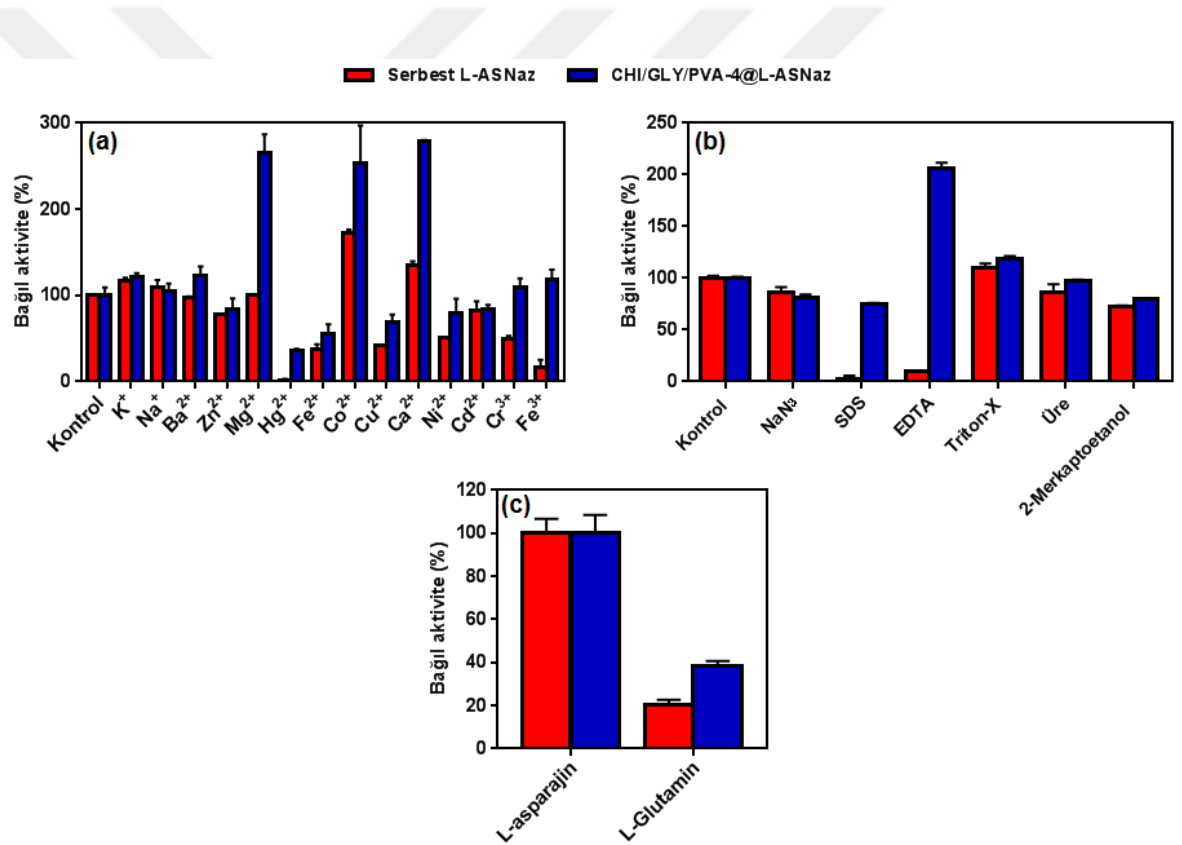


**Şekil 4. 76.** Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun +4 °C ve oda koşullarında depolama kararlılığı grafiği

#### 4.3.11.5. Metal iyon etkisi, inhibitör etkisi ve substrat spesifikliğı

Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesine metal iyonlarının etkisini belirlemek için, enzim örnekleri farklı metal iyonlarıyla inkübe edilmiştir. Daha sonra kalan aktivite optimum koşullarda ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4. 77a'da gösterilmiştir. Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> gibi monovalent ve Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Mg<sup>2+</sup> divalent katyonların L-ASNaz aktivitesini arttırdığı literatürde rapor edilmiştir [275]. Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> ve Ba<sup>2+</sup> gibi divalent katyonlarının ve Fe<sup>3+</sup> ve Cr<sup>3+</sup> metal iyonlarının ise enzim aktivitesini inhibe ettiğine dair çalışmalar vardır [276–278]. Bizim çalışmamızda, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> sırasıyla enzim aktivitesini yaklaşık olarak %9, %17, %72 ve %34 oranında arttırmıştır. Mg<sup>2+</sup> ise serbest enzim aktivitesini önemli ölçüde değiştirmemiştir. Diğer taraftan, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Cr<sup>3+</sup> iyonları ise enzim aktivitesini sırasıyla yaklaşık olarak %50, %60, %70, %98, %20, %20, %5, %80 ve %50 oranında inhibe etmiştir. İmmobilize enzimin aktivitesi ise serbest enzime benzer şekildedir. Ancak, immobilize enzim aktiviteyi inhibe eden metal iyonlarından serbest enzim kadar etkilenmemiştir. Bu kararlılık, zaten immobilizasyon yönteminin en önemli avantajı olan çevresel faktörlerden en az etkilenme olayıdır. Örneğin, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> sırasıyla immobilize enzimin aktivitesini yaklaşık olarak %5, %21, %153 ve %178 oranında arttırmıştır. Ayrıca, Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ve Cr<sup>3+</sup> iyonları serbest enzimi inhibe ederken immobilize enzimin aktivitesini inhibe etmemiştir. Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> iyonları ise immobilize enzimin aktivitesini sırasıyla %20, %30, %55, %65, %16 ve %20 oranında

inhibe etmiştir. Sonuç olarak, immobilize enzimin aktivitesi serbest enzime kıyasla daha fazladır ve elde edilen sonuçlar literatür ile tamamen uyum içerisindedir [277]. Ayrıca, serbest ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz enzim örneklerine farklı reaktiflerin aktiviteleri üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 4.77b). Özellikle SDS ve EDTA serbest enzimi neredeyse tamamen inhibe ederken, CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz'ın aktivitesi serbest enzime kıyasla daha yüksektir. Sonuçlar, immobilizasyonun enzimi bazı kimyasalların inhibe edici etkilerine karşı koruduğunu göstermiştir. Serbest ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz doğal substratına, yani L-asparajine karşı yüksek bir özgülük sergilemiştir. Bununla birlikte, L-glutamine karşı sırasıyla yaklaşık %20 ve %40 oranında bağıl aktivite gözlemlenmiştir (Şekil 4.77c). Her iki enzimle, etkileşime giren başka bir substrat bulunamamıştır.

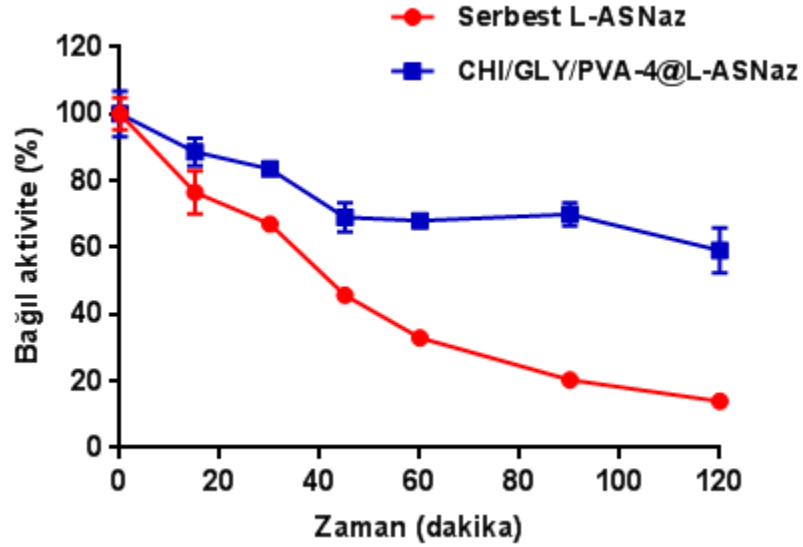


**Şekil 4. 77.** Kimyasal parametrelerin serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz'ın üzerindeki etkisi a) Metal iyonlarının (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; b) İnhibitörlerin (10 mM) enzim aktivitesi üzerine etkisi; c) Substrat (10 mM) özgülüğü

#### 4.3.11.6. Tripsin direnci

Hem serbest enzimin hem de CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direnci Şekil 4.78'de gösterilmektedir. Sonuçlar, CHI/GLY/PVA-

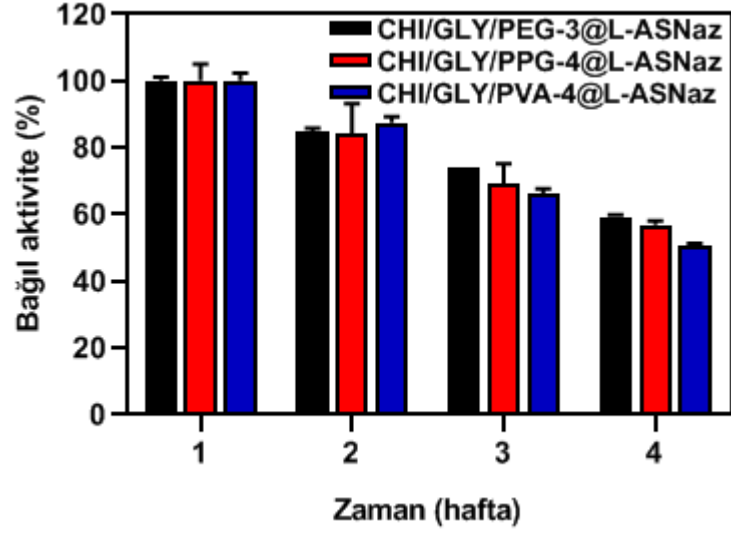
4@L-ASNaz'ın tripsin sindirimine karşı direncinin, serbest forma kıyasla büyük ölçüde geliştiğini göstermiştir. Tripsin ilavesiyle 120 dakika hidrolizden sonra, serbest L-ASNaz neredeyse tamamen hidroliz olurken, CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz orijinal aktivitesinin %60'ını korumuştur.



Şekil 4. 78. Serbest enzim ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonunun tripsin direncinin grafiği

#### 4.3.12. *In vitro* akış koşullarında stent formülasyonlarının uygulanabilirliği

Tez çalışmamızın son kısmında hazırlanan CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının damar akış koşullarını taklit ettiğimiz biyoreaktör sisteminde zamana karşı kararlılıkları incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.79'da gösterilmiştir. Bu biyoreaktör sisteminde örnekler sabit akış koşullarında devamlı olarak substrat çözeltisine maruz bırakılmıştır. Her hafta sonunda olmak üzere toplam bir aylık bir süre boyunca örneklerin kalan aktiviteleri hesaplanmıştır. Yapılan deney sonucunda her üç stent formülasyonun da başlangıç aktivitelerinin yarısından fazlasını koruduğu görülmüştür.



Şekil 4. 79. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının *in vitro* akış koşullarında uygulanabilirliği

## 5. SONUÇ

L-ASNaz, özellikle ALL denilen çocuk lösemisi olmak üzere birçok lösemi hastalığının tedavisinde kullanılan enzim ilaçlardan biridir. Ancak, bu enzim biyoteknolojik bir ürün olduğu için hem hastalarda immün yanıtı sebep olur hem de yarı ömrü kısadır. Bundan dolayı immün yanıtı azaltmak ve yarı ömrünü uzatmak için L-ASNaz hastalara pegile formu olan PEG-L-ASNaz formülasyonunda damar yoluyla uygulanmaktadır. Ancak, diğer taraftan bu formülasyona alternatif olabilecek veya bu formülasyonu geliştirmek amacıyla bilimsel çalışmalar yapılmakta ve yayımlanmaktadır. Şimdiye kadar L-ASNaz'ın immobilizasyonunda taşıyıcı malzeme olarak kullanılmak üzere geniş bir yelpazede (doğal ve sentetik polimerler, kopolimerler, nanopartiküller, manyetik nanopartiküller, kompozitler, kırmızı kan hücreleri vb.) malzemeler kullanılmıştır. Şekil hafızalı biyobozunur polimerik stentler kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde tıkanan damarların mekanik olarak genişletilmesinde ilaçlı veya ilaçsız olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak, bu stentlerin enzim immobilizasyonu için taşıyıcı malzemesi olarak kullanılma fikri daha önce önerilmemiştir. L-ASNaz bu amaç doğrultusunda kullanılmak için en ideal enzim ilaçlardan birisidir. Çünkü L-ASNaz kan dolaşım sisteminde katalitik etkinlik sergileyen nadir enzimlerden biridir. Bu bağlamda, doktora tez çalışmamda ilk kez şekil hafızalı biyobozunur polimerik stentler rutin kullanımının dışında L-ASNaz immobilizasyonunda kullanılmış ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

