

**Kitosan Türevlerini İçeren Hidrojellerin ve Çözeltilerin
Hemostatik Özelliklerinin Değerlendirilmesi**

**Assessment of Hemostatic Characteristics of Hydrogels and
Solutions Containing Chitosan Derivatives**

SITKI DOĞA ELÇİ

PROF. DR. E. SİBEL SÜMER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilimdalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2019

SITKI DOĞA ELÇİ'nin hazırladığı “Kitosan Türevlerini İçeren Hidrojellerin ve Çözeltilerin Hemostatik Özelliklerinin Değerlendirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Figen ÜNLÜ ERKOÇ
Başkan

Figen Erkoç

Prof. Dr. E. Sibel SÜMER
Danışman

Sibel Sümer

Prof. Dr. Nuran DİRİL
Üye

Nuran Diril

Prof. Dr. Hatice MERGEN
Üye

Hatice Mergen

Doç. Dr. F. Burcu BELEN APAK
Üye

F. Burcu Belen Apak

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak
...../...../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun

olarak atıfta bulunduğumu,

- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

26/06/2109


SITKI DOĞA ELÇİ

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporunun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarda kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi /H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

26/06/2019

SITKI DOĞA ELÇİ

ÖZET

KİTOSAN TÜREVLERİNİ İÇEREN HİDROJELLERİN VE ÇÖZELTİLERİN HEMOSTATİK ÖZELLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Sıtkı Doğa ELÇİ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

Haziran 2019, 132 sayfa

Tez çalışmasının temel amacı, yapıları gereği hemostat aktif olabileceği öngörülen kitosan türevlerinin sünger ve jel formlarının sentezlenerek, bu türevlerin hemostatik ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesidir. Sunulan tez çalışması kapsamında, ham kitosan öncelikle 70°C’de, kuvvetli bir baz olan NaOH uygulaması ile saflaştırılmıştır. Ham kitosan ve elde edilen saflaştırmış kitosan polimerinin FT-IR spektroskopi analiziyle, ham kitosan ve saflaştırmış kitosanın transmittans spektrumları arasında belirgin farklılığın olmadığı yani, ham kitosanın protein kontaminasyonundan arı olduğu belirlenmiştir. Saflaştırma işleminin ham kitosan üzerindeki degradatif etkisi Boyut Dışlama Kromatografisi (BDK) analiziyle ortaya konulmuştur. İlgili saflaştırma yöntemi kapsamında vakum filtrasyonu kullanılarak çözünmeyen safsızlıklar da bertaraf edildiğinden, çalışmanın ileri aşamalarındaki sentezler, saflaştırılmış kitosan kullanılarak yapılmıştır. Çalışma kapsamında sentezlenen polikationik kitosan türevlerinden kitosanın asetat (K-Ac) ve kitosan sitrat (K-Ci) tuzlarının protonasyon dereceleri potansiyometrik ölçümler kullanılarak hesaplanmıştır. Sentezlenen diğer türev, polikationik özelliği pH’dan bağımsız olan, kitosanın kuaternize türevi; N,N,N trimetil kitosan (TMK)’dir. TMK türevinin saflığı, Heteronükleer Tek Kuantum Korelasyonu (¹H-¹³C

HSQC) ve Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu (^1H - ^{13}C HMBC) spektrumlarındaki korelasyonlara dayanarak, metilasyon dereceleri ise ^1H NMR analiziyle belirlenmiştir. Kuaternizasyon işleminin, kullanılan saf kitosan üzerindeki degradatif etkisi BDK analizyle ortaya konulmuştur. Türevlendirme yöntemlerinin, kitosan ana zincirinin çözünürlüğü üzerindeki etkisini belirlemek üzere; 5 mg/ml kitosan ana zincirini içeren numunelerin sulu karışımlarının 25°C ve 500 nm'deki % transmitansları UV/Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür. Saflaştırma işlemi sonucunda degrade olan kitosanın sudaki çözünürlüğü beklendiği gibi artmıştır. Asetik asit ve sitrik asit kullanılarak gerçekleştirilen protonasyon sonrasında, saflaştırılmış kitosanın çözünürlüğünün daha fazla arttığı belirlenmiştir. TMK türevinin trimetilasyon derecesinin, K-Ac'nin protonasyon derecesinden yüksek olmasına rağmen, TMK suda daha düşük çözünürlük göstermiştir. Moleküler modelleme çalışmaları kapsamında, kitosanın Glikoprotein IIb/IIIa tromosit reseptörü üzerinden agonist etki gösterebileceği belirlenmiştir. Ayrıca, kitosanın hem GPIIb/IIIa hem de fibrinojene bağlanabilmesi, kitosanın Von Willebrand faktörü (vWF)'nin fonksiyonel analogu olarak işlev görerek pıhtılaşmada etkili olabileceğini göstermiştir. Moleküler dinamik yöntemiyle belirlendiği üzere, protonlanmış kitosan ve TMK oligomerlerinin eritrosit membranıyla elektrostatik etkileşime girerek pıhtılaşmayı arttırabilir. Bu etkinin, TMK türevinde daha düşük olacağı belirlenmiştir. İn vitro etkinlik testinde ve antimikrobiyal etkinlik testinde kullanılmak üzere, ayrıca, Polivinil Alkol (PVA)/Polivinil Prolidon (PVP)/gliserin/K-Ci ve PVA/PVP/gliserin/TMK kompozit jelleri sentezlenmiştir. Antimikrobiyal etkinlik testinde, TMK'nın en yüksek etkinliği gösterdiği belirlenmiştir. İn vitro etkinlik testinde belirlendiği üzere, boş gruba göre K-Ac, kitosan ve Jel gruplarında Tam Kan Pıhtılaşma Zamanı (WHBCT) kısalırken, K-Ci grubunda uzamıştır ($p < 0.05$).

Anahtar Kelimeler: Hemostat, Kitosan asetat, Kitosan Sitrat, Trimetil Kitosan.

ABSTRACT

ASSESSMENT of HEMOSTATIC CHARACTERISTICS of HYDROGELS and SOLUTIONS CONTAINING CHITOSAN DERIVATIVES

Sıtkı Doğa ELÇİ

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

June 2019, 132 pages

The main aim of this thesis study is to synthesize the sponge and gel forms of chitosan derivatives which may be hemostatically active due to their structures, and to evaluate the hemostatic and antimicrobial activities of these derivatives. Within the scope of the presented thesis, raw chitosan was first purified by applying a strong base NaOH at 70°C. The FT-IR spectroscopy analysis revealed no significant differences between the transmittance spectra of the raw and the purified chitosan, i.e., the raw chitosan was free from protein contamination. The degradative effect of purification on raw chitosan was demonstrated by Size Exclusion Chromatography (SEC) analysis. Since insoluble impurities were also removed by vacuum filtration during the respective purification process, syntheses in the further stages of the study were made using purified chitosan. The protonation degrees of chitosan acetate (K-Ac) and chitosan citrate (K-Ci) salts of polycationic chitosan derivatives synthesized were calculated using potentiometric measurements. Another synthesis was a quaternized derivative of chitosan, N, N, N-trimethyl chitosan (TMK), whose polycationic property is independent of pH. The purity of TMK derivative was determined based on the correlations in Heteronuclear Single Quantum Correlation (1H-13C HSQC) and Heteronuclear Multiple Bond Correlation

(¹H-¹³C HMBC) spectra, and methylation degrees were determined by ¹H NMR analysis. The degradative effect of the quaternization process on the pure chitosan used was demonstrated by SEC analysis. To determine the effect of the derivatization methods on the solubility of the chitosan main chain; % Transmittance at 25°C and 500 nm of aqueous mixtures of samples containing 5 mg / ml chitosan main chain were measured by a UV/Vis spectrophotometer. As a result of the purification process, the solubility of the degraded chitosan in water increased as expected. It was determined that the solubility of purified chitosan was further increased due to protonation using acetic acid and citric acid. Although the degree of trimethylation of the TMK derivative was higher than the degree of protonation of the K-Ac, TMK turned out to be less soluble. In the context of molecular modeling studies, chitosan exhibited the potential of demonstrating agonist effects via the Glycoprotein IIb / IIIa thrombocyte receptor. Furthermore, the ability of chitosan to bind both to GPIIb / IIIa and fibrinogen, showed that chitosan could be effective in the clotting process by acting as the functional analogue of the Von Willebrand factor (vWF). As determined by molecular dynamics method, protonated chitosan and TMK oligomers may reinforce the coagulum via electrostatic interactions with the erythrocyte membrane. This effect was found to be lower in the TMK derivative. Polyvinyl Alcohol (PVA) / Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) / glycerine / K-Ci and PVA / PVP / glycerine / TMK composite gels were also prepared. In antimicrobial efficacy test, TMK showed the highest efficacy. As determined in the *in vitro* efficacy test, Whole Blood Coagulation Time (WHBCT) was shortened in K-Ac, Chitosan and Gel groups compared to empty group, but prolonged in K-Ci group ($p < 0.05$).