Tez çalışmamızda şekil hafızalı biyobozunur stent hazırlamak için CHI, GLY ve üç farklı polimer (PEG, PPG ve PVA) formülasyonu hazırlanmıştır. CHI, biyoyumlu, biyobozunur ve şekil hafıza karakteri kazandırmak için çapraz bağlama yapabilecek fonksiyonel gruplara sahiptir. Ancak, CHI çok esnek bir yapıya sahip olmadığı için mekanik özellikleri zayıftır. Bundan dolayı yapıya az miktarda plastikleştirici olarak GLY eklenmiştir. Formülasyonun üçüncü monomeri olarak ise farklı molekül ağırlıklarına sahip PEG, PPG ve PVA polimerleri farklı oranlarda eklenmiştir. Bu polimerler biyoyumlu, hidrofilik karakterde ve fonksiyonel gruplara sahiptir. Ayrıca, hazırlanan malzemelerin mekanik özelliklerini de geliştirebilecek potansiyele sahiptirler. Tez kapsamında hazırlanan CHI/GLY/PEG, CHI/GLY/PPG ve CHI/GLY/PVA formülasyonları FTIR, TGA-DTA-DSC, sıvı temas açısı, şişme testi, su tutma kapasitesi gaz geçirgenliği ve *in vitro* biyobozunurluk testleri gerçekleştirilerek karakterize edilmiştir. Daha sonra farklı oranlarda PEG, PPG ve

PVA içeren stent formülasyonlarına L-ASNaz immobilize edilerek en uygun örnek belirlenmiştir. Sonuçlarda maksimum aktivite gösteren CHI/GLY/PEG-3, CHI/GLY/PPG-4 ve CHI/GLY/PVA-4 formülasyonları seçilmiştir. Seçilen bu örneklerin protein adsorpsiyonu, porozite, su buharı geçirgenliği, mekanik özellikleri ve *in vitro* sitotoksosite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sonra, her bir formülasyonun immobilizasyon prosedür parametrelerini optimize etmek için enzim miktarı, immobilizasyon süresi, çapraz bağlanma oranı ve çapraz bağlama süresi belirlenmiştir. Bu deneyler sonucunda L-ASNaz her bir formülasyona immobilize edilmiş ve bunu kanıtlamak amacıyla CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örnekleri FTIR, SEM, EDX ve XRD ile karakterize edilerek immobilizasyonun başarılı olduğu görülmüştür.

CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz örneklerinin immobilizasyon işleminden sonraki parametreleri (optimum pH, sıcaklık, tekrar kullanılabilirlik, depolama kararlılığı, termostabilite vb.) belirlenmiş ve serbest formuyla karşılaştırılmıştır. Serbest enzim için optimum pH 8.0 olarak bulunurken, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonları için sırasıyla 7.5, 9.0 ve 8.5 olarak kaydedilmiştir. Benzer şekilde, serbest enzim için optimum sıcaklık 45 °C olarak bulunurken, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonları için sırasıyla 65 °C, 50 °C ve 55 °C olarak kaydedilmiştir. İmmobilizasyondan sonra enzimlerin konformasyonel değişimlerine bağlı olarak optimum pH'da ve sıcaklıkta değişimler olabilir. Optimum pH değerindeki bu değişim, enzimin aktif bölgesini saran mikro çevredeki asidik ve bazik amino asit yan zincir iyonizasyonundaki değişiklikten kaynaklanabilir. Ama enzim içeren stent formülasyonlarının bağlı aktivitesi serbest enziminkinden çok daha yüksektir. İmmobilizasyon sayesinde enzim daha kararlı hale gelir ve çevresel faktörlerden serbest enzime kıyasla daha az etkilenir. Benzer şekilde, enzim içeren stent formülasyonlarının optimum sıcaklık değeri serbest formuna göre kıyasla daha yüksektir ki buda immobilize enzimlerin daha yüksek termal direncine sahip olduğunu göstermiştir. İmmobilize enzimlerin en büyük avantajlarından birisi tekrar tekrar kullanılabilme imkanına sahip olmalarıdır. Serbest enzim reaksiyon ortamından geri alınamazken immobilize enzimler reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilirler. CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonları

20 kez tekrar kullanıldıktan sonra sırasıyla başlangıç aktivitelerinin %60, %70 ve %36'sını korumuşlardır. Enzimler protein yapıda olduklarından dolayı tripsin gibi proteazlara karşı dirençli değildirler. Taşıyıcı malzemeler sayesinde enzimler tripsine karşı kararlılık kazanırlar. Örneğin çalışmamızda serbest L-ASNaz 120 dk tripsine maruz kaldıktan sonra aktivitesini neredeyse tamamen kaybederken CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonları sırasıyla %40, %70 ve %60 oranında başlangıç aktivitelerini korumayı başarmışlardır. Bu sonuç, L-ASNaz içeren stent formülasyonlarının kan dolaşımında kullanılma fikri için çok önemlidir. İnsan kan dolaşım sisteminde de proteazlar vardır ve bunlar L-ASNaz'ın yarı ömrünü kısıtlamaktadır. Hazırlanan bu stent formülasyonları sayesinde L-ASNaz'ın yarı ömrü uzatılmış yani bir nevi katalitik etkinliği arttırılmıştır. Ayrıca, stent formülasyonlarının depolama kararlılığı 4 haftalık süre boyunca 4 ve 25 °C'de araştırılmıştır. Depolama koşulları altında, serbest enzim başlangıç aktivitesinin yaklaşık %60'ını ve %75'ini sırasıyla 4 ve 25 °C'de kaybederken, CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonu ise aynı süre zarfında başlangıç aktivitelerini serbest formuna göre daha fazla korumuşlardır. Bu sonuçlar, enzim içeren stent formülasyonunun depolama kararlılığının hem 4 hem de 25 °C'de serbest enzim ile karşılaştırıldığında daha iyi olduğunu göstermiştir. Serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesine metal iyonlarının ve bazı inhibitörlerin etkisini belirlemek için, enzim örnekleri farklı metal iyonlarının tuzları ve inhibitörlerle inkübe edilmiştir. Deney sonucunda, immobilize enzim formülasyonları metal iyonlarından ve enzim aktivitesini inhibe edici bazı kimyasallara karşı serbest enzim kadar etkilenmemiştir. Tez kapsamında hazırlanan CHI/GLY/PEG-3@L-ASNaz, CHI/GLY/PPG-4@L-ASNaz ve CHI/GLY/PVA-4@L-ASNaz stent formülasyonlarının damar akış koşullarını taklit ettiğimiz biyoreaktör sisteminde zamana karşı kararlılıkları incelenmiştir. Yapılan deney sonucunda her üç stent formülasyonun da başlangıç aktivitelerinin yarısından fazlasını koruduğu görülmüştür.

Yapılan tüm çalışmalar ve elde edilen tüm sonuçlar ışığında, L-ASNaz içeren şekil hafızalı polimerik stent formülasyonlarının biyoyumluluk, biyobozunurluk ve yeterli mekanik karaktere sahip oldukları görülmüştür. Bunun yanı sıra, pH ve termostabilitesi, yeniden kullanılabilirliği, uzun süreli depolama kararlılığı ve *in vitro* akış koşullarında umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] A. Shrivastava, A.A. Khan, M. Khurshid, M.A. Kalam, S.K. Jain, P.K. Singhal, *Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent*, **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 100 (2016) 1-10.
- [2] A. Clementi, *La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physio logique de sa presence dans l'organisme*, **Arch. Physiol. Biochem.**, 19 (1922) 369-398.
- [3] J.D. Broome, *Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects*, **Nature**, 191 (1961) 1114-1115.
- [4] W.C. Dolowy, D. Henson, J. Cornet, H. Sellin, *Toxic and antineoplastic effects of l-asparaginase: Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia*, **Cancer**, 19 (1966) 1813-1819.
- [5] R. Ln, M. Doble, V.P.B. Rekha, K.K. Pulicherla, *In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for effective treatment of acute lymphoblastic leukemia*, **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 33 (2011) 617-621.
- [6] K. Aghaiypour, A. Wlodawer, J. Lubkowski, *Structural basis for the activity and substrate specificity of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase*, **Biochemistry**, 40 (2001) 5655-5664.
- [7] A.L. Swain, M. Jaskolski, D. Housset, J.K. Rao, A. Wlodawer, *Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy.*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 90 (1993) 1474-1478.
- [8] J. Lubkowski, M. Dauter, K. Aghaiypour, A. Wlodawer, Z. Dauter, *Atomic resolution structure of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase*, **Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.**, 59 (2003) 84-92.
- [9] M. Kozak, M. Jaskólski, K.H. Röhm, *Preliminary crystallographic studies of Y25F mutant of periplasmic Escherichia coli L-asparaginase*, **Acta Biochim. Pol.**, 47 (2000) 807-814.
- [10] M. Jaskólski, M. Kozak, J. Lubkowski, G. Palm, A. Wlodawer, *Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: A case of enantiomorphic space groups*, **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.**, 57 (2001) 369-377.
- [11] M. Sanches, J.A.R.G. Barbosa, R.T. De Oliveira, J.A. Neto, I. Polikarpov, *Structural comparison of Escherichia coli L-asparaginase in two monoclinic space groups*, **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.**, 59 (2003) 416-22.
- [12] B.L. Asselin, S. Kreissman, D.J. Coppola, S.D. Bernai, P.R. Leavitt, R.D. Gelber, S.E. Sallan, H.J. Cohen, *Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia*, **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, 21 (1999) 6-12.

- [13] O.B. Eden, M.P. Shaw, J.S. Lilleyman, S. Richards, *Non-randomised study comparing toxicity of escherichia coli and erwinia asparaginase in children with leukaemia*, **Med. Pediatr. Oncol.**, 18 (1990) 497-502.
- [14] U.K. Narta, S.S. Kanwar, W. Azmi, *Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia*, **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, 61 (2007) 208–221.
- [15] J. Janin, F. Rodier, P. Chakrabarti, R.P. Bahadur, *Macromolecular recognition in the Protein Data Bank*, **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.**, 63 (2006) 1-8.
- [16] M.K. Yun, A. Nourse, S.W. White, C.O. Rock, R.J. Heath, *Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic escherichia coli l-asparaginase I*, **J. Mol. Biol.**, 369 (2007) 794-811.
- [17] N. Verma, K. Kumar, G. Kaur, S. Anand, *L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent*, **Crit. Rev. Biotechnol.**, 27 (2007) 45-62.
- [18] H. Van Den Berg, *Asparaginase revisited*, **Leuk. Lymphoma.**, 52 (2011) 168-178.
- [19] T. Batool, E.A. Makky, M. Jalal, M.M. Yusoff, *A comprehensive review on l-asparaginase and its applications*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 178 (2016) 900-923.
- [20] J.J.M. Cachumba, F.A.F. Antunes, G.F.D. Peres, L.P. Brumano, J.C. Dos Santos, S.S. Da Silva, *Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production*, **Brazilian J. Microbiol.**, 47 (2016) 77–85.
- [21] F. Izadpanah Qeshmi, S. Javadpour, K. Malekzadeh, S. Tamadoni Jahromi, M. Rahimzadeh, *Persian Gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: Isolation & molecular differentiating*, **Int. J. Environ. Res.**, 8 (2014) 813-818.
- [22] Savitri, N. Asthana, W. Azmi, *Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme*, **Indian J. Biotechnol.**, 2 (2003) 184–194.
- [23] D. Borek, M. Jaskólski, *Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity*, **Acta Biochim. Pol.**, 48 (2001) 893-902.
- [24] K.J.P. Narayana, K.G. Kumar, M. Vijayalakshmi, *L-asparaginase production by Streptomyces albidoflavus*, **Indian J. Microbiol.**, 48 (2008) 331–336.
- [25] P.E. Joner, *Purification and properties of l-asparaginase B from Acinetobacter calcoaceticus*, **BBA - Enzymol.**, 438 (1976) 287-295.
- [26] M. Hymavathi, T. Sathish, C.S. Rao, R.S. Prakasham, *Enhancement of l-asparaginase production by isolated bacillus circulans (MTCC 8574) using response surface methodology*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 159 (2009) 191-198.
- [27] R.S. Prakasham, M. Hymavathi, C. Subba Rao, S.K. Arepalli, J. Venkateswara Rao, P.K. Kennady, K. Nasaruddin, J.B. Vijayakumar, P.N. Sarma, *Evaluation of*

*antineoplastic activity of extracellular asparaginase produced by isolated bacillus circulans*, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 160 (2010) 72-80.

[28] J.C. Wriston, T.O. Yellin, *L-asparaginase: A review*, **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, 39 (2006) 185-248.

[29] U. Narta, S. Roy, S.S. Kanwar, W. Azmi, *Improved production of l-asparaginase by Bacillus brevis cultivated in the presence of oxygen-vectors*, **Bioresour. Technol.**, 102 (2011) 2083-2085.

[30] B.R. Mohapatra, R.K. Sani, U.C. Banerjee, *Characterization of L-asparaginase from Bacillus sp. isolated from an intertidal marine alga (Sargassum sp.)*, **Lett. Appl. Microbiol.**, 21 (1995) 380-383.