Keywords: Hemostat, Chitosan acetate, Chitosan citrate, Trimethyl chitosan.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösterici olan, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. E. Sibel SÜMER'e ve tez çalışmam süresince değerli katkı ve önerilerini paylaştığım tez izleme komitesindeki saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Figen ÜNLÜ ERKOÇ ve Prof. Dr. Hatice MERGEN'e;

Çalışmamın moleküler modelleme kısmının gerçekleştirilebilmesi için çok büyük emekler sarf eden Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Esin AKI YALÇIN'a;

Çalışmamın in vitro etkinlik testlerinin gerçekleştirilmesinde çok önemli destekler veren Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji Onkoloji Bilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Fatma Burcu BELEN APAK'a;

Çalışmamın sonuçlarının yorumlanmasında yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden değerli arkadaşım Dr. Ecz. Kayhan BOLELLİ'ye, Ankara Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Banu Kaşkatepe'ye ve Slovenya Ulusal Kimya Enstitüsü NMR Merkezi'nden Uros JAVORNIK'e;

Hayatım boyunca beni koşulsuzca destekleyen sevgili aileme en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Sıtkı Doğa ELÇİ,

Haziran 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	x
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	6
2.1. Hemostaz ve Kan Pıhtılaşması	6
2.1.1. Hemostazdaki olaylar	6
2.1.1.1. Damar spazmı (Vazokonstriksiyon)	6
2.1.1.1.1. Endotelinler ve reseptörleri	6
2.1.1.2. Trombosit tıkaçı oluşumu (Primer hemostaz)	8
2.1.1.3. Kan pıhtısı oluşumu (Sekonder hemostaz)	9
2.1.1.3.1. Pıhtılaşmanın başlaması: Protrombin aktivatörü oluşumu	13
2.1.1.3.1.1. Pıhtılaşmanın başlamasında ekstrinsek mekanizma	14
2.1.1.3.1.2. Pıhtılaşmanın başlamasında intrinsek mekanizma	15
2.1.1.3.1.3. Ekstresek ve intrinsek yollar arasındaki etkileşim	17
2.1.1.3.1.4. Pıhtılaşmanın güncel konsepti	17
2.1.1.3.1.5. Pıhtılaşmada kalsiyum iyonlarının rolü	19
2.1.1.4. Fibröz organizasyon	21
2.2. Ölümcül Üçlü ve Hasar Kontrol Ameliyatı	21
2.2.1. Hipotermi	22
2.2.2. Koagülopati	23
2.2.3. Asidoz	24
2.3. Hemostazda Kullanılan Glukozaminoglikanlar	25
2.3.1. Poli-N-asetil glukozamin (p-GlcNAc)	25

2.3.1.1 p-GlcNAc içeren ürünün kaynağı, yapısı ve reaktivitesi	25
2.3.1.2. p-GlcNAc ve p-GlcNAc içeren ürünün hemostatik etkinliği	26
2.3.1.3. p-GlcNAc'nin ve p-GlcNAc içeren ürünün hemostatik mekanizması	27
2.3.2. Kitin	33
2.3.2.1. Kitinin kaynağı, yapısı ve reaktivitesi	33
2.3.2.2. Kitinin hemostatik etkinliği	37
2.3.2.3. Kitinin hemostatik mekanizması	38
2.3.3. Kitosan	39
2.3.3.1. Kitosanın kaynağı, yapısı ve reaktivitesi	39
2.3.3.2. Kitosanın ve kitosan içeren ürünlerin hemostatik etkinliği	41
2.3.4. Belirli kitosan türevleri	42
2.3.4.1. Belirli kitosan türevlerinin yapıları, sentez ve reaktiviteleri	42
2.3.4.2. Belirli kitosan türevlerinin hemostatik etkinlikleri	44
2.4. Hidrojeller	45
2.4.1. Fiziksel hidrojeller	45
2.4.2. Kimyasal hidrojeller	46
2.4.3. Işınla çapraz bağlama	47
2.4.4. Kompozit hidrojeller	48
3. MATERYAL VE METOT	50
3.1. Kitosanın Saflaştırılması	50
3.2. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi	51
3.3. Kitosan Türevleri	52
3.3.1. Protonlanmış kitosan türevleri	52
3.3.1.1. Kitosan asetat türevlerinin hazırlanması	52
3.3.1.2. Kitosan sitrat türevinin hazırlanması	52
3.3.1.3. Protonasyon derecelerinin belirlenmesi	53
3.3.2. Trimetil kitosan türevi	56
3.3.2.1. Trimetil kitosan türevinin hazırlanması	56
3.3.2.2. Trimetil kitosan türevinin saflaştırılması	57
3.3.2.3. Trimetil kitosan türevinin deasetilasyon ve metilasyon derecelerinin belirlenmesi	58
3.5. Kitosan ve Türevlerinin Çözünürlüklerinin Belirlenmesi	59

3.6. <i>İn silico</i> Etkinlik Tayini	59
3.6.1. Moleküler modelleme çalışmaları	59
3.6.1.1. P2Y ₁₂ reseptörü (P2Y ₁₂ R) doking çalışmaları	60
3.6.1.2. Glikoprotein IIb/IIIa doking çalışmaları	61
3.6.1.3. Fibrinojen doking çalışması	62
3.6.2. Moleküler dinamik çalışmaları	63
3.7. Jelleştirme	65
3.8. <i>İn vitro</i> Etkinlik Tayini	66
3.9. Antimikrobiyal Etkinlik Tayini	66
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	68
4.1. Kitosanın Saflaştırılması	68
4.2. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi	69
4.3. Protonlanmış Kitosan Türevlerinin Protonasyon Derecelerinin Belirlenmesi	69
4.4. Kitosanın Trimetilasyonu	71
4.5. Kitosan ve Türevlerinin Çözünürlükleri	74
4.6. <i>İn silico</i> Etkinlik Tayini	75
4.6.1. Moleküler modelleme çalışmaları	75
4.6.1.1. P2Y ₁₂ reseptörü (P2Y ₁₂ R) doking çalışmaları	75
4.6.1.2. Glikoprotein IIb/IIIa reseptörü doking çalışmaları	78
4.6.1.3. Fibrinojen doking çalışması	81
4.6.2. Moleküler dinamik çalışmaları	83
4.7. <i>İn vitro</i> Etkinlik Tayini	85
4.8. Antimikrobiyal Etkinlik Tayini	87
5. YORUM	90
KAYNAKLAR	92
EKLER	106
Ek 1. Hesaplamalar	106
A. DP Değerlerinin Hesaplanması	106
B. KH ve KS'nin DD'lerinin Hesaplanması	107
C. Protonlanmış Kitosanların PD'lerinin pH Verisi Kullanılarak Hesaplanması	108
D. TMKb'nin Asetilasyon ve Trimetilasyon Derecelerinin Hesaplanması	117
E. Sentez-3'ün içerdiği Kitosan Ana Zincirinin Derişiminin Hesaplanması	118

Ek 2. ¹ H NMR Spektrumları	119
A. Kitosan Numunelerinin ¹ H NMR Spektrumları	119
B. TMK'nın 2D COSY, ¹ H- ¹³ C HSQC ve ¹ H- ¹³ C HMBC Spektrumları	120
C. TMK ve TMKb Numunelerinin ¹ H NMR Spektrumları	121
Ek 3. Molekül Ağırlıkları	123
Ek 4. Bileşikler ve DPPC Arasındaki İyonik/Elektrostatik Etkileşimlerin Grafikselsel Olarak Gösterimi	125
Ek 5. İstatistiksel Analiz	127
Ek 6. <i>In vitro</i> Etkinlik Testi Etik Kurul Belgesi	128
ORJİNALLİK RAPORU	130
ÖZGEÇMİŞ	131

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Vücuttaki trombojenik ve antitrombojenik bileşenler (Palta, Saroa ve Palta, 2014)	10
Çizelge 2.2. Hipoterminin etkileri (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000)	22
Çizelge 2.3. Biyopolimerlerin (selüloz, kitin ve türevleri) yapıları ve radikal çapraz- bağlama sırasındaki olası makroradikalleri (Shen ve ark., 2016)	48
Çizelge 3.1. Kitosan numunelerinin asetilasyon derecelerinin hesaplanmasında kullanılan sinyal bölgelerinin atamaları	52
Çizelge 3.2. Metillenmiş kitosan türevlerinin asetilasyon ve metilasyon derecelerinin hesaplanmasında kullanılan sinyal bölgelerinin atamaları	58
Çizelge 4.1. Kitosan numunelerinin M_w , DP_w ve $\overline{DP_w}$ değerleri	69
Çizelge 4.2. % T_{500} değerleri	74
Çizelge 4.3. Fibrinojen ve kitosan arasındaki doking enerjileri	82
Çizelge 4.4. Örneklerin antimikrobiyal etkinlik sonuçları	88
Çizelge 4.5. Tez çalışması kapsamında değerlendirilen materyallere ait veriler	89

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Protrombinin trombine çevrilmesi ve fibrinojenin fibrin iplikçiklerini oluşturmak üzere polimerizasyonu (Guyton ve Hall, 1996)	12
Şekil 2.2. Pıhtılaşma mekanizmasını başlatan ekstresek yol (Guyton ve Hall, 1996)	15
Şekil 2.3. Pıhtılaşma mekanizmasını başlatan intrinsek yol (Guyton ve Hall, 1996)	16
Şekil 2.4. Güncel pıhtılaşma konsepti (başlangıç fazı) (Palta, Saroa ve Palta, 2014)	18
Şekil 2.5. Güncel pıhtılaşma konsepti (propagasyon fazı) (Palta, Saroa ve Palta, 2014)	19
Şekil 2.6. “Ölümcül üçlü” kısır döngüsü (Blackbourne, 2008)	22
Şekil 2.7. Beta-poli- <i>N</i> -asetil glukozaminin sekonder kimyasal yapısı (Vournakis ve ark., 2004)	25
Şekil 2.8. Kitinin sekonder kimyasal yapısı. Kitin, $m > \%50$ değeri ile kopolimer yapısındadır (Whang ve ark., 2005)	35
Şekil 2.9. Kitosanın sekonder kimyasal yapısı. Kitosan, $n > \%50$ değeri ile kopolimer yapısındadır (Whang ve ark., 2005)	40
Şekil 2.10. Karbodiimid-aracılı çapraz-bağlama (Shen ve ark., 2016)	47
Şekil 3.1. Zinc veritabanından elde edilen ve PDB biçimine dönüştürülen ADP ve Kitosan ligandlarının yapıları	61
Şekil 3.2. Zinc veritabanından elde edilen ve PDB biçimine dönüştürülen İntegrilin, Tirofiban, RUC-2 ve Kitosan ligandlarının ve yapıları	62
Şekil 3.3. Reseptörün aktif yöresinde bulunan kalsiyum ve magnezyum iyonlarının MIDAS, ADMIDAS ve SyMBS konumları, Arg-Gly-Asp tripeptid dizisinden GpIIb/IIIa reseptöründe doking gridleri oluşturulması	63
Şekil 3.4. Fibrinojenin yapısı ve kör doking metodu kullanarak oluşturulan doking gridleri	64
Şekil 3.5. DPPC molekülünün yapısı (Yuan, Jameson ve Murad, 2009)	65
Şekil 3.6. Kitosan ve DPPC membranı simulasyon sistemi	65
Şekil 4.1. KH ve KS'nin FT-IR analizleri	69
Şekil 4.2. ADP ve P2Y ₁₂ reseptörü arasındaki doking sonucu	78

Şekil 4.3. Kitosan ve P2Y ₁₂ reseptörü arasındaki doking sonucu	79
Şekil 4.4. İntegrilin ve GPIIb-IIIa reseptörü arasındaki doking sonucu	80
Şekil 4.5. Tirofiban ve GPIIb-IIIa reseptörü arasındaki doking sonucu	80
Şekil 4.6. RUC2 ve GPIIb-IIIa reseptörü arasındaki doking sonucu	81
Şekil 4.7. Kitosan ve GPIIb-IIIa reseptörü arasındaki doking sonucu	81
Şekil 4.8. Fibrinojen ve kitosan arasındaki doking	82
Şekil 4.9. Kitosan ve fibrinojen arasındaki doking sonucu	83
Şekil 4.10. Yüklü kitosan ve DPPC membranı arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşim	86
Şekil 4.11. Numunelerin boş gruba göre WHBCT'lerindeki yüzdesel değişim	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
%T	Yüzde transmitans
cps	Santipoiz
Da	Dalton
kDa	Kilo dalton
cfu	Koloni oluşturan birim

Kısaltmalar

[Amim]Br	1-alil-3-metilimidazyolum bromür
[C ₂ mim][OAc]	1-etil-3-metilimidazyolum asetat
[C ₄ mim]Cl	1-bütül-3-metilimidazyolum klorür
[C ₄ mim][OAc]	1-bütül-3-metilimidazyolum asetat
α -XI-2	Anti-XIa antikoru
β -TG	β -tromboglobülin
ADP	Adenozin difosfat
ANGII	Anjiyotensin II
AP-1	Aktivatör protein 1
APTT	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır Serum Albümini
BTCA	1,2,3,4-bütantetrakarboksilik dianhidrit
CA	Sitrik asit
COSY	Korelasyon Spektroskopisi

CTI	Mısır Tripsin İnhibitörü
DD	Deasetilasyon derecesi
DES	Derin Ötektik Çözücüler
DIC	Yayılmış intravasküler koagülasyon
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilkolin
DPw	Kütlece ortalama polimerizasyon derecesi
DVS	Divinil sülfon
ECH	Epiklorohidrin
EGDE	Etilen glikol diglisidil eter
EIA	Enzim İmmonoassay
ET	Endotelin
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
F	Kan pıhtılaşma faktörleri
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Fluoresin izotiyosiyanat
FXaz	Tenaz kompleksi
HMBC	Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu
HSQC	Heteronükleer Tek Kuantum Korelasyonu
HTAAC	N-(2-hidroksi)propil-3-trimetil amonyum kitosan klorür
IL	İyonik Sıvı
KH	Ham kitosan
KS	Saflaştırılmış kitosan
K-Ac	Kitosan asetat türevi
K-Ci	Kitosan sitrat türevi
LGA	Genetik Algoritma

MD	Moleküler dinamik
MIDAS	Metal İyon Bağımlı Yapışma Bölgesi
Mn	Sayıcı ortalama mol kütlesi
mp	Erime noktası
MSA	Metansülfonik asit
Mw	Kütlece ortalama mol kütlesi
MA	Molekül ağırlığı
NOCC	N,O-karboksimetil kitosan
OC	Oligokitosan
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCI	Protrombin tüketim indeksi
PD	Protonasyon Derecesi
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PET	Polietilen tereftalat
PF	Trombosit faktörü
pGlcNAc	poli-N-Asetil Glukozamin
PNAC	Kısmen <i>N</i> -asetillenmiş kitosan
PPP	Trombositten Fakir Plazma
PreproET-1	Pre-proendotelin-1
PRP	Trombositten Zengin Plazma
PRT	Plazma rekalsifikasyon zamanı
PT	Protrombin zamanı
PTT	Parsiyel tromboplastin zamanı
PVA	Polivinil alkol
PVP	Poli-N-vinilpirolidon

R-zamanı	Fibrin pıhtısı zamanı
SA	Süksinik anhidrit
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektrofrez
SEC	Size Exclusion Chromatography
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SloNMR	Slovenya Ulusal Kimya Enstitüsü NMR Merkezi
TAFI	Trombince aktive edilebilir fibrinoliz inhibitörünü
Tf	Rekombinant doku faktörü
TF	Doku faktörü
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TMK	N,N,N-trimetil kitosan
TPP	Tripolifosfat
TT	Trombin zamanı
TxA2	Tromboksan A2
TxB2	Tromboksan B2
UNAM	Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi
vWF	Von Willebrand faktörü
WHBCT	Tam kan pıhtılaşma zamanı
YMA	Yüksek molekül ağırlıklı

1. GİRİŞ

Yara; cerrahi işlemler, dış aşındırma veya istemsiz bir aktivite nedeniyle ciltte oluşan bir hasar ya da kopmadır. Yaralar genellikle doku kaybı olmayan yaralar (örn., cerrahide) ve yanık yaraları, travma, aşınma veya kronik rahatsızlıklarda ikincil olaylar sonucu ortaya çıkan (örn., venöz yetmezlik, diyabetik ülserler veya bası yaraları, deri grefti verici bölgeleri ve deri düzeltimleri gibi iyatrojenik yaralar) doku kaybı olan yaralar olarak sınıflandırılır. Yaralar ayrıca müdahil olan katmanlara göre sınıflandırılır: Yüzeysel yaralar sadece epidermisi içerir, kısmi kalınlıkta yaralar epidermisle birlikte dermisi içerir, tam kalınlıkta yaralar ise ek olarak subkütanöz yağ veya daha derindeki dokuları içerir. (Paul ve ark., 2014)

Kısmi ve tam kalınlıkta yaralara eşlik eden ve kontrol edilemeyen kanamalar, genç erişkinler, örneğin, kaza geçiren sivil mağdurlar arasındaki önde gelen ölüm nedeni olmanın yanında, savaş alanlarındaki ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumludur (Macfarlane, 1964; Owen, 2001; Champion ve ark., 2003; Pusateri, Modrow ve Harris, 2003; Alam ve ark., 2005; Burnett ve ark., 2014; Khoshmohabat ve ark., 2016). Öyle ki, kontrol edilemeyen kanamalar, ABD (Amerika Birleşik Devletleri)'ndeki muharip ölümlerin neredeyse %50'sinin ve sivil travma ölümlerinin %80'inin nedenidir (Sauaia ve ark., 1995; Carey, 1996). Bu ölümlerin yaklaşık yarısı hastane öncesi dönemde meydana gelir (Khoshmohabat ve ark., 2016). Kanama, tüm dünyada ameliyathanedeki bir numaralı ölüm sebebidir (Irita, 2011). Bu nedenle, söz konusu yaralanmalar sonucu oluşan kanamayı durdurabilen topikal hemostatik pansuman malzemeleri hem siviller, hem de askeri personel için acil bir ihtiyaçtır.