[31] S. Bascomb, G.T. Banks, M.T. Skarstedt, A. Fleming, K.A. Bettelheim, T.A. Connors, *The Properties and Large-scale Production of L-Asparaginase from Citrobacter*, **J. Gen. Microbiol.**, 91 (1975) 1-16.

[32] E.S. Tiul'panova, V. V Eremenko, *Amino acid regulation of L-asparaginase formation in Bacillus mesentericus*, **Mikrobiologiya**, 45 (1976) 259-65.

[33] J. Netrval, *Stimulation of L-asparaginase production in Escherichia coli by organic and amino acids*, **Folia Microbiol. (Praha)**. 22 (1977) 106-116.

[34] M. V Nefelova, S.G. Ignatov, A.G. Chigalenchik, B.D. Vinogradov, N.S. Egorov, *Biosynthesis of L-asparaginase-2 by cultures of Bacillus polymyxa var. Ross*, **Prikl Biokhim Mikrobiol.** 14 (1978) 510-514.

[35] J. Mukherjee, S. Majumdar, T. Scheper, *Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L- asparaginase by Enterobacter aerogenes*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53 (2000) 180-184.

[36] S.H. Fisher, L. V. Wray, *Bacillus subtilis 168 contains two differentially regulated genes encoding L-asparaginase*, **J. Bacteriol.** 184 (2002) 2148-2154.

[37] M.S. Nawaz, D. Zhang, A.A. Khan, C.E. Cerniglia, *Isolation and characterization of Enterobacter cloacae capable of metabolizing asparagine*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50 (1998) 568-572.

[38] K.J. Golden, R.W. Bernlohr, *Nitrogen catabolite repression of the L-asparaginase of Baccillus licheniformis*, **J. Bacteriol.** 164 (1985) 938-940.

[39] A.P. Sudhir, B.R. Dave, A.S. Prajapati, K. Panchal, D. Patel, R.B. Subramanian, *characterization of a recombinant glutaminase-free l-asparaginase (ansa3) enzyme with high catalytic activity from bacillus licheniformis*, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 174 (2014) 2504-2515.

[40] N.K. Maladkar, V.K. Singh, S.R. Naik, *Fermentative production and isolation of L-asparaginase from Erwinia carotovora, EC-113.*, **Hindustan Antibiot. Bull.** 35 (1992) 77-86.

- [41] J.M. Mesas, J.A. Gil, J.F. Martin, *Characterization and Partial Purification of L-Asparaginase from Corynebacterium Glutamicum*, **J. Gen. Microbiol.** 136 (1990) 515-519.
- [42] Z.B. Moola, M.D. Scawen, T. Atkinson, D.J. Nicholls, *Erwinia chrysanthemi L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes*, **Biochem. J.** 302 (1994) 921-927.
- [43] R.M. Stark, M.S. Suleiman, I.J. Hassan, J. Greenman, M.R. Millar, *Amino acid utilisation and deamination of glutamine and asparagine by Helicobacter pylori*, **J. Med. Microbiol.** 46 (1997) 793-800.
- [44] I. Pastuszak, M. Szymona, *Purification and properties of L asparaginase from Mycobacterium phlei*, **Acta Biochim. Pol.** 23 (1976) 37-44.
- [45] J. Mikucki, J. Szarapińska-Kwaszewska, Z. Krzemiński, *Factors influencing L-asparaginase production by staphylococci.*, **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.** 132 (1977) 135-42.
- [46] G.A. Kotzia, N.E. Labrou, *Engineering thermal stability of l-asparaginase by in vitro directed evolution*, **FEBS J.** 276 (2009) 1750-1761.
- [47] M. Rózalska, J. Mikucki, *Staphylococcal L-asparaginase: catabolic repression of synthesis.*, **Acta Microbiol. Pol.** 41 (1992) 145-150.
- [48] N. Zhang, F. Clarke, G. Di Trapani, D. Keough, I. Beacham, *Guinea pig serum l-asparaginase: Purification, and immunological relationship to liver l-asparaginase and serum l-asparaginases in other mammals*, **Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.** 112 (1995) 607-612.
- [49] Ai. Nilolaev, N.N. Sokolov, E.A. Kozlov, M.E. Kutsman, *Isolation and properties of a homogeneous L-asparaginase preparation from Pseudomonas fluorescens AG*, **Biokhimiia.** 40 (1975) 984-989.
- [50] S. Manna, A. Sinha, R. Sadhukhan, S.L. Chakrabarty, *Purification, characterization and antitumor activity of l-asparaginase isolated from Pseudomonas stutzeri MB-405*, **Curr. Microbiol.** 30 (1995) 291-298.
- [51] M. Yao, Y. Yasutake, H. Morita, I. Tanaka, *Structure of the type I L-asparaginase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus horikoshii at 2.16 Å resolution*, **Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.** 61 (2005) 294-301.
- [52] A.A. Pritsa, D.A. Kyriakidis, *L-asparaginase of Thermus thermophilus: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity*, **Mol. Cell. Biochem.** 216 (2001) 93-101.
- [53] M.P. Curran, R.M. Daniel, G.R. Guy, H.W. Morgan, *A specific l-asparaginase from Thermus aquaticus*, **Arch. Biochem. Biophys.** 241 (1985) 571-576.
- [54] J.A. Distasio, R.A. Niederman, D. Kafkewitz, D. Goodman, *Purification and characterization of L asparaginase with anti lymphoma activity from Vibrio succinogenes*, **J. Biol. Chem.** 251 (1976) 6929-6933.

- [55] L. Davidson, M. Burkom, S. Ahn, L.C. Chang, B. Kitto, *L-Asparaginases from *Citrobacter freundii**, **BBA - Enzymol.** 480 (1977) 282-294.
- [56] T. Tosa, R. Sano, K. Yamamoto, M. Nakamura, I. Chibata, *L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. Purification, Crystallization, and Enzymic Properties*, **Biochemistry.** 11 (1972) 217-22.
- [57] A. Shrivastava, A.A. Khan, A. Shrivastav, S.K. Jain, P.K. Singhal, *Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum**, **Prep. Biochem. Biotechnol.** 42 (2012) 574-581.
- [58] A. Nagarajan, N. Thirunavuk, T.S. Suryanaray, S. N. Gummadi, *Screening and isolation of novel glutaminase free l-asparaginase from fungal endophytes*, **Res. J. Microbiol.** 9 (2014) 163-176.
- [59] A. Mishra, *Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation*, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 135 (2006) 33-42.
- [60] H. V. Hendriksen, B.A. Kornbrust, P.R. Ostergaard, M.A. Stringer, *Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae**, **J. Agric. Food Chem.** 57 (2009) 4168-4176.
- [61] M.I. de M. Sarquis, E.M.M. Oliveira, A.S. Santos, G.L. da Costa, *Production of L-asparaginase by filamentous fungi.*, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 99 (2004) 489-92.
- [62] G. Baskar, S. Renganathan, *Production of L-Asparaginase from Natural Substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Effect of Substrate, Supplementary Nitrogen Source and L-Asparagine*, **Int. J. Chem. React. Eng.** 7 (2009).
- [63] S.K. Raha, S.K. Dey, S.K. Roy, S. Chaudhuri, S.L. Chakrabarty, *Antitumor activity of L-asparaginase from *Cylindrocarpum obtusisporum* MB-10 and its effect on the immune system*, **Biochem Int.**, 21 (1990) 1001-1011.
- [64] B.R. Mohapatra, M. Bapuji, U.C. Banerjee, *Production and properties of L-asparaginase from *Mucor* species associated with a marine sponge (*Spirastrella* sp.)*, **Cytobios.** 92 (1997) 165-173.
- [65] K. Nakahama, A. Imada, S. Igarasi, K. Tubaki, *Formation of L-Asparaginase by *Fusarium* Species*, **J. Gen. Microbiol.** 75 (1973) 269-273.
- [66] S. unathan Nagarethinam, *Microbial L-Asparaginase and its future prospects*, **Asian J. Med. Res.** 1 (2012) 159-160.
- [67] J.O. Kil, G.N. Kim, I. Park, *Extraction of extracellular l-asparaginase from *Candida utilis**, **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 59 (1995) 749-750.
- [68] A. Daverey, K. Pakshirajan, *Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by *Candida bombicola* using a low-cost fermentative medium*, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 160 (2010) 2090-2101.

- [69] M.S. Foda, H.H. Zedan, S.A. Hashem, *Formation and properties of L-glutaminase and L-asparaginase activities in Pichia polymorpha*, **Acta Microbiol Pol.** 29 (1980) 343-352.
- [70] M.S.M.S. Ramakrishnan, R. Joseph, *Characterization of an extracellular asparaginase of Rhodosporidium toruloides CBS14 exhibiting unique physicochemical properties*, **Can. J. Microbiol.** 42 (1996) 316-325.
- [71] P.C. Dunlop, R.J. Roon, *L Asparaginase of Saccharomyces cerevisiae: an extracellular enzyme*, **J. Bacteriol.** 122 (1975) 1017–1024.
- [72] K. Dhevendaran, K. Annie, *Antibiotic and L-asparaginase activity of streptomycetes isolated from fish, shellfish and sediment of Veli estuarine lake along Kerala coast*, **Indian J. Mar. Sci.** 28 (1999) 335-337.
- [73] M.K. Sahu, K. Sivakumar, E. Poorani, T. Thangaradjou, L. Kannan, *Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes*, **J. Environ. Biol.** 28 (2007) 465-474.
- [74] N. Gupta, S. Mishra, U. Basak, *Diversity of Streptomyces in mangrove ecosystem of Bhitarkanika*, **Iran. J. Microbiol.** 1 (2009) 37-42.
- [75] S.A. Mostafa, M.S. Salama, *L-asparaginase-producing Streptomyces from the soil of Kuwait.*, **Zentralbl. Bakteriolog. Naturwiss.** 134 (1979) 325-34.
- [76] P.J. DeJong, *L-Asparaginase production by Streptomyces griseus.*, **Appl. Microbiol.** 23 (1972) 1163-1164.
- [77] G.S. Amena, *Production, purification and characterization of l-asparaginase from streptomyces*, **Brazilian J. Microbiol.** 41 (2010) 173–178.
- [78] S.A. Mostafa, *Activity of L-asparaginase in cells of Streptomyces karnatakensis.*, **Zentralbl. Bakteriolog. Naturwiss.** 134 (1979) 343-351.
- [79] Y.R. Abdel-Fattah, Z.A. Olama, *L-asparaginase production by Pseudomonas aeruginosa in solid-state culture: Evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs*, **Process Biochem.** 38 (2002) 115-122.
- [80] A. Kavitha, M. Vijayalakshmi, *Optimization and Purification of L-Asparaginase Produced by Streptomyces tendae TK-VL\_333*, **Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.** 65 (2010) 528-531.
- [81] S.A. Mostafa, *Production of L-Asparaginase By Streptomyces Karnatakensis and Streptomyces Venezuelae*, **Zentralbl Bakteriolog Naturwiss.** 134 (1979) 429-436.
- [82] S.A. Mostafa, O.A. Ali, *L-Asparaginase activity in cell-free extracts*, **Zentralblatt Mikrobiol.** 138 (1983) 397-404.
- [83] A. Kavitha, M. Vijayalakshmi, *A study on L-Asparaginase of Nocardia levis MK-VL113*, **Sci. World J.** 2012 (2012) 1604-1634.
- [84] B. Szymanska, U. Wilczynska-Kalak, M.H. Kang, N.L.M. Liem, H. Carol, I. Boehm, D. Groepper, C.P. Reynolds, C.F. Stewart, R.B. Lock, *Pharmacokinetic*

*modeling of an induction regimen for in vivo combined testing of novel drugs against pediatric acute lymphoblastic leukemia xenografts*, **PLoS One**. 7 (2012) 33894.

[85] W.L. Salzer, B.L. Asselin, P. V. Plourde, T. Corn, S.P. Hunger, *Development of asparaginase Erwinia chrysanthemi for the treatment of acute lymphoblastic leukemia*, **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1329 (2014) 81-92.

[86] G. Shakambari, B. Ashokkumar, P. Varalakshmi, *L-asparaginase – a promising biocatalyst for industrial and clinical applications*, **Biocatal. Agric. Biotechnol.** 17 (2019) 213–224.

[87] N.E.-A. El-Nagga, S.M. El-Ewasy, N.M. El-Shweihy, *Microbial l-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons*, **Int. J. Pharmacol.** 10 (2014) 182–199.

[88] M. Duval, S. Suciu, A. Ferster, X. Rialland, B. Nelken, P. Lutz, Y. Benoit, A. Robert, A.M. Manel, E. Vilmer, J. Otten, N. Philippe, *Comparison of escherichia coli-asparaginase with erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized european organisation for research and treatment of cancer - children's leukemia group phase 3 trial*, **Blood**, 99 (2002) 2734-2790.

[89] C. Pochedly, *Neurotoxicity due to cns therapy for leukemia*, **Med. Pediatr. Oncol.** 3 (1977) 101-115.

[90] J.B. Howard, F.H. Carpenter, *L-asparaginase from erwinia carotovora. substrate specificity and enzymatic properties.*, **J. Biol. Chem.** 247 (1972) 1020-1030.

[91] V.I. Avramis, P.N. Tiwari, *Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia*, **Int. J. Nanomedicine.** 1 (2006) 241–254.

[92] R. Pieters, S.P. Hunger, J. Boos, C. Rizzari, L. Silverman, A. Baruchel, N. Goekbuget, M. Schrappe, C.H. Pui, *L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia*, **Cancer**. 117 (2011) 238–249.

[93] L.M. Holle, *Pegaspargase: an alternative?*, **Ann. Pharmacother.** 31 (1997) 616-624.

[94] U. Nowak-Göttl, E. Ahlke, G. Fleischhack, D. Schwabe, R. Schobess, C. Schumann, R. Junker, *Thromboembolic events in children with acute lymphoblastic leukemia (BFM protocols): Prednisone versus dexamethasone administration*, **Blood**, 101 (2003) 2529-2533.

[95] D. Hernández-Espinosa, A. Miñano, C. Martínez, E. Pérez-Ceballos, I. Heras, J.L. Fuster, V. Vicente, J. Corral, *L-asparaginase-induced antithrombin type I deficiency: Implications for conformational diseases*, **Am. J. Pathol.** 169 (2006) 142-153.

[96] U. Nowak-Göttl, A. Heinecke, R. Von Kries, W. Nürnberger, N. Münchow, R. Junker, *Thrombotic events revisited in children with acute lymphoblastic leukemia -*

*impact of concomitant escherichia coli asparaginase/prednisone administration*, **Thromb. Res.** 103 (2001) 165-172.

[97] U.H. Athale, A.K.C. Chan, *Thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia: part I. epidemiology of thrombosis in children with acute lymphoblastic leukemia*, **Thromb. Res.** 111 (2003) 125-131.

[98] M. Bodmer, M. Sulz, S. Stadlmann, A. Droll, L. Terracciano, S. Krähenbühl, *Fatal liver failure in an adult patient with acute lymphoblastic leukemia following treatment with L-asparaginase*, **Digestion.** 74 (2006) 28-32.

[99] B. Fromenty, D. Pessayre, *Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity*, **Pharmacol. Ther.** 67 (1995) 101-154.

[100] B.F. and D. Pessayre, *Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines*, **J. Hepatol.** 2 (1997) 43-53.

[101] B. Piatkowska-Jakubas, M. Krawczyk-Kuliś, S. Giebel, M. Adamczyk-Cioch, A. Czyz, E.L. Marañda, M. Paluszewska, G. Pałynyczko, J. Piszcz, J. Hołowiecki, *Use of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: Recommendations of the Polish adult leukemia group*, **Pol. Arch. Med. Wewn.** 118 (2008) 664-69.

[102] R.A. Raja, K. Schmiegelow, T.L. Frandsen, *Asparaginase-associated pancreatitis in children*, **Br. J. Haematol.** 159 (2012) 18-27.

[103] <http://www.iris-biotech.de/news/pom-phthalimidooxy-peg-based-cross-linkers/>.

[104] C.H. Fu, K.M. Sakamoto, *PEG-asparaginase*, **Expert Opin. Pharmacother.** 8 (2007) 1977-1984.

[105] H. Wada, I. Imamura, M. Sako, S. Katagiri, S. Tarui, H. Nishimura, Y. Inada, *Antitumor enzyme: polyethylene glycol-modified asparaginase*, **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 613 (1990) 95-108.

[106] L.J. Hak, M. V. Relling, C. Cheng, D. Pei, B. Wang, J.T. Sandlund, J. Rubnitz, C.H. Pui, *Asparaginase pharmacodynamics differ by formulation among children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia*, **Leukemia.** 18 (2004) 1071-1077.

[107] A. Zeidan, E.S. Wang, M. Wetzler, *Pegasparaginase: where do we stand?*, **Expert Opin. Biol. Ther.** 9 (2009) 111-119.

[108] D.M. Liu, J. Chen, Y.P. Shi, *Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization*, **TrAC - Trends Anal. Chem.** 102 (2018) , 332-342.

[109] H. Nguyen, M. Kim, *An overview of techniques in enzyme immobilization*, **Appl. Sci. Converg. Technol.** 26 (2017) 157-163.

[110] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Understanding enzyme immobilisation*, **Chem. Soc. Rev.** 38 (2009) 453-468.

- [111] R.A. Sheldon, *Enzyme immobilization: the quest for optimum performance*, **Adv. Synth. Catal.** 349 (2007) 1289-1307.
- [112] K.D. Caldwell, R. Axén, M. Bergwall, I. Olsson, J. Porath, *Immobilization of enzymes based on hydrophobic interaction. III. Adsorbent substituent density and its impact on the immobilization of  $\beta$ -amylase*, **Biotechnol. Bioeng.** 18 (1976) 1605-1614.
- [113] M. Hartmann, X. Kostrov, *Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges*, **Chem. Soc. Rev.** 42 (2013) 6277-6289.
- [114] E. Magner, *Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials*, **Chem. Soc. Rev.** 42 (2013) 6213-6222.
- [115] D.N. Tran, K.J. Balkus, *Perspective of recent progress in immobilization of enzymes*, **ACS Catal.** 1 (2011) 956–968.
- [116] V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, *Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes*, **Adv. Food Nutr. Res.**, 79 (2016) 179-211.
- [117] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization*, **Chem. Soc. Rev.** 42 (2013) 6290-307.
- [118] C.S. Bezerra, C.M.G. De Farias Lemos, M. De Sousa, L.R.B. Gonçalves, *Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: past, present, and future trends*, **J. Appl. Polym. Sci.** 132 (2015) 42125.
- [119] C.G.C.M. Netto, H.E. Toma, L.H. Andrade, *Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes*, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 85-86 (2013) 71-92.
- [120] M.R. Mehrasbi, J. Mohammadi, M. Peyda, M. Mohammadi, *Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil*, **Renew. Energy.** 101 (2017) 593-602.
- [121] S. Aber, E. Mahmoudikia, A. Karimi, F. Mahdizadeh, *Immobilization of glucose oxidase on  $Fe_3O_4$  magnetic nanoparticles and its application in the removal of acid yellow 12*, **Water. Air. Soil Pollut.** 227 (2016) 93.
- [122] K. Atacan, B. Çakiroğlu, M. Özacar, *Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified  $Fe_3O_4$  magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk*, **Food Chem.** 212 (2016) 460-468.
- [123] F. Schüth, *Endo- and exotemplating to create high-surface-area inorganic materials*, **Angew. Chemie - Int. Ed.** 42 (2003) 3604-3622.
- [124] K. Matuszek, A. Chrobok, P. Latos, M. Markiton, K. Szymańska, A. Jarzębski, M. Swadźba-Kwaśny, *Silica-supported chlorometallate ionic liquids as recyclable catalysts for Diels–Alder reaction under solventless conditions*, **Catal. Sci. Technol.** 6 (2016) 8129-8137.

- [125] J. Fan, J. Lei, L. Wang, C. Yu, B. Tu, D. Zhao, *Rapid and high-capacity immobilization of enzymes based on mesoporous silicas with controlled morphologies.*, **Chem. Commun.** 7 (2003) 2140-2141.
- [126] H.H.P. Yiu, P.A. Wright, N.P. Botting, *Enzyme immobilisation using siliceous mesoporous molecular sieves*, **Microporous Mesoporous Mater.** 44-45 (2001) 763-768.
- [127] J. Zdarta, A. Meyer, T. Jesionowski, M. Pinelo, *A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility*, **Catalysts.** 8 (2018) 92.
- [128] *Study on alkaline protease immobilized on mesoporous materials*, 26 (2014) 1139–1144.
- [129] Y. Wang, F. Caruso, *Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation*, **Chem. Mater.** 17 (2005) 953–961.
- [130] M. Kotal, S.K. Srivastava, T.K. Maiti, *Fabrication of gold nanoparticle assembled polyurethane microsphere template in trypsin immobilization*, **J. Nanosci. Nanotechnol.** 11 (2011) 10149-57.
- [131] P. Bolibok, M. Wiśniewski, K. Roszek, A.P. Terzyk, *Controlling enzymatic activity by immobilization on graphene oxide*, **Sci. Nat.** 104 (2017) 36.
- [132] J. Hou, G. Dong, B. Xiao, C. Malassigne, V. Chen, *Preparation of titania based biocatalytic nanoparticles and membranes for CO<sub>2</sub> conversion*, **J. Mater. Chem. A.** 3 (2015) 3332-3342.
- [133] M. Garmroodi, M. Mohammadi, A. Ramazani, M. Ashjari, J. Mohammadi, B. Sabour, M. Yousefi, *Covalent binding of hyper-activated rhizomucor miehei lipase (rml) on hetero-functionalized siliceous supports*, **Int. J. Biol. Macromol.** 86 (2016) 208-215.
- [134] M. Ebrahimi, L. Placido, L. Engel, K.S. Ashaghi, P. Czermak, *A novel ceramic membrane reactor system for the continuous enzymatic synthesis of oligosaccharides*, **Desalination.** 250 (2010) 1105-1108.
- [135] W. Wang, Z. Li, W. Liu, J. Wu, *Horseradish peroxidase immobilized on the silane-modified ceramics for the catalytic oxidation of simulated oily water*, **Sep. Purif. Technol.** 89 (2012) 206-211.
- [136] Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu, S. Dong, *The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix*, **Biosens. Bioelectron.** 21 (2005) 984-988.
- [137] M. Mohiuddin, D. Arbain, A.K.M.S. Islam, M.S. Ahmad, M.N. Ahmad, *Alpha-glucosidase enzyme biosensor for the electrochemical measurement of antidiabetic potential of medicinal plants*, **Nanoscale Res. Lett.** 11 (2016) 95.
- [138] M. Besharati Vineh, A.A. Saboury, A.A. Poostchi, A.M. Rashidi, K. Parivar, *Stability and activity improvement of horseradish peroxidase by covalent*

*immobilization on functionalized reduced graphene oxide and biodegradation of high phenol concentration*, **Int. J. Biol. Macromol.** 106 (2018) 1314-1322.

[139] S.R. Dedania, M.J. Patel, D.M. Patel, R.C. Akhiani, D.H. Patel, *Immobilization on graphene oxide improves the thermal stability and bioconversion efficiency of D-psicose 3-epimerase for rare sugar production*, **Enzyme Microb. Technol.** 107 (2017) 49-56.

[140] M.F. Canbolat, H.B. Savas, F. Gultekin, *Improved catalytic activity by catalase immobilization using  $\gamma$ -cyclodextrin and electrospun PCL nanofibers*, **J. Appl. Polym. Sci.** 134 (2017) 44404.

[141] D. Weiser, P.L. Sóti, G. Bánóczy, V. Bódai, B. Kiss, Á. Gellért, Z.K. Nagy, B. Koczka, A. Szilágyi, G. Marosi, L. Poppe, *Bioimprinted lipases in PVA nanofibers as efficient immobilized biocatalysts*, **Tetrahedron.** 72 (2016) 7335-7342.

[142] P.L. Sóti, D. Weiser, T. Vigh, Z.K. Nagy, L. Poppe, G. Marosi, *Electrospun polylactic acid and polyvinyl alcohol fibers as efficient and stable nanomaterials for immobilization of lipases*, **Bioprocess Biosyst. Eng.** 39 (2016) 449-459.

[143] M. Kumar, R. Rahikainen, D. Unruh, V.P. Hytönen, C. Delbrück, R. Sindelar, F. Renz, *Mixture of PLA-PEG and biotinylated albumin enables immobilization of avidins on electrospun fibers*, **J. Biomed. Mater. Res. - Part A.** 105 (2017) 356-362.

[144] K.C. Badgular, B.M. Bhanage, *Solvent stability study with thermodynamic analysis and superior biocatalytic activity of Burkholderia cepacia lipase immobilized on biocompatible hybrid matrix of poly(vinyl alcohol) and hypromellose*, **J. Phys. Chem. B.** 118 (2014) 14808-14819.

[145] M. Matto, Q. Husain, *Calcium alginate-starch hybrid support for both surface immobilization and entrapment of bitter melon (*Momordica charantia*) peroxidase*, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 57 (2009) 164-170.

[146] R. Abdulla, P. Ravindra, *Immobilized Burkholderia cepacia lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. oil*, **Biomass and Bioenergy.** 8 (2013) 8-13.

[147] N. Nupur, Ashish, D. Mira Das, *Preparation and biochemical property of penicillin G amidase-loaded alginate and alginate/chitosan hydrogel beads*, **Recent Pat. Biotechnol.** 10 (2016) 121-132.

[148] H. Zhao, Q. Cui, V. Shah, J. Xu, T. Wang, *Enhancement of glucose isomerase activity by immobilizing on silica/chitosan hybrid microspheres*, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 126 (2016) 18-23.