İdeal bir hemostatik ajan, sadece arter ve venlerden kaynaklanan aktif kanamayı durdurmakla kalmamalı, aynı zamanda iyi bir biyolojik uyumluluk, kalıcı etki ve uzun raf ömrü sergilemeli, risksiz, hafif ve ucuz olmalı (Jayakumar ve ark., 2007; Azuma ve ark., 2015), kullanımdan önce karıştırma veya hazırlama gerektirmemelidir (Granville-Chapman ve ark., 2011).

Fibrin tabanlı hemostatik doku yapıştırıcılar ilk olarak 1940'larda geliştirilmiş ve oldukça etkili oldukları kanıtlanmıştır (Larson ve ark., 1995; Reiss ve Oz, 1996; Whang ve ark., 2005). Örneğin, bir form, katı sargı malzemesinin üzerine uygulanmış insan fibrinojen ve

trombininin kuru toz karışımını içerir. Böyle bir bandaj, kanayan bir yara üzerine sıkıca bastırıldığında, hızlı bir şekilde güçlü bir fibrin mühür oluşur ve kanama durdurulur (Larson ve ark., 1995). Ancak, düşük arzlı insan fibrinojen ve trombininin pahalı moleküller olmasından dolayı fibrin bandajlarının travma tıbbındaki pratik uygulanabilirliği sınırlıdır (Reiss ve Oz, 1996; Whang ve ark., 2005).

Günümüzde de yaygın olarak kullanılan toz ve tabaka formlarındaki mikrolif kolajen hemostatik toz Avitene™ (Davol Inc., Warwick, RI, ABD) 1967'de geliştirilmiştir (Battista, Erdi ve Ferraro, 1967). Düşük doku yapışkanlığına sahip olmasından ve kanamayı durdurmak için sadece trombositlerin aktive edilmesine dayandığından, kolajenin hemostatik etkinliği sınırlıdır (Kunio ve ark., 2013). Ayrıca, kanamanın durdurulmasında hayvansal kaynaklı materyallerin kullanımını içeren yaklaşımlar kaçınılmaz olarak alerjik reaksiyon (Kitamura ve ark., 1995) ve enfeksiyon risklerini beraberinde getirmektedir. Ucuz sterilizasyon metotlarından ısı sterilizasyonunun, protein içeriği denatüre edebilmesinden dolayı, biyolojik materyaller üzerinde kullanımı sınırlıdır. Söz konusu sınırlama, üretim maliyetini arttıran diğer faktör olarak değerlendirilebilir.

Kanama durdurma teknolojisinin gelişim süreci içerisinde, diğer kolajen bazlı ürünlerin yanı sıra, trombinle zenginleştirilmiş fibrin köpüğü, jelatin sünger, oksitlenmiş selüloz, fibrin tutkalı ve izobütül 2-siyanoakrilat tutkalı gibi diğer hemostatik ajan türleri geliştirilip kullanılmıştır (Raccuia ve ark., 1992).

Nano-fibröz yapıda bir ağın içine yerleştirilen sentetik bir peptidin (Ellis-Behnke ve ark., 2006a), doğal pıhtılaşma kaskatından bağımsız olarak hemostaz elde etmek için kullanıldığı özgün yaklaşım, Ellis-Behnke ve ark. (2006b) tarafından ortaya konulmuştur. Bu yöntem ümit verici olmakla birlikte, kullanılan peptidlerin sentezlenmesinin pahalı ve zor olması, söz konusu teknolojinin pratik kullanımını sınırlandırmaktadır. Benzer hemostatlarla ilgili dikkate alınması gereken ek bir faktör de yaralanma bölgesinin periferindeki vücut bölgelerinde gelişebilen istenmeyen jelleşme veya pıhtılaşma, diğer bir deyişle embolizasyon riskidir (Lew ve Weaver, 2008; Kheirabadi ve ark., 2009).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, ince granüler kalsiyum zeolitinin, kanla temas sonrasında pıhtılaşma süresini büyük ölçüde kısaltabileceği gösterilmiştir (Li ve ark., 2014). Bununla birlikte, zeolit hemostaz sargısı, 100°C'ye varan sıcaklıklardaki ekzotermik reaksiyona neden olur, bu da doku hasarına yol açar (McManus ve ark., 2007;

Gerlach ve ark., 2010). Söz konusu ürün, QuikClot™ (Z-Medica LLC, Wallingford, CT, ABD), ciddi karaciğer travması kanamasını durdurmak için kullanıldığında meydana gelen ekzotermik reaksiyon, hemostazın tamamlanmasından sonra lokal karaciğer dokusunda yanmaya neden olmuştur (McManus ve ark., 2007). Zeolit ayrıca şiddetli yangı reaksiyonlarına da neden olabilir ve dokudaki artık madde apse oluşumuna yol açabilir (Wright ve ark., 2004); bu nedenle söz konusu kalıntının hemostazın tamamlanmasından hemen sonra yaradan çıkartılması gerekir, bu durum da ikincil kanamaya yol açabilir (Lingmei ve ark., 2016).

Doğal kaynaklardan, genellikle kabukluların dış kabuklarından ve fungus misellerinden elde edilen glikozaminoglikanların biyomedikal kullanımı, Youngken (1969)'un raporlarından bu yana araştırılmaktadır. Daha sonra, Whistler ve Kosik (1971) pıhtılaşma tedavisinde polisakkarit kullanımını önermiş, Herrmann ve Woodward (1972) ise yara iyileşmesi için glukozamin içeren polimerleri kullanmıştır. Domuz modeli üzerinde yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere; heparinize edilmemiş hayvanlarda, membran formundaki poli-N-asetil glukozamin (p-GlcNAc), fibrin yapıştırıcı Bolheal® (KMB Co. Ltd., Japonya)'dan, absorblanabilen kolajen Actifoam™ (Davol Inc., Warwick, RI, ABD)'den veya oksitlenmiş rejenere selüloz Surgicel® (Ethicon LLC, CA, ABD) 'den daha etkili bir topikal hemostatik maddedir (Cole ve ark., 1999; Chan ve ark., 2000). Kullanımı invazif bir prosedürü gerektirmediğinden mekanik damar kapama cihazlarının kullanımıyla ilintili yan etkileri bertaraf eden, hemostatik özellikteki yüksek molekül ağırlıklı (YMA) p-GlcNAc içeren yama Syvek® (Marine Polymer Technologies Inc., Burlington, MA, ABD) 1999'da geliştirilmiştir. Söz konusu yama, kateter çıkartıldıktan sonra dış yara bölgesine topikal olarak uygulanır (Hirsch ve ark., 2003).

Beschitin® (Unitika Ltd., Japonya) ve Chitipack® (Eisai Co., Ltd., Japonya) gibi çeşitli kitin bazlı yamalar günümüzde ticari olarak temin edilebilir. Erken granülasyonu uyarma ve skar dokusunun oluşumunu önleme kabiliyetine sahip olan söz konusu ürünler, esas olarak travmatik yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (Szymonowicz ve ark., 2017). Kitin içeren diğer bir ürün olan Excel Arrest® (LLC Haemostasis Co., Saint Paul, MN, ABD) ise cerrahi yaralar (ameliyat sonrası, donör bölgeler, dermatolojik), kesikler ve laserasyonlar gibi orta ve ciddi kanamalı yaraların geçici tedavisi için topikal bir pansuman malzemesi olarak kullanılmaktadır. Ped formundaki söz konusu ürün ayrıca,

derideki perkütanöz iğne girişi, vasküler giriş ve perkütan kateter giriş yerlerindeki kanamanın kontrolü için kullanılabilir.

Kitosan, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından 2001’de “Genellikle Güvenilir Kabul Edilen” madde olarak onaylanmıştır (Kong ve ark., 2010). FDA-onaylı kitosan bazlı hemostatik ürünlerden Celox® (MedTrade Products Ltd., Cheshire, BK), TraumaStat® (Ore-Medix, LLC Company, Lebanon, OR, ABD) ve HemCon® sargı (Tricol Biomedical Inc., Portland, OR, ABD) ticari olarak temin edilebilir. İlginç bir şekilde, doğal kitosan katyonik ve antimikrobiyal doğası nedeniyle hemostatik bir malzeme olarak değerlendirilmekte (Malette ve ark., 1983; Rao ve Sharma, 1997; Abhay, 1998; Whang ve ark., 2005), ancak ciddi yaralar söz konusu olduğunda bu polimerin hemostatik etkinliği sorgulanmaktadır (Kheirabadi ve ark., 2005). Bir zamanlar çığır açan teknolojiler olarak övülen kitosan içerikli hemostatik bandajlar, çelişen sonuçlardan dolayı, etkisiz olarak damgalanmış ve kullanımlarından büyük ölçüde vazgeçilmiştir (Paul ve ark., 2014).