[149] R.A. Miranda, J. Llorca, F. Medina, J.E. Sueiras, A.M. Segarra, *Asymmetric epoxidation of chalcone catalyzed by reusable poly-L-leucine immobilized on hydrotalcite*, **J. Catal.** 282 (2011) 65-73.

[150] M.Y. Chang, H.C. Kao, R.S. Juang, *Thermal inactivation and reactivity of  $\beta$ -glucosidase immobilized on chitosan-clay composite*, **Int. J. Biol. Macromol.** 43 (2008) 48-53.

- [151] E. Han, X. Li, J.R. Cai, H.Y. Cui, X.A. Zhang, *Development of highly sensitive amperometric biosensor for glucose using carbon nanosphere/sodium alginate composite matrix for enzyme immobilization*, **Anal. Sci.** 30 (2014) 897-902.
- [152] S.H. Lee, T.T.N. Doan, K. Won, S.H. Ha, Y.M. Koo, *Immobilization of lipase within carbon nanotube-silica composites for non-aqueous reaction systems*, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 62 (2010) 169-172.
- [153] Y.T. Zhu, X.Y. Ren, Y.M. Liu, Y. Wei, L. Sen Qing, X. Liao, *Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: Characterization and application for enzymatic inhibition assays*, **Mater. Sci. Eng. C.** 12 (2014) 3170-3181.
- [154] Z. Lei, X. Liu, L. Ma, D. Liu, H. Zhang, Z. Wang, *Spheres-on-sphere silica microspheres as matrix for horseradish peroxidase immobilization and detection of hydrogen peroxide*, **RSC Adv.** 5 (2015) 38665-38672.
- [155] F. Li, Y. Feng, Z. Wang, L. Yang, L. Zhuo, B. Tang, *Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on the layered calcium carbonate-gold nanoparticles inorganic hybrid composite*, **Biosens. Bioelectron.** 25 (2010) 2244-2248.
- [156] A. Ulu, S. Koytepe, B. Ates, *Design of starch functionalized biodegradable P(MAA-co-MMA) as carrier matrix for L-asparaginase immobilization*, **Carbohydr. Polym.** 153 (2016) 559-572.
- [157] A. Ulu, S. Koytepe, B. Ates, *Synthesis and characterization of biodegradable pHEMA-starch composites for immobilization of L-asparaginase*, **Polym. Bull.** 73 (2016) 1891-1907.
- [158] A. Ulu, S. Koytepe, B. Ates, *Synthesis and characterization of PMMA composites activated with starch for immobilization of L-asparaginase*, **J. Appl. Polym. Sci.** 133 (2016).
- [159] E. Bahreini, K. Aghaiypour, R. Abbasalipourkabir, A.R. Mokarram, *Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study*, **Nanoscale Research Letters.** 9 (2014) 1-13.
- [160] M. Monajati, S. Borandeh, A. Hesami, D. Mansouri, A.M. Tamaddon, *Immobilization of L-asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: Enzyme kinetics and stability studies*, **Chem. Eng. J.** 354 (2018) 1153-1163.
- [161] F. Bahraman, I. Alemzadeh, *Optimization of l-asparaginase immobilization onto calcium alginate beads*, **Chem. Eng. Commun.** 204 (2017) 216-220.
- [162] S. Agrawal, I. Sharma, B.P. Prajapati, R.K. Suryawanshi, N. Kango, *Catalytic characteristics and application of L-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets*, **Int. J. Biol. Macromol.** 114 (2018) 505-511.

- [163] J. Varshosaz, N. Anvari, *Enhanced stability of L-asparaginase by its bioconjugation to poly(styrene-co-maleic acid) and Ecoflex nanoparticles*, **IET Nanobiotechnology**. 12 (2018) 466-472.
- [164] M. Uygun, B. Jurado-Sánchez, D.A. Uygun, V.V. Singh, L. Zhang, J. Wang, *Ultrasound-propelled nanowire motors enhance asparaginase enzymatic activity against cancer cells*, **Nanoscale**. 9 (2017) 18423-18429.
- [165] Hande Orhan. *Kanser tedavisinde kullanılan L-asparajinazın manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu*, M. Sc. Thesis, Adnan Menderes University Turkey, 2018.
- [166] T. Hanawa, *Materials for metallic stents*, **J. Artif. Organs**. 12 (2009) 73-79.
- [167] D. Puppi, F. Chiellini, A.M. Piras, E. Chiellini, *Polymeric materials for bone and cartilage repair*, **Prog. Polym. Sci.** 356 (2010) 403-440.
- [168] M.N. Helmus, D.F. Gibbons, D. Cebon, *Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices*, **Toxicol. Pathol.** 36 (2008) 70-80.
- [169] D.F. Williams, *Biodegradation of surgical polymers*, **J. Mater. Sci.** 17 (1982) 1233-1246.
- [170] L. Da Hou, Z. Li, Y. Pan, M.I. Sabir, Y.F. Zheng, L. Li, *A review on biodegradable materials for cardiovascular stent application*, **Front. Mater. Sci.** 10 (2016) 238-259.
- [171] J.C. Middleton, A.J. Tipton, *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*, **Biomaterials**. 21 (2000) 2335-2346.
- [172] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, *Scaffold design for tissue engineering*, **Macromol. Biosci.** 32 (2002) 477-486.
- [173] T. Freier, *Biopolyesters in tissue engineering applications*, **Adv. Polym. Sci.** 23 (2006) 1-61.
- [174] M. Sokolsky-Papkov, R. Langer, A.J. Domb, *Synthesis of aliphatic polyesters by polycondensation using inorganic acid as catalyst*, **Polym. Adv. Technol.** 22 (2011) 502-511.
- [175] S. Qiao, R. Gao, R. Shi, *Initial experimental study on a novel polymeric local heparin delivery stent*, **Chinese J. Cardiol.** (1998).
- [176] Y.S. Takashi Susawa K.S, Kaneto Shiraki, *Biodegradable intracoronary stents in adult dogs*, **J. Am. Coll. Cardiol.** 21 (1993) 483.
- [177] T. Tsuji, H. Tamai, K. Igaki, E. Kyo, K. Kosuga, T. Hata, M. Okada, T. Nakamura, S. Fujita, S. Takeda, S. Motohara, H. Uehata, *Biodegradable stents as a platform to drug loading*, **Int. J. Cardiovasc. Intervent.** 5 (2003) 13-16.
- [178] J.F. Tanguay, J.P. Zidar, H.R. Phillips 3rd, R.S. Stack, *Current status of biodegradable stents*, **Cardiol Clin.** 12 (1994) 699-713.

- [179] E.R. Ye YW, Landau C, Meidell RS, Willard JE, Moskowitz A, Aziz S, Carlisle E, Nelson K, *Improved bioresorbable microporous intravascular stents for gene therapy*, **ASAIO J.** 42 (1996) 823-827.
- [180] J. Heller, J. Barr, S.Y. Ng, H.R. Shen, K. Schwach-Abdellaoui, S. Emmahl, A. Rothen-Weinhold, R. Gurny, *Poly(ortho esters) - Their development and some recent applications*, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 50 (2000) 121-128.
- [181] H. Tamai, K. Igaki, E. Kyo, K. Kosuga, A. Kawashima, S. Matsui, H. Komori, T. Tsuji, S. Motohara, H. Uehata, *Initial and 6-month results of biodegradable poly-l-lactic acid coronary stents in humans*, **Circulation**, 102 (2000) 399-404.
- [182] K. Ceonzo, A. Gaynor, L. Shaffer, K. Kojima, C.A. Vacanti, G.L. Stahl, *Polyglycolic acid-induced inflammation: role of hydrolysis and resulting complement activation*, **Tissue Eng.** 12 (2006) 301-308.
- [183] D.A. Brown, E.W. Lee, C.T. Loh, S.T. Kee, *A new wave in treatment of vascular occlusive disease: biodegradable stents-clinical experience and scientific principles*, **J. Vasc. Interv. Radiol.** 20 (2009) 315-324.
- [184] O. Martin, L. Avérous, *Poly(lactic acid): Plasticization and properties of biodegradable multiphase systems*, **Polymer (Guildf).** 42 (2001) 6209-6219.
- [185] B. Gupta, N. Revagade, J. Hilborn, *Poly(lactic acid) fiber: An overview*, **Prog. Polym. Sci.** 32 (2007) 455-482.
- [186] M.I. Sabir, X. Xu, L. Li, *A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications*, **J. Mater. Sci.** 44 (2009) 5713-5724.
- [187] I. Vroman, L. Tighzert, *Biodegradable polymers*, **Materials (Basel).** 2 (2009) 307-344.
- [188] S. Farah, D.G. Anderson, R. Langer, *Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review*, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 107 (2016) 367-392.
- [189] A. Konta, M. García-Piña, D. Serrano, *Personalised 3d printed medicines: which techniques and polymers are more successful?*, **Bioengineering.** 4 (2017) 79.
- [190] J.W. Leenslag, A.J. Pennings, R.R.M. Bos, F.R. Rozema, G. Boering, *Resorbable materials of poly(l-lactide). VII. in vivo and in vitro degradation*, **Biomaterials.** 8 (1987) 311-314.
- [191] N. Grabow, M. Schlun, K. Sternberg, N. Hakansson, S. Kramer, K.-P. Schmitz, *mechanical properties of laser cut poly(l-lactide) micro-specimens: implications for stent design, manufacture, and sterilization*, **J. Biomech. Eng.** 127 (2005) 25-31.
- [192] J.J.G. RS Stack, RM Califf, HR Phillips, DB Pryor, PJ Quigley, RP Bauman, JE Tchong, *Interventional cardiac catheterization at Duke Medical*, **Am. J. Cardiol.** 62 (1988) F3-F4.
- [193] S. Venkatraman, F. Boey, L.L. Lao, *Implanted cardiovascular polymers: Natural, synthetic and bio-inspired*, **Prog. Polym. Sci.** 33 (2008) 853-874.

- [194] S. Ramcharitar, P.W. Serruys, *Fully biodegradable coronary stents: Progress to date*, **Am. J. Cardiovasc. Drugs**. 8 (2008) 305-314.
- [195] L. Piao, M. Deng, X. Chen, L. Jiang, X. Jing, *Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone and L-lactide using organic amino calcium catalyst*, **Polymer (Guildf)**. 44 (2003) 2331-2336.
- [196] C. V. Bourantas, Y. Zhang, V. Farooq, H.M. Garcia-Garcia, Y. Onuma, P.W. Serruys, *Bioresorbable scaffolds: Current evidence and ongoing clinical trials*, **Curr. Cardiol. Rep.** 14 (2012) 626-634.
- [197] S. Garg, P.W. Serruys, *Coronary stents: Looking forward*, **J. Am. Coll. Cardiol.** 56 (2010) 43-78.
- [198] W.M. Huang, C.L. Song, Y.Q. Fu, C.C. Wang, Y. Zhao, H. Purnawali, H.B. Lu, C. Tang, Z. Ding, J.L. Zhang, *Shaping tissue with shape memory materials*, **Adv. Drug Deliv. Rev.** 65 (2013) 515-535.
- [199] W.J. Van der Giessen, A.M. Lincoff, R.S. Schwartz, H.M.M. Van Beusekom, P.W. Serruys, D.R. Holmes, S.G. Ellis, E.J. Topol, *Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries*, **Circulation**. 94 (1996) 1690-1697.
- [200] Y.J. Peng, Y.T. Lu, K.S. Liu, S.J. Liu, L. Fan, W.C. Huang, *Biodegradable balloon-expandable self-locking polycaprolactone stents as buckling explants for the treatment of retinal detachment: An in vitro and in vivo study*, **J. Biomed. Mater. Res. - Part A**. 101 (2013) 167-175.
- [201] S.H. Ajili, N.G. Ebrahimi, M. Soleimani, *Polyurethane/polycaprolactane blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants*, **Acta Biomater.** 5 (2009) 1519-1530.
- [202] S. Capancioni, K. Schwach-Abdellaoui, W. Kloeti, W. Herrmann, H. Brosig, H.H. Borchert, J. Heller, R. Gurny, *In vitro monitoring of poly(ortho ester) degradation by electron paramagnetic resonance imaging*, **Macromolecules**. 36 (2003) 6135-6141.
- [203] A. Göpferich, *Mechanisms of polymer degradation and erosion*, **Biomater. Silver Jubil. Compend.** 17 (2006) 117-128.
- [204] D. Hofmann, M. Entrialgo-Castaño, K. Kratz, A. Lendlein, *Knowledge-based approach towards hydrolytic degradation of polymer-based biomaterials*, **Adv. Mater.** 21 (2009) 3237-3245.
- [205] C. Shih, T. Higuchi, K.J. Himmelstein, *Drug delivery from catalysed erodible polymeric matrices of poly(ortho ester)s*, **Biomaterials**. 5 (1984) 237-240
- [206] G.D. Najafpour, M. Sharifzadeh Baei, H. Younesi, F. Tabandeh, H. Eisazadeh, *poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by cupriavidus necator dsmz 545 utilizing various carbon sources*, **World Appl. Sci. J.** 7 (2009) 157-161.