Kitosanın polikatyonik özelliğinin ve hücre zarlarına spesifik olmayan bağlanmasının hemostatik özelliğiyle ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Olsen ve ark., 1989). Söz konusu polimerin polikatyonik türevleri kanla temas ettiğinde, vücudun doğal pıhtılaşma kaskatından bağımsız olarak, trombositler ve eritrositlerle etkileşime girebilmektedir. Koagülasyon ve hemaglutinasyon testleri, kitosanın hemostatik mekanizmasının özellikle eritrositlerin hücre zarı ile kitosan arasındaki bir etkileşimden kaynaklandığına işaret etmektedir (Rao ve Sharma, 1997). Eritrosit membranındaki glikoprotein yapıdaki integral proteinlerin içerdikleri karbohidrat zincirlerinin sonundaki şeker rezidüsü olan sialik asidin karboksil gruplarının net negatif yük taşıması (Karp, 2010), söz konusu etkileşimin elektrostatik karakterde olduğunu düşündürmektedir.

Kitosan, 2. karbonundaki amino grubunun yaklaşık 6,5 olan intrinsek pKa’sı ile zayıf baz özelliğindedir (Kost, 1999; Taleb, 2008). Bu özelliği kitosanın asidik ve nötral çözeltilerinde protonlanmasına neden olmaktadır. Söz konusu polimerin yük yoğunluğu, çözeltilinin pH’sına ve kitosanın sahip olduğu serbest amino gruplarının miktarını belirleyen deasetilasyon derecesi (DD)’ye bağlıdır. Bu çalışmada, kullanılan YMA ham kitosan (KH) numunesi saflaştırıldıktan sonra, DD’si spektroskopik yöntemle belirlenmiştir. Saflaştırılmış kitosan (KS) asetik asit ve sitrik asit kullanılarak protonlanmıştır.

Ek olarak, çalışmada kullanılmak üzere polikationik karakteri pH bağımlı olmayan N,N,N Trimetil Kitosan (TMK) türevi sentezlenmiştir. Kitosanın primer amino grubunun intrinsek pKa değerinden kaynaklanan kandaki deprotonasyon eğiliminin bertaraf edilmesinin, molekülün sırasıyla kan ve mikroorganizmalarla etkileşiminden köken alan, hemostatik ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasının temel amacı, yapıları gereği hemostat aktif olabileceği öngörülen kitosan türevlerinin sünger ve jel formlarının sentezlenerek, bu türevlerin hemostatik ve antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesidir. Çalışma kapsamında kullanılan KH polimerinin ve türevlerinin ayrıntılı yapısal analizleri, spektroskopik ve kromatografik yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

1. GENEL BİLGİ

2.1. Hemostaz ve Kan Pıhtılaşması

2.1.1. Hemostazdaki Olaylar

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi anlamına gelir. Bir damar zedelendiğinde ya da yırtıldığında çeşitli mekanizmalarla hemostaz sağlanır. Bu mekanizmalar: (1) Damar spazmı (vazokonstriksiyon), (2) Trombosit tıkaçı oluşumu (primer hemostaz), (3) Kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısı oluşumu (sekonder hemostaz), (4) Fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki deliğin kalıcı olarak kapatılmasıdır (Guyton ve Hall, 1996; Heemskerk ve ark., 2002; Thornton ve Douglas, 2010).

2.1.1.1. Damar Spazmı (Vazokonstriksiyon)

Damar duvarını örten endotelial hücreler; negatif yüklü heparin-benzeri glikozaminoglikanlar, nötr fosfolipitler, trombosit inhibitörlerinin sentezi ve sekresyonu, koagülasyon inhibitörleri ve fibrinoliz aktivatörleri gibi çoklu faktörlere bağlı olarak antitrombotik özellikler gösterir. Bunun aksine, subendotelial tabaka trombojeniktir; kolajen, vWF (Von Willebrand faktörü) ve trombosit yapışmada rol oynayan laminin, trombospondin ve vitronektin gibi proteinleri içerir. Kan damarı zedelendikten sonra, travmanın damar üzerine etkisiyle damar duvarı kasılır; bu derhal hasarlanan damardan kan kaybının azalmasına neden olur. Kasılma; sinirsel refleksler, lokal miyojenik spazm ve hasarlanan dokulardan salınan lokal humoral düzenleyiciler sonucu gelişir. Vazokonstriksiyonun büyük kısmından, damar duvarına doğrudan hasarla başlayan lokal miyojenik kasılmalar sorumludur. Daha küçük damarlardaki vazokonstriksiyonda esas olarak, vazokonstriktör bir madde olan tromboksan A₂ (TxA₂)'yi salan trombositler etkilidir. Ayrıca ağırlıklı olarak, endotel hücrelerinden salınan peptid yapıdaki endotelin (ET) adı verilen faktörler, vasküler düz kas hücrelerinde bulunan G-protein-bağlı reseptörler olan ET reseptörlerine bağlanarak, intraselüler serbest kalsiyumun yükseltilmesi yoluyla vazokonstriktif etkiyi artırır. Lokal damar spazmı dakikalar ve hatta saatlerce sürebilir. Bu süre içinde trombosit tıkaçı oluşumu ve kan pıhtılaşması gelişir (Guyton ve Hall, 1996; Cines ve ark., 1998; Triplett, 2000; Davenport, 2002; Ikeda ve ark., 2002; Lasne, Jude ve Susen, 2006; Davenport ve ark., 2016).

2.1.1.1.1. Endotelinler ve Reseptörleri

ET'ler, yapısal olarak benzer 21 amino asitli üç peptidi içerir. ET-1 ve ET-2, iki G-protein bağlı reseptör ET_A ve ET_B'yi eşit afinite ile aktive ederken, ET-3'ün ET_A alt tipi için daha

düşük bir afinitesi vardır. Bu peptidleri kodlayan genler sadece omurgalılarda mevcuttur. Söz konusu ligand-reseptör sinyal yolu bir omurgalı inovasyonudur ve oldukça uzun süreli etki gösteren ET-1'in insan kardiyovasküler sistemindeki en güçlü vazokonstrüktör olarak evrimini yansıtır (Davenport ve ark., 2016). ET-1, büyük nakil arterleri, dirençli arterler (kan basıncının korunmasına katkıda bulunan), büyük venler ve venüller gibi tüm damar tiplerinin endotelial hücrelerde tespit edilmiştir. ET-1'in muhtemelen vücuttaki her organda perfüzyonun kontrol edilmesinde rol oynamaktadır (Davenport ve ark., 2016). ET-1, endotelial hücrelerden sürekli olarak sentezlenerek serbest bırakılır ve ET-1'in öncüsü olan pre-proendotelin-1 (preproET-1)'in seviyesi, ağırlıklı olarak transkripsiyon seviyesinde modüle edilir. Hem fiziksel hem de kimyasal uyarılar, fizyolojik ve patofizyolojik şartlarda [örneğin, akış gerilimi, hipoksi, trombin, serbest radikaller, büyüme faktörleri, epinefrin, sitokinler ve anjiyotensin II (ANGII) gibi vazoaktif faktörler] preproET-1 mRNA seviyelerindeki değişikliklere katkıda bulunurlar (Marasciulo ve ark., 2006; Stow ve ark., 2011). Endotel hücrelerindeki ET-1 üretiminin en önemli düzenleyicilerinden biri, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β 'dir (Davenport ve ark., 2016). Kültürdeki sığır aortik endotelial hücrelerinde, aktivin reseptör-benzeri kinaz 5 (ALK5)/Smad 3 yolu üzerinden TGF- β sinyalinin, aktivatör protein 1 (AP-1) bölgesi ve/veya smad bağlama elemanı yoluyla preproET-1'de bir artışa neden olarak, olgun bir hücre fenotipi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Castañares ve ark., 2007).

ET-1, gelen dış uyarılara yanıt olarak regüle edilmiş yolak üzerinden endotelial hücrelere özgü Weibel-Palade cisimlerinden salınır. İnsan vaskülatüründe, ET-1, endotelial hücrelerden ablüminal olarak salınır, temel olarak bu hücrelerin altında bulunan düz kasın üzerindeki ET_A reseptörleri ile etkileşir, küçük bir ET_B reseptörü popülasyonu da, tümünde olmamakla birlikte bazı damarlarda daralmaya aracılık eder. İnsan aortasını çevreleyen düz kas tabakasında, ET_A reseptörlerin %90'ından fazlasını oluşturmasına rağmen her iki reseptör alt tipi de ifade edilir. ET-1/ET_A kompleksi, reseptörün hücre yüzeyine geri dönüşümünden önce endozom içine alınır ve ET_A antagonistinin ET-1 tepkisini tersine çevirebileceği bir mekanizma sağlar. ET-1/ET_B kompleksi hücre içine alınır ve lizozoma ayrıştırılır; sonuç olarak, ET_B antagonistleri reseptöre bağlı ligandın yerine geçemez (Bax ve ark., 1993; Davenport ve ark., 2016).

2.1.1.2. Trombosit Tıkacı Oluşumu (Primer Hemostaz)

Nükleusları olmamasına ve çoğalmamalarına karşın trombositler, hücrenin birçok fonksiyonel karakteristiğini taşırlar. Trombositlerin sitoplazmalarında çeşitli aktif faktörler vardır. Bunlar:

(1) Trombositlerin kasılmasını sağlayan ve kas hücrelerindeki benzeyen aktin ve miyozin molekülleri ile diğer bir kontraktıl protein olan trombostenin; (2) Çeşitli enzimleri sentezleyen ve çok miktarda kalsiyum iyonunu depolayan endoplazmik retikulum ve Golgi aparatının kalıntıları; (3) Mitokondri, ATP (Adenozin trifosfat) ve ADP (Adenozin difosfat) oluşturabilen enzim sistemleri; (4) Bir çok damarsal ve diğer lokal doku reaksiyonunu sağlayan prostoglandinleri sentezleyen enzim sistemleri; (5) Fibrin stabilize edici faktör; (6) Damar endotel hücrelerinin, damar düz kas hücrelerinin ve fibroblastların çoğalma ve büyümelerini ve böylece hasarlı damar duvarlarının tamiri için gerekli hücrel büyüme sağlayan trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) (Guyton ve Hall, 1996; Palta, Saroa ve Palta, 2014).

Başlangıçta zayıf olan trombosit tıkaçı, damar yırtığı küçükse kan kaybını önlemede başarılıdır. Fakat delik büyükse, pıhtılaşma sürecinin sonraki aşamalarında fibrin iplikler oluşarak trombositlere bağlanır ve böylece sıkı ve dayanıklı bir tıkaç oluşur; kanamayı durdurmak için trombosit tıkaçına ek olarak kan pıhtılaşması meydana gelir (Guyton ve Hall, 1996). Trombosit tıkaçının oluşumu bir dizi adım içerir:

(1) Trombosit adezyonu: Yüzeylerini kaplayan glikoprotein örtüsü, trombositlerin normal endotele yapışmasını önler. Söz konusu glikoprotein örtü, damar yaralanmasını takiben, trombositlerin özellikle zedelenen endotel hücrelerine, hatta damar çeperinde daha derinlerde açığa çıkan kolajene yapışmalarını sağlar. vWf söz konusu adezyon sürecinde, endotel kolajen ve trombosit yüzey reseptörlerinden glikoprotein kompleksi GpIb (CD42) arasında bir köprü görevi görür. GPIb, vWF için temel reseptördür. (Guyton ve Hall, 1996; Heemskerk ve ark., 2002; Palta, Saroa ve Palta, 2014; Paul ve ark., 2014).

(2) Trombosit sekresyonu: Trombositlerin karakteristikleri, adezyondan sonra açık bir şekilde değişir. Düzensiz bir şekil alarak, yüzeylerinden sayısız psödopod uzatırlar ve bu şekilde yüzey alanlarını büyük ölçüde artırırlar. Böylece oldukça adeziv bir duruma gelerek kolajene daha fazla yapışırlar. Daha sonra, kontraktıl proteinlerini güçlü bir şekilde kasarak β -TG (β -tromboglobülin), PF (trombosit faktörü)-IV ve kalsiyum gibi çok sayıda

aktif faktörü içeren granüllerin salınmasını sağlarlar (degranülasyon). Kalsiyum, trombosit aktivasyonunda sekonder olarak ortaya çıkan fosfolipidlere (örn., fosfatidilserin) bağlanır ve çeşitli koagülasyon faktörlerinin birleştirilmesi için bir yüzey sağlar (Guyton ve Hall, 1996; Andrews ve Berndt, 2004; Palta, Saroa ve Palta, 2014).

(3) Trombosit agregasyonu: Aktifleştirilmiş trombositler tarafından üretilen TxA₂, daha fazla trombosit agregasyonu için uyaran sağlar. TxA₂, ADP ile birlikte, bu trombosit agregatını, vasküler hasarı geçici olarak kapatan trombosit tıkaçının oluşumuna yol açacak şekilde genişletir. ADP bağlanması ayrıca, vWF için fizyolojik bir reseptör olarak görev yapan glikoprotein kompleksi GpIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_{3a}$) reseptörlerinde konformasyonel bir değişikliğe yol açarak, fibrinojenin birikmesine neden olur (Guyton ve Hall, 1996; Heemskerk ve ark., 2002; Palta, Saroa ve Palta, 2014; Periyah ve ark., 2014).

P2Y purinerjik G-protein-bağlı reseptör ailesinin üyesi P2Y₁₂R, ADP ile uyarılmak suretiyle, trombosit agregasyonu ve granül salımında temel bir rol oynayarak pıhtı oluşumunu destekler (Nylander ve ark., 2004).

Trombosit tıkaç mekanizması, gün içinde yüzlercesi görülen çok küçük damarlardaki ve endotel hücrelerindeki yırtıkların kapatılması için son derece önemlidir. Trombositler, söz konusu durumlarda, endotel hücreleriyle kaynaşarak bir endotel hücre membranı oluşmasını sağlarlar. Trombosit sayısı çok az olan kişilerde, derialtı ve tüm internal dokularda normal kişilerde izlenmeyen yüzlerce küçük hemorojik odak gelişir (Guyton ve Hall, 1996).

Prostasiklin, trombosit agregasyonunu inhibe eder. TxA₂ ile prostasiklin arasındaki denge, sınırlandırılmış trombosit agregasyonuna yol açar ve böylece pıhtının genişlemesi önlenerek damar lümeni açıklığı korunur (Ashby, Daniel ve Smith, 1990; Cines ve ark., 1998).

2.1.1.3. Kan Pıhtısı Oluşumu (Sekonder Hemostaz)

Hemostazın üçüncü aşaması kan pıhtısı oluşumdur. Kan ve dokularda kan pıhtılaşmasını etkileyen 50'den fazla önemli madde bulunmuştur. Bunlardan pıhtılaşmayı sağlayanlara (trombojenik) prokoagülan, pıhtılaşmayı inhibe edenlere (antitrombojenik) ise antikoagülan denmektedir. Kanın pıhtılaşması veya pıhtılaşmaması, bu iki grup madde arasındaki dengeye bağlıdır. Normalde antikoagülanlar baskındır ve kan pıhtılaşmaz; ama bir damar zedelendiğinde, hasarlanan alandaki prokoagülanlar aktive olarak

antikoagülanlara baskın hale gelirler ve pıhtı oluşur. Vücuttaki doğal trombojenik ve antitrombojenik bileşenlerin bazıları Çizelge 2.1 'da listelenmiştir (Guyton ve Hall, 1996; Palta, Saroa ve Palta, 2014).

Çizelge 2.1. Vücuttaki trombojenik ve antitrombojenik bileşenler (Palta, Saroa ve Palta, 2014)

Bölge	Trombojenik	Antitrombojenik
Damar duvarı	Maruz kalan endotel *TF (FIII) Kolajen	Heparin Trombomodülin Doku plazminojen aktivatörü
Dolaşım elemanları	Trombositler Trombosit aktive edici faktör Pıhtılaşma faktörleri Protrombin Fibrinojen **vWF	Antitrombin Protein C ve S Plazminojen

* TF, Doku faktörü; ** vWF, Von Willebrand faktörü

vWF, kan plazmasında bulunan, endotel, megakaryositler ve subendotelial bağ dokusunda ultra-büyük vWf olarak sürekli üretilen bir glikoproteindir. Subendotel yüzeyine trombosit yapışmasına aracılık eder. Aynı zamanda, Faktör VIII'in pıhtılaştırıcı aktivitesi için bir taşıyıcı protein olarak görev yapar ve orada VIII: C olarak adlandırılır (Sadler, 1998; Barash, Cullen ve Stoelting, 2006). Fibrinojen, karaciğer tarafından üretilen temel koagülasyon proteindir ve pıhtının kuvvetini belirleyen fibrinin öncüsüdür (Doolittle, Spraggon ve Everse, 1998; Kamath ve Lip, 2003).