- [207] S.J. Holland, A.M. Jolly, M. Yasin, B.J. Tighe, *Polymers for biodegradable medical devices II. Hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers: hydrolytic degradation studies*, **Biomaterials**. 8 (1987) 289–295.
- [208] Z. Kai, D. Ying, C. Guo-Qiang, *Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates*, **Biochem. Eng. J.** 16 (2003) 115–123.
- [209] H.T. Wang, H. Palmer, R.J. Linhardt, D.R. Flanagan, E. Schmitt, *Degradation of poly(ester) microspheres*, **Biomaterials**. 11 (1990) 679–685.
- [210] S. Gogolewski, M. Jovanovic, S.M. Perren, J.G. Dillon, M.K. Hughes, *Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: Polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA)*, **J. Biomed. Mater. Res.** 27 (1993) 1135–1148.
- [211] M. Unverdorben, A. Spielberger, M. Schywalsky, D. Labahn, S. Hartwig, M. Schneider, D. Looz, D. Behrend, K. Schmitz, R. Degenhardt, M. Schaldach, C. Vallbracht, W. Yoon, *A polyhydroxybutyrate biodegradable stent: Preliminary experience in the rabbit*, **Cardiovasc. Intervent. Radiol.** 25 (2002) 127–132.
- [212] A.J. Domb, S. Amselem, J. Shah, M. Maniar, *Polyanhydrides: synthesis and characterization*, **Biopolym. I.** 107 (1993) 93–141.
- [213] N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, J.E. Nava-Saucedo, *Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques - A review*, **Chemosphere**. 73 (2008) 429–442.
- [214] M.C. Davies, K.M. Shakesheff, A.G. Shard, A. Domb, C.J. Roberts, S.J.B. Tendler, P.M. Williams, *Surface analysis of biodegradable polymer blends of poly(sebacic anhydride) and poly( dl -lactic acid)*, **Macromolecules**. 29 (1996) 2205–2212.
- [215] K.E. Uhrich, A. Gupta, T.T. Thomas, C.T. Laurencin, R. Langer, *Synthesis and characterization of degradable poly(anhydride-co-imides)*, **Macromolecules**. 28 (1995) 2184–2193.
- [216] C. Laurencin, A. Domb, C. Morris, V. Brown, M. Chasin, R. McConnell, N. Lange, R. Langer, *Poly(anhydride) administration in high doses in vivo: Studies of biocompatibility and toxicology*, **J. Biomed. Mater. Res.** 24 (1990) 1463–1481.
- [217] S. Garg, P. Serruys, *Biodegradable and non-biodegradable stents*, **Minerva Cardioangiol.** 57 (2009) 537–565.
- [218] A.K. Shung, M.D. Timmer, S. Jo, P.S. Engel, A.G. Mikos, *Kinetics of poly(propylene fumarate) synthesis by step polymerization of diethyl fumarate and propylene glycol using zinc chloride as a catalyst*, **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.** 13 (2002) 95–108.
- [219] J.P. Fisher, D. Dean, A.G. Mikos, *Photocrosslinking characteristics and mechanical properties of diethyl fumarate/poly(propylene fumarate) biomaterials*, **Biomaterials**. 23 (2002) 4333–4343.

- [220] L.J. Suggs, M.S. Shive, C.A. Garcia, J.M. Anderson, A.G. Mikos, *In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogels*, **J. Biomed. Mater. Res.** 46 (1999) 22–32.
- [221] C.S. Yang, H.C. Wu, J.S. Sun, H.M. Hsiao, T.W. Wang, *Thermo-induced shape-memory PEG-PCL copolymer as a dual-drug-eluting biodegradable stent*, **ACS Appl. Mater. Interfaces.** 5 (2013) 10985–10994.
- [222] B.D.U.L.S.N.C.T. Laurencin, *Biomedical applications of biodegradable polymers*, **J. Polym. Sci. B Polym. Phys.** 49(12) 832–864. (2011).
- [223] M.C. Chen, H.W. Tsai, Y. Chang, W.Y. Lai, F.L. Mi, C.T. Liu, H.S. Wong, H.W. Sung, *Rapidly self-expandable polymeric stents with a shape-memory property*, **Biomacromolecules.** 8 (2007) 2774–2780.
- [224] E. Tenekecioglu, V. Farooq, C. V. Bourantas, R.C. Silva, Y. Onuma, M. Yilmaz, P.W. Serruys, *Bioresorbable scaffolds: A new paradigm in percutaneous coronary intervention*, **BMC Cardiovasc. Disord.** 16 (2016) 38.
- [225] R. Jabara, N. Chronods, K. Robinson, *Novel bioabsorbable salicylate-based polymer as a drug-eluting stent coating*, **Catheter. Cardiovasc. Interv.** 72 (2008) 186-94.
- [226] P.B. Morgan, N. Efron, *The oxygen performance of contemporary hydrogel contact lenses.*, **Cont. Lens Anterior Eye.** 21 (1998) 3–6.
- [227] Y. Ma, L. Xin, H. Tan, M. Fan, J. Li, Y. Jia, Z. Ling, Y. Chen, X. Hu, *Chitosan membrane dressings toughened by glycerol to load antibacterial drugs for wound healing*, **Mater. Sci. Eng. C.** 81 (2017) 522-531.
- [228] L.T. Mashburn, J.C. Wriston, *Tumor inhibitory effect of l-asparaginase from escherichia coli.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 105 (1964) 450–452.
- [229] M. Kammoun, M. Haddar, T.K. Kallel, M. Dammak, A. Sayari, *Biological properties and biodegradation studies of chitosan biofilms plasticized with PEG and glycerol*, **Int. J. Biol. Macromol.** 62 (2013) 433-438.
- [230] S. Yasmeen, M. Kabiraz, B. Saha, M. Qadir, M. Gafur, S. Masum, *Chromium (vi) ions removal from tannery effluent using chitosan-microcrystalline cellulose composite as adsorbent*, **Int. Res. J. Pure Appl. Chem.** 10 (2016) 1-14.
- [231] K. Shameli, M. Bin Ahmad, S.D. Jazayeri, S. Sedaghat, P. Shabanzadeh, H. Jahangirian, M. Mahdavi, Y. Abdollahi, *Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by the green method*, **Int. J. Mol. Sci.** 13 (2012) 6639–6650.
- [232] P. Kolhe, R.M. Kannan, *Improvement in ductility of chitosan through blending and copolymerization with PEG: FTIR investigation of molecular interactions*, **Biomacromolecules.** 4 (2003) 173–180.
- [233] I.D. Gunbas, U. Aydemir Sezer, S. Gülce I, I. Deliloğlu Gürhan, N. Hasirci, *Semi-IPN chitosan/PEG microspheres and films for biomedical applications:*

*Characterization and sustained release optimization*, **Ind. Eng. Chem. Res.** 51 (2012) 11946–11954.

[234] N. Bhattarai, H.R. Ramay, J. Gunn, F.A. Matsen, M. Zhang, *PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release*, **J. Control. Release.** 103 (2005) 609-624.

[235] A. Altinisik, K. Yurdakoc, *Synthesis, characterization, and enzymatic degradation of chitosan/PEG hydrogel films*, **J. Appl. Polym. Sci.** 122 (2011) 1556-1563.

[236] S. Shahabuddin, N.M. Sarih, F.H. Ismail, M.M. Shahid, N.M. Huang, *Synthesis of chitosan grafted-polyaniline/Co3O4 nanocube nanocomposites and their photocatalytic activity toward methylene blue dye degradation*, **RSC Adv.** 5 (2015) 83857-83867.

[237] H. Zhang, L. Deng, M. Yang, S. Min, L. Yang, L. Zhu, *Enhancing effect of glycerol on the tensile properties of bombyx mori cocoon sericin films*, **Int. J. Mol. Sci.** 12 (2011) 3170-3181.

[238] T. Jayaramudu, G.M. Raghavendra, K. Varaprasad, G.V.S. Reddy, A.B. Reddy, K. Sudhakar, E.R. Sadiku, *Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) stabilized nano silver particles by a mechanochemical assisted ball mill process*, **J. Appl. Polym. Sci.** 133 (2016) 43027.

[239] S. Chandra Dey, M. Al-Amin, T. Ur Rashid, M. Zakir Sultan, M. Ashaduzzaman, M. Sarker, S. Md Shamsuddin, *Preparation, characterization and performance evaluation of chitosan as an adsorbent for remazol red*, **Int. J. Latest Res. Eng. Technol.** 2 (2016) 52-62.

[240] H. Tanuma, H. Kiuchi, W. Kai, K. Yazawa, Y. Inoue, *Characterization and enzymatic degradation of peg-cross-linked chitosan hydrogel films*, **J. Appl. Polym. Sci.** 114 (2009) 1902-1907.

[241] A. Subramanian, H.Y. Lin, *Crosslinked chitosan: Its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation*, **J. Biomed. Mater. Res. - Part A.** 75 (2005) 742-53.

[242] Y. Tamada, Y. Ikada, *Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen*, **J. Biomed. Mater. Res.** 28 (1994) 783-9.

[243] T. Wang, S. Gunasekaran, *State of water in chitosan-PVA hydrogel*, **J. Appl. Polym. Sci.** 101 (2006) 3227–3232.

[244] R. Gavara, V. Compañ, *Oxygen, water, and sodium chloride transport in soft contact lenses materials*, **J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.** 105 (2016) 1–14.

[245] S.J. Im, Y.M. Choi, E. Subramanyam, K.M. Huh, K. Park, *Synthesis and characterization of biodegradable elastic hydrogels based on poly(ethylene glycol) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) blocks*, **Macromol. Res.** 15 (2007) 363–369.

- [246] S.K. Halder, C. Maity, A. Jana, K. Ghosh, A. Das, T. Paul, P.K. Das Mohapatra, B.R. Pati, K.C. Mondal, *Chitinases biosynthesis by immobilized Aeromonas hydrophila SBK1 by prawn shells valorization and application of enzyme cocktail for fungal protoplast preparation*, **J. Biosci. Bioeng.** 117 (2014) 170-177.
- [247] M. Kamal Ahmadi, M. Vossoughi, M. Kamal Ahmadi, M. Vossoughi, *Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on the surface of magnetic/gold core/shell nanoparticles*, **J. Nanotechnol.** Article ID 830151 (2013).
- [248] S. Gautam, A.K. Dinda, N.C. Mishra, *Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method*, **Mater. Sci. Eng. C.** 33 (2013) 1228-1235.
- [249] H. Liu, R. Adhikari, Q. Guo, B. Adhikari, *Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch-chitosan films*, **J. Food Eng.** 116 (2013) 588-597.
- [250] A. Aytimur, S. Koçyiğit, I. Uslu, F. Gökmeşe, *Preparation and characterization of polyvinyl alcohol based copolymers as wound dressing fibers*, **Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.** 64 (2015) 111–116.
- [251] B.P. Binks, P.D.I. Fletcher, M.A. Thompson, R.P. Elliott, *Influence of propylene glycol on aqueous silica dispersions and particle-stabilized emulsions*, **Langmuir.** 29 (2013) 5723-5733.
- [252] P. Severino, A. de Souza Feitosa, I.B. Lima-Verde, M.V. Chaud, C.F. Da Silva, R. de Lima, R.G. Amaral, L.N. Andrade, *Production and characterization of mucoadhesive membranes for anesthetic vehiculation*, **Chem. Eng. Trans.** 64 (2018).
- [253] M. Seenuvasan, C.G. Malar, S. Preethi, N. Balaji, J. Iyyappan, M.A. Kumar, K.S. Kumar, *Fabrication, characterization and application of pectin degrading Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> nanobiocatalyst*, **Mater. Sci. Eng. C.** 33 (2013) 2273-2279.
- [254] B. Wang, F. Cheng, Y. Lu, W. Ge, M. Zhang, B. Yue, *Immobilization of pectinase from Penicillium oxalicum F67 onto magnetic cornstarch microspheres: Characterization and application in juice production*, **J. Mol. Catal. B Enzym.** 97 (2013) 137-143.
- [255] E. Campos, P. Coimbra, M.H. Gil, *An improved method for preparing glutaraldehyde cross-linked chitosan-poly(vinyl alcohol) microparticles*, **Polym. Bull.** 70 (2013) 549–561.
- [256] K. Choo, Y.C. Ching, C.H. Chuah, S. Julai, N.S. Liou, *Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber*, **Materials (Basel).** 9 (2016).
- [257] E.A. El-Hefian, M.M. Nasef, A.H. Yahaya, *The preparation and characterization of chitosan / poly (vinyl alcohol) blended films*, **E-Journal Chem.** 8 (2010) 91-96.
- [258] G. Cárdenas, S.P. Miranda, *FTIR and TGA studies of chitosan composite films*, **J. Chil. Chem. Soc.** 49 (2004) 291-295.