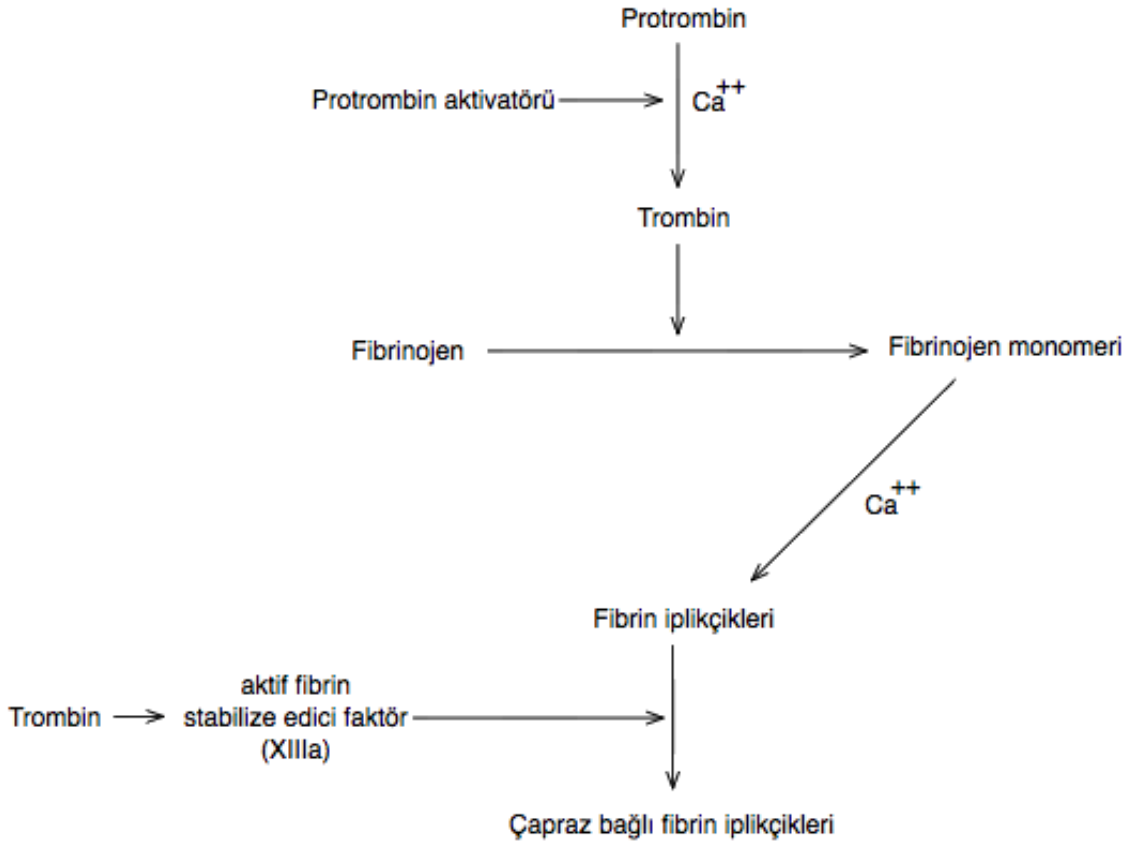
TF, subendotelial dokuda ve fibroblastlarda bulunan, damar duvarının bozulmasına kadar kanla temas etmeyen membrana bağlı prokoagülan bir glikoproteindir (Monroe, Hoffman ve Roberts, 2010). *İn vivo*'da pıhtılaşmanın birincil başlatıcısıdır. TF, ağırlıklı olarak kan damarlarının tunika medya ve tunika adventisiasında, az bir miktarda ise dolaşan TF'ler şeklinde monositler üzerinde bulunur. TF, fiziksel yaralanma (damar duvarı TF'nin aktivasyonu), doğrudan vasküler yaralanma veya fonksiyonel yaralanma (dolaşımdaki TF'nin aktivasyonu), hipoksi, sepsis, malinit, inflamasyon, vb. ile aktive olabilir (Mackman, Tilley ve Key, 2007; Manly, Boles ve Mackman, 2011).

Hipoksi, endoteldeki trombositlerin α granüllerinde bulunan P selektinin ekspresyonunu artırır, bu da, TF içeren monositlerin toplanmasına yol açar, böylece pıhtılaşmayı başlatır (Closse ve ark., 1997; Myers ve ark., 2003).

Hasarlanan damar duvarı ve trombositlerden kaynaklanan trombojenik maddeler ile birlikte hasarlanan damar duvarına yapışan kan proteinleri pıhtılaşma sürecini başlatır. Damar duvarı ağır biçimde hasarlanmışsa, 15-20 saniye içinde pıhtı gelişmeye başlar; hasarlanma hafifse, pıhtılaşma 1-2 dakika içinde şekillenir. Damarın yırtılmasından 3-6 dakika sonra, eğer damardaki delik çok geniş değilse, açıklığın tümü ya da damarın yırtılan ucu pıhtı ile dolar. 20 dakika ila 1 saat içinde, pıhtı büzüşür (retrakte olur) ve damar daha da fazla kapanır. Trombositler pıhtı retraksiyonunda önemli rol oynarlar (Guyton ve Hall, 1996).

Koagülasyon konusunda çalışan tüm araştırmacılar pıhtılaşmanın 3 ana basamakta meydana geldiği konusunda birleşirler: (1) Damarın yırtılması ya da kanın kendisinin hasarlanmasına cevap olarak kanda bir düzineden fazla pıhtılaşma faktörünün rol oynadığı bir dizi kimyasal reaksiyon, protrombin aktivatörü denen kompleksi meydana getirir. Kan pıhtılaşmasında hız sınırlayıcı faktör genellikle protrombin aktivatörünün oluşumudur, çünkü bu noktadan sonraki reaksiyonlar pıhtı oluşturmak için hızlı bir şekilde gelişir. (2) Protrombin (koagülasyon faktörü II), pıhtılaşma yolundaki trombinin öncüsüdür; diğer K vitaminine bağımlı proteinler gibi karaciğerde sentezlenir ve moleküler ağırlığı 68.700 Da'dır. Protrombin aktivatörü, ortamda yeterli miktarda Ca^{++} varlığında protrombinin, moleküler ağırlığı 33.700 Da olan trombine dönüşümünü katalizler. (3) Trombin bir enzim görevi yaparak fibrinojen moleküllerinin fibrin iplikçiklerine polimerizasyonuna sebep olur. Trombin, kan pıhtılaşma kaskadında önemli bir rol oynayan oldukça spesifik bir serin proteazdır. Trombosit yüzeyindeki G protein-bağlı proteazca-aktive edilen reseptörler vasıtasıyla trombosit aktivasyonunu ve agregasyonunu indükler ve hemostazı hızlandırmak için fibrinojenin fibrine dönüşmesini teşvik eder. Polimerizasyonun ilk aşamasında fibrin monomerleri zayıf hidrojen bağlarıyla bir arada tutulur ve yeni oluşan iplikçikler de diğerleriyle çapraz bağlar yapmaz. Bu yüzden oluşan pıhtı zayıftır ve kolayca çözülebilir. Sonraki bir kaç dakika içinde fibrin retikulumunu oldukça güçlendirecek bir işlem gelişir. Normalde plazma globülinlerinde az miktarda bulunan, fakat pıhtı içinde tutulan trombositlerden de salınan, fibrin stabilize edici faktör adı verilen bu madde söz konusu işlemi sağlar. Fibrin stabilize edici faktörünün, fibrin iplikçikleri

üzerinde etki gösterebilmesi için öncelikle kendisinin aktive edilmesi gerekir. Fibrin oluşumuna sebep olan trombin aynı zamanda fibrin stabilize edici faktörü de aktive eder. Bu aktif madde daha sonra, fibrin monomer molekülleri arasında kovalent etkileşimler ile komşu fibrin iplikçikleri arasında çok sayıda çapraz bağ kurulmasını sağlayan bir enzim görevi yapar. Böylece fibrin iplikçikleri trombositler, kan hücreleri ve plazmayı da içine alarak kuvvetli pıhtıyı oluşturur (Şekil 2.1). Fibrin iplikçikleri kan damarlarının hasarlanan yüzeylerine de yapışır, böylece pıhtı herhangi bir damar yırtığını kapatır ve kan kaybını önler (Guyton ve Hall, 1996; Coughlin, 2000; Heemskerk ve ark., 2002; Brass, 2003; Hall, 2010; Monroe ve ark., 2010; Lingmei ve ark., 2016).



Şekil 2.1. Protrombinin trombine çevrilmesi ve fibrinojenin fibrin iplikçiklerini oluşturmak üzere polimerizasyonu (Guyton ve Hall, 1996).

Pıhtı oluşuktan bir kaç dakika sonra kasılmaya başlar ve genellikle 20-60 dakika içinde pıhtı içindeki sıvının çoğu ayrılır. Açığa çıkan sıvıya serum denir. Serumun içinde fibrinojen ve pıhtılaşma faktörleri bulunmaz; serum plazmadan bu nedenle farklıdır. Bu faktörlerin yokluğu nedeniyle serum pıhtılaşmaz (Guyton ve Hall, 1996).