- [259] M. Ganesh, A.S. Aziz, U. Ubaidulla, P. Hemalatha, A. Saravanakumar, R. Ravikumar, M.M. Peng, E.Y. Choi, H.T. Jang, *Sulfanilamide and silver nanoparticles-loaded polyvinyl alcohol-chitosan composite electrospun nanofibers: Synthesis and evaluation on synergism in wound healing*, **J. Ind. Eng. Chem.** 39 (2016) 127-135.
- [260] M. Koosha, H. Mirzadeh, M.A. Shokrgozar, M. Farokhi, *Nanoclay-reinforced electrospun chitosan/PVA nanocomposite nanofibers for biomedical applications*, **RSC Adv.** 5 (2015) 10479-10487.
- [261] M. Koosha, H. Mirzadeh, M.A. Shokrgozar, M. Farokhi, *Nanoclay-reinforced electrospun chitosan/PVA nanocomposite nanofibers for biomedical applications*, **RSC Adv.** 5 (2015) 10479-10487.
- [262] A. Islam, T. Yasin, N. Gull, S.M. Khan, M.A. Munawar, M. Shafiq, A. Sabir, T. Jamil, *Evaluation of selected properties of biocompatible chitosan/poly(vinyl alcohol) blends*, **Int. J. Biol. Macromol.** 82 (2016) 551-556.
- [263] P. Ramakrishna, B. Mallikarjuna, A.C. Babu, P. Sudhakar, K.C. Rao, M.C.S. Subha, *Interpenetrating polymer network of crosslinked blend microspheres for controlled release of acebutolol HCl*, **J. Appl. Pharm. Sci.** 6 (2011) 212-219.
- [264] S. Gupta, A.K. Pramanik, A. Kailath, T. Mishra, A. Guha, S. Nayar, A. Sinha, *Composition dependent structural modulations in transparent poly(vinyl alcohol) hydrogels*, **Colloids Surfaces B Biointerfaces.** 74 (2009) 186-190.
- [265] S. Gupta, T.J. Webster, A. Sinha, *Evolution of PVA gels prepared without crosslinking agents as a cell adhesive surface*, **J. Mater. Sci. Mater. Med.** 22 (2011) 1763–1772.
- [266] F. Zheng, B.K. Cui, X.J. Wu, G. Meng, H.X. Liu, J. Si, *Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes*, **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 110 (2016) 69-78.
- [267] Y. Shi, D. Xiong, J. Li, K. Wang, N. Wang, *In situ repair of graphene defects and enhancement of its reinforcement effect in polyvinyl alcohol hydrogels*, **RSC Adv.** 7 (2017) 1045–1055.
- [268] Q. Wang, Y.M. Du, L.H. Fan, *Properties of chitosan/poly(vinyl alcohol) films for drug-controlled release*, **J. Appl. Polym. Sci.** 96 (2005) 08–813.
- [269] V. Vyas, T. Kaur, A. Thirugnanam, *Chitosan composite three dimensional macrospheric scaffolds for bone tissue engineering*, **Int. J. Biol. Macromol.** 104 (2017) 1946–1954.
- [270] Ö.A. Bozdemir, M. Tutaş, *Plasticiser effect on water vapour permeability properties of locust bean gum-based edible films*, **Turkish J. Chem.** 27 (2003). 773-782
- [271] A.D. Nugraheni, D. Purnawati, A. Kusumaatmaja, *Physical evaluation of pva/chitosan film blends with glycerine and calcium chloride*, **J. Phys. Conf. Ser.**, 1011 (2018).

- [272] N.E. Suyatma, L. Tighzert, A. Copinet, V. Coma, *Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films*, **J. Agric. Food Chem.** 53 (2005) 3950–3957.
- [273] Q. Chen, Y. Liu, T. Wang, J. Wu, X. Zhai, Y. Li, W.W. Lu, H. Pan, X. Zhao, *Chitosan-PVA monodisperse millimeter-sized spheres prepared by electrospraying reduce the thromboembolic risk in hemorrhage control*, **J. Mater. Chem. B.** 5 (2017) 3686-3696.
- [274] J. Harris, A.J. Daugulis, *Biocompatibility of low molecular weight polymers for two-phase partitioning bioreactors*, **Biotechnol. Bioeng.** 112 (2015) 2450-2458.
- [275] N.E.A. El-Naggar, S.F. Deraz, S.M. El-Ewasy, G.M. Suddek, *Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from Streptomyces brollosae NEAE-115*, **BMC Pharmacol. Toxicol.** (2018) 19-51.
- [276] R. V. Mahajan, V. Kumar, V. Rajendran, S. Saran, P.C. Ghosh, R.K. Saxena, *Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from bacillus licheniformis: In vitro evaluation of anti-cancerous properties*, **PLoS One.** 9 (2014).
- [277] H.A. El-Refai, M.S. Shafei, H. Mostafa, A.M.H. El-Refai, E.M. Araby, F.M. El-Beih, S.M. Easa, S.K. Gomaa, *Comparison of free and immobilized L-asparaginase synthesized by gamma-irradiated penicillium cyclopium*, **Polish J. Microbiol.** 65 (2016) 43–50.
- [278] A.K. Vala, B. Sachaniya, D. Dudhagara, H.Z. Panseriya, H. Gosai, R. Rawal, B.P. Dave, *Characterization of L-asparaginase from marine-derived Aspergillus niger AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste*, **Int. J. Biol. Macromol.** 108 (2018) 41-46.

## ÖZGEÇMİŞ

**Ad Soyad:** Ahmet ULU

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Havza/03.10.1986

**Adres:** İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 44280, MALATYA

**E-posta:** [ahmet.ulu@inonu.edu.tr](mailto:ahmet.ulu@inonu.edu.tr)

**Lisans:** Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2008, TOKAT

**Yüksek Lisans:** İnönü üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, 2014, MALATYA

**Mesleki Deneyim ve Ödüller:** İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Kimyager, 2009-halen devam ediyor

### Yayınlar

#### Uluslararası

1. Ozgur, M.E., **Ulu, A.**, Ozcan, I., Balcioglu, S., Ates, B., Koytepe, S. (2018). Investigation of toxic effects of amorphous SiO<sub>2</sub> nanoparticles on motility and oxidative stress markers in rainbow trout sperm cells. *Environmental Science and Pollution Research*. 26:15641–15652.
2. Karlidag, S., Basgel, S., **Ulu, A.**, Karadol, G., Ugur, Y., Yilmaztekin, M., Ates, B., Erdogan, S. (2018). The effect of heat treatment on sugar, HMF and antioxidant properties of honey obtained from different regions in Turkey. *Journal of Apitherapy and Nature*. 1(2), 32-45.
3. Ozgur, M.E., **Ulu, A.**, Balcioglu, S., Ozcan, I., Koytepe, S., Ates, B. (2018). The toxicity assessment of iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles on physical and biochemical quality of rainbow trout spermatozoon. *Toxics*. 6(4), 62.
4. Ates, B., **Ulu, A.**, Koytepe, S., Noma, S. A. A., Kolat, V. S., Izgi, T. (2018). Magnetic-propelled Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan carriers enhance L-asparaginase catalytic activity: A promising strategy for enzyme immobilization. *RSC Advances*. 8, 36063-36075.
5. **Ulu, A.**, Noma, S. A. A., Koytepe, S., Ates, B. (2018). Chloro-modified magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MCM-41 core-shell nanoparticles for L-Asparaginase immobilization with improved catalytic activity, reusability, and storage stability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 187(3), 938-956.
6. Ozgur, M.E., Balcioglu, S., Ulu, A., Ozcan, I., Okumuş, F., Koytepe, S., Ates, B. (2018). The *in vitro* toxicity analysis of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on kinematics and biochemical quality of rainbow trout sperm cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 62, 11-19.

7. **Ulu, A., Ozcan, I., Koytepe, S., Ates, B.** (2018). Design of epoxy-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MCM-41 core-shell nanoparticles for enzyme immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 115, 1122-1130.
8. **Ulu, A., Noma, S. A. A., Koytepe, S., Ates, B.** (2018). Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MCM-41 core-shell nanoparticles functionalized with thiol silane for efficient L-Asparaginase immobilization. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup2):1035-1045.
9. **Ulu, A., Balcıoğlu, S., Birhanlı, E., Sarımeseli, A., Keskin, R., Koytepe, S., Ates, B.** (2018). Poly (2-hydroxyethyl methacrylate)/boric acid composite hydrogel as soft contact lens material: thermal, optical, rheological and enhanced antibacterial Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 165 (35), 46575.
10. **Ulu, A., Noma, S. A. A., Gurses, C., Koytepe, S., Ates, B.** (2018). Chitosan/Polyvinylpyrrolidone/MCM-41 composite hydrogel films: structural, thermal, surface, and antibacterial properties. *Starch*, 70, 11-12, 1700303.
11. **Ozgur, M.E., Ulu, A., Balcıoğlu, S., Ozcan, I., Okumuş, F., Koytepe, S., Ates, B.** (2018). Investigation of toxicity properties of flower-like ZnO nanoparticles on cyprinus carpio sperm cells using computer-assisted sperm analysis (CASA). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18 (6), 771-780.
12. **Ulu, A. & Ates, B.** (2017). Immobilization of L-Asparaginase on carrier materials: A comprehensive review. *Bioconjugate Chem.*, 28 (6), 1598–1610.
13. **Ulu, A., Koytepe, S., Ates, B.** (2016). Design of starch functionalized biodegradable P(MAA-co-MMA) as carrier matrix for L-asparaginase immobilization. *Carbohydrate Polymers*. 153, 559–572.
14. **Ulu, A., Koytepe, S., Ates, B.** (2016). Synthesis and characterization of PMMA composites activated with starch for immobilization of L-asparaginase. *Journal of Applied Polymer Science*. 133, (19).
15. **Ulu, A., Koytepe, S., Ates, B.** (2016). Synthesis and characterization of biodegradable pHEMA-starch composites for immobilization of L-asparaginase. *Polymer Bulletin*. 73 (7), 1891–1907.

#### ***Ulusal Yayınlar***

1. **Ulu A., Balcıoğlu S., Koytepe S., Ates B.** Yenilenebilir Kaynaklı Poliüretan Kompozitler, *Putech&Composites Dergisi*, Ekim 2015.
2. **Ates B., Koytepe S., Ulu A., Balcıoğlu S.** Yenilenebilir Kaynak Olarak Bitkisel Yağlardan Poliöl Sentezi, *Putech&Composites Dergisi*, Temmuz 2015.

### Kitap Bölümleri

1. **Ulu, A.**, Ates, B. (2018). Sensors: Natural polymeric composites. *Encyclopedia of Polymer Applications*, Volume 3.
2. Ates, B., Koytepe, S., Balcioglu, S., **Ulu, A.**, Gurses, C. (2017). Biomedical applications of hybrid polymer composite materials. *Hybrid Polymer Composite Materials*, Elsevier, 4, 343-408.

### Projeler

1. "Kemoterapötik Bir Ajan Olan L-Asparaginazın Farklı Polimerik Yapılara İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu", Araştırmacı, **BAP (2013/37)**, 2013-2014.
2. "İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğrenci Laboratuvarları Alt Yapı Destekleme Projesi", Araştırmacı, **BAP(2013/38)**, 2014-2015.
3. "İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Alet-Cihazların Tamir Edilmesi ve İyileştirilmesi", Araştırmacı, **BAP (2015/09)**, 2015-2016.
4. "Sternum Kapamada Kullanılmak Üzere Enjekte Edilebilen UV-Kürlenebilir Multifonksiyonel Poliüretan Yapıştırıcıların Hazırlanması ve Uygulanması", Bursiyer, **TÜBİTAK/116Z501**, 2017-2019.
5. "L-Asparaginaz İçeren Biyobozunur Şekil Hafızalı Stent-Enzim İlaç Formülasyonlarının Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu", Araştırmacı, **BAP (FDK-2017-751)**, 2017-2019.
6. "Zein Proteini İçeren UV Kürlenebilir ve Antibakteriyel Özellikte Poliüretan-Akrilat Biyoyapıştırıcıların Hazırlanması", Araştırmacı, **BAP (FDP-2018-1284)**, 2018-...
7. "Tenofovir Alafenamide (TAF) İçeren Kitosan Nanopartikülü Formülasyonlarının Hazırlanması, Genotoksik ve Mitotoksik Etkilerinin Araştırılması", Araştırmacı, **BAP (TCD-2018-1356)**, 2018-...

### Burslar

1. "Sternum Kapamada Kullanılmak Üzere Enjekte Edilebilen UV-Kürlenebilir Multifonksiyonel Poliüretan Yapıştırıcıların Hazırlanması ve Uygulanması", **1001 TÜBİTAK-KBAG, Proje No:116Z501**, 2017-2019.

### Ödüller

1. **Ahmet Ulu**, "Immobilization of L-Asparaginase on Phema/Starch Biocomposite: A Recoverable Biocatalyst for L-Asparagine Removal" başlıklı Poster 3.'lük Ödülü, Innovation Meetings in Medicine 3, 11-13 May 2017, Gaziantep.

## Bildiriler

### Tam Metin Bildiri

1. Belemir Gülhan, Necip Ermiş, Mehmet Günata, Onural Özhan, Hakan Parlakpınar, Nigar Vardı, Azibe Yıldız, **Ahmet Ulu**, Burhan Ateş, Şeyma Yaşar, Ahmet Acet. Tikagrelorün Sıçanlarda Kardiyovasküler Üzerinde Yaptığı Değişikliklerin Araştırılması. **1. Uluslararası Battalgazi Multidisipliner Çalışmalar Kongresi**. 7-9 Aralık, 2018, Malatya, Türkiye.

### Sözlü

1. Burhan Ates, Süleyman Köytepe, Sevgi Balcıoğlu, Ahmet Ulu, Samir Abbas Ali Noma, İmren Özcan. Sternal Kapamada Kullanılmak Üzere Jelatin İçeren UV-Kürlenebilir Poliüretan-Akrilat Sert Doku Yapıştırıcıların Geliştirilmesi. **23. Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu**, 15-16 Aralık 2018, Acıbadam Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
2. Burhan Ates, **Ahmet Ulu**, Suleyman Köytepe, Samir Abbas Ali Noma, Veli Serkan Kolat, Tekin Izgi. "Magnetic Field Enhances Catalytic Activity of L-Asparaginase Conjugated on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Chitosan Nanoparticles". **SANKO University Innovation in Medicine Summit**, 4, 11-13 Oct 2018, Gaziantep, Turkey.
3. Sevgi Balcıoğlu, **Ahmet Ulu**, Samir Abbas Ali Noma, Canbolat Gürses, Merve Gökşin Karaaslan, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. "Preparation of Sericin Based UV-Curing Multifunctional Polyurethane Tissue Adhesives". **SANKO University Innovation in Medicine Summit**, 4, 11-13 Oct 2018, Gaziantep, Turkey.
4. Burhan Ates, Süleyman Köytepe, Merve Gökşin Karaaslan, Sevgi Balcıoğlu, **Ahmet Ulu**. "Yapıştırma Süresi Kontrol Edilebilen ve Güçlü Yapıştırıcı Özelliğe Sahip Kollajen İçeren Polimerik Biyoyapıştırıcıların Hazırlanması". **VII. Polymer Science and Technology Congress with International Participation**. 9-12 Eylül / September 2018, Eskişehir, Turkey.
5. **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Ayşe Sarımeşeli Paçacı, Burhan Ateş. "Preparation, Thermal, Optical and Rheological Properties of PHEMA/BA Composite Hydrogels". **29th General Chemistry Congress**, 10-14 September 2017, Ankara, Turkey.
6. Burhan Ates, Süleyman Köytepe, Sevgi Balcıoğlu, Merve Gökşin Karaaslan, **Ahmet Ulu**. "Design and Application of Polyurethane Based Tissue Adhesive Containing Biomimic Designs "**International Participation 5th Pharmaceutical Chemistry: Congress on the Design**,

*Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Ingredients*, Side Star Elegance Hotel 30 March – 2 April 2017 Antalya.

7. **Ahmet Ulu**, Suleyman Koytepe, Burhan Ates. "Starch Modified Polymeric Biocomposites for L-Asparaginase Immobilization As Carrier Matrix", *SANKO University Innovation in Medicine Summit-2*, 05-07 May 2016, Gaziantep, Turkey.
8. **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. " Preparation and Characterization of Biodegradable Polymeric Composites Containing Starch for Use in Immobilization of L-asparaginase", *27. General Chemistry Congress*, 23-28 August 2015, Çanakkale, Turkey.

**Poster**

1. **Mustafa Erkan Özgür, Ahmet Ulu**, İmren Ozcan, Sevgi Balcıoğlu, Burhan Ateş, Süleyman Köytepe. The *in vitro* Effects of Silica Nanoparticles on Motility Parameters in Rainbow Trout Sperm Cells. *3rd National/1st International Workshop on Gamete Biology in Aquaculture*. September 19-21 2018, İskenderun/Hatay.
2. **Samir Abbas Ali Noma, Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. Effects of Silica on the Morphology, Structure and Properties of Starch/Poly(vinyl Pyrrolidone) Blends. *VII. Polymer Science and Technology Congress with International Participation*. 9-12 Eylül / September 2018, Eskişehir, Turkey.
3. **Ahmet Ulu**, Samir Abbas Ali Noma, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. Chloro-Functionalized Magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MCM-41 Core-Shell Nanoparticles for Enzyme Immobilization. *International Conference on Physical Chemistry and Functional Materials (PCFM'18)*. 19-21 June-2018, Elazığ, Turkey.
4. **Sevgi Balcıoğlu**, Merve Göksin Karaaslan, **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. Synthesis and Characterization of Isophorone Diisocyanate (IPDI), Gelatin and PEG200-Based Polyurethane-Acrylate Adhesives. *International Conference on Physical Chemistry and Functional Materials (PCFM'18)*. 19-21 June-2018, Elazığ, Turkey.
5. **Sevgi Balcıoğlu**, Merve Göksin Karaaslan, **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş, "The Effect on Adhesive of Crosslinking Density in UV Curable Tissue Adhesives". *International Participation 6th Pharmaceutical Chemistry: Congress on the Design, Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Ingredients*, Maritim Pine Beach Hotel, 22 – 25 March, 2018, Belek, ANTALYA.
6. **Merve Göksin Karaaslan**, Sevgi Balcıoğlu, **Ahmet Ulu**, İmren Özcan, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş, "Preparation of UV Curable Polyurethane

Based Tissue Adhesives Having Different Ratio Hydroxyl Terminated Groups". *International Participation 6th Pharmaceutical Chemistry: Congress on the Design, Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Ingredients*, Maritim Pine Beach Hotel, 22 – 25 March, 2018, Belek, ANTALYA.

7. Samir Abbas Ali Noma, **Ahmet Ulu**, Suleyman Koytepe, Burhan Ates. "Surface Modification of MCM-41-Coated Magnetite Nanoparticles for Covalent Immobilization of L-Asnase". *International Participation 6th Pharmaceutical Chemistry: Congress on the Design, Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Ingredients*, Maritim Pine Beach Hotel, 22 – 25 March, 2018, Belek, ANTALYA.
8. **Ahmet Ulu**, Samir Abbas Ali Noma, Suleyman Koytepe, Burhan Ates. "Preparation of Epoxy-Functional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@MCM-41 Magnetic Nanoparticles and Application of L-Asparaginase Immobilization". *International Participation 6th Pharmaceutical Chemistry: Congress on the Design, Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Ingredients*, Maritim Pine Beach Hotel, 22 – 25 March, 2018, Belek, ANTALYA.
9. Sevgi Balcıoğlu, Merve Göksin Karaaslan, **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş, "Preparations of Sericin Based Polyurethane-Acrylate Hard Tissue Adhesives". *International Participation 6th Pharmaceutical Chemistry: Congress on the Design, Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Ingredients*, Maritim Pine Beach Hotel, 22 – 25 March, 2018, Belek, ANTALYA.
10. Merve Göksin Karaaslan, Sevgi Balcıoğlu, **Ahmet Ulu**, İmren Özcan, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş, " The Effect on Adhesive of Molecular Weight of Polyethylene Glycol (PEG) on Gelatin-Containing Polyurethane-Acrylate Bone Adhesives". *International Participation 6th Pharmaceutical Chemistry: Congress on the Design, Synthesis, Production and Standardization of Drug Active Ingredients*, Maritim Pine Beach Hotel, 22 – 25 March, 2018, Belek, ANTALYA.
11. **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. "Immobilization of L-Asparaginase on PHEMA/Starch Biocomposite: A Recoverable Biocatalyst for L-Asparagine Removal". *SANKO University Innovation in Medicine Summit-3*, 11-13 May 2017, Gaziantep, Turkey.
12. **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. " Preparation of L-asparaginase Immobilized Starch-Containing PMA-co-PMMA Composites as Colon Packing Material and Investigation of its Usability in L-asparagine Removal", *16. Chromatography Congress*, 31 August-2 September 2016, Malatya, Turkey.
13. **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. " Selective Removal of Asparagine by Using L-asparaginase Immobilized on Starch-modified

Polymeric Composites as Column Packing Materials", **28. General Chemistry Congress**, 15-21 August 2016, Mersin, Turkey.

14. **Ahmet Ulu**, Suleyman Koytepe, Burhan Ates. "Immobilization of L-asparaginase onto PMMA Composites Activated with Starch", **Macro 2016 World Polymer Congress**, 17-21 July 2016, İstanbul, Turkey.
15. **Ahmet Ulu**, Rukiye Keskin, Emre Birhanlı, Sevgi Balcıoğlu, Suleyman Koytepe, Burhan Ates. "Preparation, characterization and antibacterial study of pHEMA (soft contact lens) hydrogel incorporated with boric acid", **Macro 2016 World Polymer Congress**, 17-21 July 2016, İstanbul, Turkey.
16. **Ahmet Ulu**, Süleyman Köytepe, Burhan Ateş. " Synthesis, Characterization and L-asparaginase Immobilization of PMA-PMMA-Starch Composites", **27. General Chemistry Congress**, 23-28 August 2015, Çanakkale, Turkey.
17. **Ahmet Ulu**, Burhan Ates, Suleyman Koytepe. "Characterization and Immobilization of L-asparaginase, A Chemotherapeutic Agent, onto pHEMA/starch Biocomposites". **European Polymer Congress**, 21-26 June 2015, Dresden, Germany.
18. **Ahmet Ulu**, Sevgi Balcıoğlu, Serkan Başgel, Semiramis Karlıdağ, Selim Erdoğan, Burhan Ates. "The Effect of Heat-Treatment on Antioxidant Properties of Honey Obtained From Different Region in Turkey". **44<sup>th</sup> World Chemistry Congress**, 11-16 August 2013, İstanbul, Turkey.

#### Hakemlikler

1. Dynamic Shear Rheology Optimization and Viscoelastic kinetics of Reduced Graphene Oxide Reinforced Poly (Vinyl Alcohol) Bionanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science*, 2018.
2. Cellulase immobilization on poly(methyl methacrylate) nanoparticles by miniemulsion polymerization. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2016.

#### Katıldığı Seminerler, Eğitimler ve Çalıştaylar

1. PCFM'18, International Conference on Physical Chemistry and Functional Materials, 19-21 June 2018, Elazığ, Turkey.
2. Uluslararası Katılımlı 6. İlaç Kimyası Kongresi, 22-25 Mart 2018, Antalya, Türkiye.
3. "Uygulamalı Biyokimya Güncel Konular-3", Katılım Belgesi, 12-14 Temmuz 2017, Aksaray, Türkiye.

4. "16. Kromatografi Kongresi" Katılım Belgesi, 31 Ağustos - 2 Eylül 2016, Malatya, Türkiye.
5. "MACRO 2016 - 46th IUPAC World Polymer Congress" Certificate of Attendance, July 17-21 2016, Istanbul, Turkey.
6. "Innovation in Medicine Summit-2" Certificate of Participation, May 5-7 2016, Gaziantep, Turkey.
7. "Moleküler Tıpta Biyomühendislik ve İnovasyon", 20-21 Mart 2015, Sanko Üniversitesi, Gaziantep.
8. "Tübitak 1000-Üniversitelerin Araştırma Proje Potansiyelinin Geliştirilmesine Yönelik Destek Programı Doktora Öğrencilerine Yönelik Proje Yazma Eğitimi", Katılım Belgesi, 12-13 Ocak 2015, Malatya.
9. "Tübitak 1000-Üniversitelerin Araştırma Proje Potansiyelinin Geliştirilmesine Yönelik Destek Programı Proje Yazma Eğitimi", Katılım Belgesi, 12-14 Aralık 2014, Malatya.
10. "4. AR-GE Proje Pazarı", Katılım Sertifikası, 1 Kasım 2014, İstanbul.
11. "İnönü Çocuk Üniversitesi Kış Kampı Teşekkür Belgesi, Üstün Yetenekliler Araştırma ve Uygulama Merkezi, 25-29 Ocak 2014, Malatya.
12. "44<sup>th</sup> World Chemistry Congress" Certificate of Attendance, IUPAC and Turkish Chemical Society, 11-16 August 2013, Istanbul.
13. Deneysel Hayvanlar Kullanım Sertifikası", T.C. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu, 04-12 Mayıs 2013, Malatya.
14. "Yüzey Analiz Teknikleri ve Uygulamaları Seminerleri Katılım Belgesi" İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi, 2013, Malatya.
15. Tübitak, İnönü Üniversitesi, İnönü Çocuk Üniversitesi Yaz Kampı Teşekkür Belgesi, Üstün Yetenekliler Araştırma ve Uygulama Merkezi, 26 Haziran-4 Temmuz 2012, Malatya.
16. "EON C Mikroplate Okuyucu Cihazı Operatör Eğitim Sertifikası", Pera Medikal, 16 Mayıs 2012, Malatya.