Pıhtının retraksiyonunda trombositler önemli rol oynar. Bu nedenle pıhtının retrakte olmaması dolaşımdaki trombosit sayısının azaldığının bir göstergesidir. Kan pıhtısı içindeki trombositlerin elektron mikrografileri, trombositlerin farklı iplikçikleri birbirine bağlayacak şekilde fibrin iplikçikleriyle etkileşim içine girdiklerini göstermektedir. Bunun yanı sıra, pıhtının içinde tutulan trombositler fibrin stabilize edici faktör gibi bazı prokoagülan maddeleri salmaya devam ederek komşu fibrin iplikçikleri arasında daha fazla çapraz bağın oluşmasını sağlarlar. Ayrıca trombositler, yapılarında bulunan kontraktıl proteinler olan trombostenin, aktin ve miyozin moleküllerini aktive ederek fibrine bağlı trombositlerin güçlü kasılmalarına yol açarlar ve bu şekilde pıhtı kasılmasına doğrudan katılırlar. Kasılma trombin ile ve trombositlerin mitokondri, endoplazmik retikulum, Golgi aparatı gibi organellerinde bulunan kalsiyum depolarından salınan kalsiyum iyonları ile aktive olur veya hızlandırılır. Pıhtı retrakte olduğunda, yırtılan kan damarının uçları birbirine doğru çekilir (Guyton ve Hall, 1996).

2.1.1.3.1. Pıhtılaşmanın Başlaması: Protrombin Aktivatörü Oluşumu

Kan pıhtılaşmasında temel hız sınırlayıcı faktörün protrombin aktivatörünün şekillenmesi olmasından (Guyton ve Hall, 1996) ötürü söz konusu basamağın ayrıntılı olarak incelenmesi önemlidir.

Pıhtılaşmayı başlatan mekanizmalar, damar duvarının, komşu dokuların veya kanın travmaya uğraması ya da kanın hasarlanmış endotel hücreleriyle veya kan damarı endoteli dışındaki kolajen ve diğer doku elemanlarıyla teması sonucu aktive olur. Her durumda da, söz konusu olaylar protrombin aktivatörü oluşumuna yol açar ve bu da protrombinin trombine dönüşümüne yol açarak pıhtılaşma aşamalarının gelişmesine neden olur (Guyton ve Hall, 1996).

Protrombin aktivatörü, birbirleriyle sürekli etkileşim halinde olan iki yolla oluşturulur: (1) Damar duvarı ve çevresindeki dokuların travmaya uğramasıyla başlatılan ekstrensek (dışsal) yol ve (2) Kanın kendi içinde başlayan intrensek (içsel) yol (Guyton ve Hall, 1996).

Hem ekstrensek hem de intrensek yolda bir seri farklı plazma proteini ve özellikle beta globülinler önemli rol oynar. Bunlara kan pıhtılaşma faktörleri (F) adı verilir. Pıhtılaşma faktörlerinin büyük bir kısmı, aktif olmayan biçimde kanda dolaşan, zimojenler olarak bilinen proteolitik enzimlerin öncüleridir. Zimojenlerin aktivasyonu, belirli bir zimojeni

tanımlayan Romen rakamına "a" harfi eklenmesi ile belirtilir. Ancak, orijinal olarak tanımlanan 12 faktörün ilk 4'ü; yani fibrinojen, protrombin, TF ve kalsiyum yaygın isimleri ile belirtilir ve bunlara herhangi bir Romen rakamı atanmaz. FV ve FVIII aynı zamanda labil (karasız) faktörler olarak da adlandırılmaktadır, çünkü bunların koagülan aktiviteleri depolanmış kanda dayanıklı değildir (Guyton ve Hall, 1996; Monroe, Hoffman ve Roberts, 2010; Palta, Saroa ve Palta, 2014).

Prokoagülanlar ve antikoagülanlar – TF, IV ve VIII hariç - karaciğer tarafından üretilir. Bu proteinler, kalsiyum ve diğer iki değerlikli katyonları bağlayıp pıhtılaşma zincirine katılmalarını sağlayan post translasyonel modifikasyonlara uğrarlar (glutamik asit rezidülerinin K vitaminine bağımlı γ karboksilasyonu). K vitamini eksikliği veya K vitamini antagonistleri (örn., varfarin) uygulaması antikoagülasyona yol açar (Guyton ve Hall, 1996; Ansell ve ark., 2008; Palta, Saroa ve Palta, 2014).

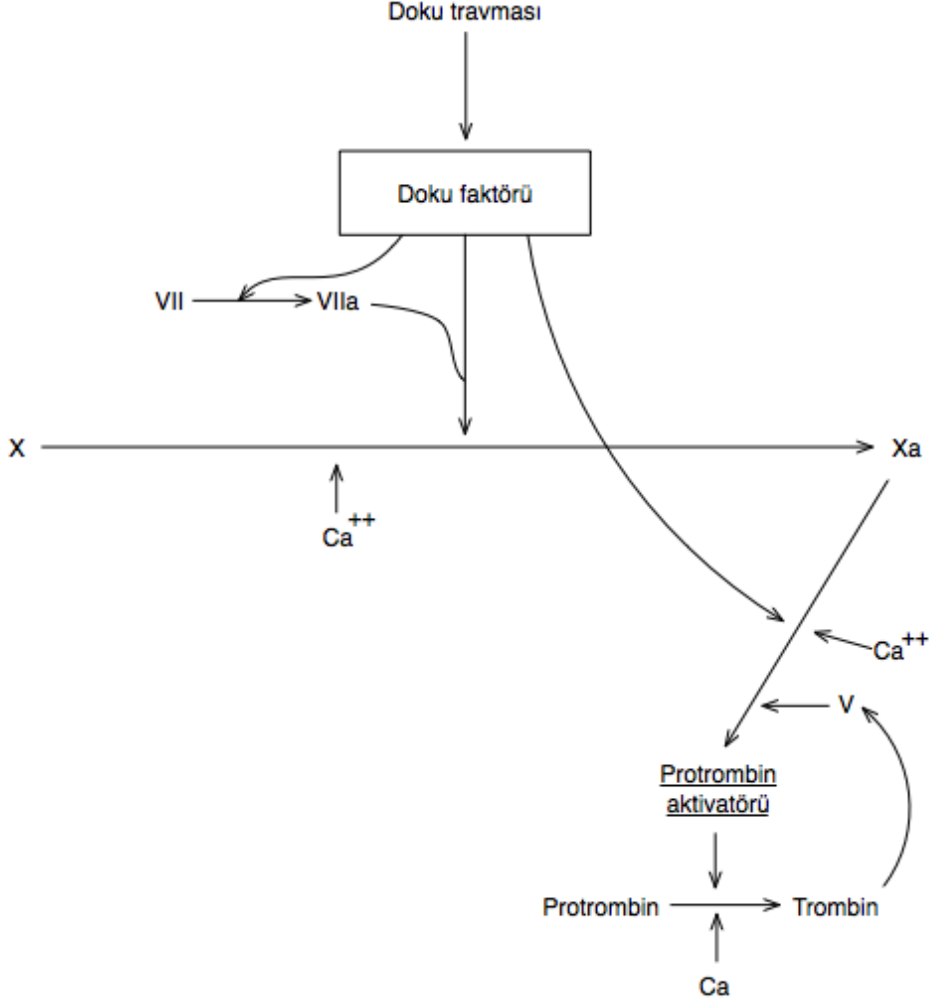
2.1.1.3.1.1. Pıhtılaşmanın Başlamasında Ekstresek Mekanizma

Protrombin aktivatörü oluşumunu başlatan ekstresek mekanizma, damar duvarı veya ekstravasküler dokuların travmaya uğraması ile aktive olur ve Şekil 2.2'de gösterilen aşamalar doğrultusunda gelişir (Guyton ve Hall, 1996);

(1) TF salımı: Doku tromboplastini olarak adlandırılan çeşitli faktörler kompleksi, travmatize subendotelial dokudan salınır. Bu kompleks başlıca doku membranlarından gelen fosfolipidler ve TF'den oluşur (Guyton ve Hall, 1996; Lasne, Jude ve Susen; 2006).

(2) FX'un aktivasyonu –FVII ve TF'nin rolü: TF'nin lipoprotein kompleksi, FVII ile kompleks oluşturur ve kalsiyum iyonları varlığında FX üzerine enzimatik etki göstererek FXa'yı oluşturur (Guyton ve Hall, 1996; Owens ve Mackman, 2010).

(3) FXa'nın prothrombin oluşumu üzerine etkisi – FV'in rolü. FXa, TF'nin parçası olan doku fosfolipidleriyle ya da trombositlerden salınan fosfolipidlerle birlikte FV ile birleşerek protrombin aktivatörü denilen kompleksi oluşturur. Birkaç saniye içinde bu kompleks, protrombini trombine parçalar. Başlangıçta, protrombin aktivatörü kompleksi içindeki FV inaktiftir; fakat pıhtılaşma işlemi ve trombin oluşumu başladığında, trombinin proteolitik etkisiyle FV aktive olur. Böylece, son protrombin aktivatör kompleksinde, FXa, protrombini trombine çeviren gerçek bir proteaz görevi yapar, FVa bu proteaz aktivitesini büyük ölçüde güçlendirir ve fosfolipidler ise olayı daha da hızlandırır (Guyton ve Hall, 1996).

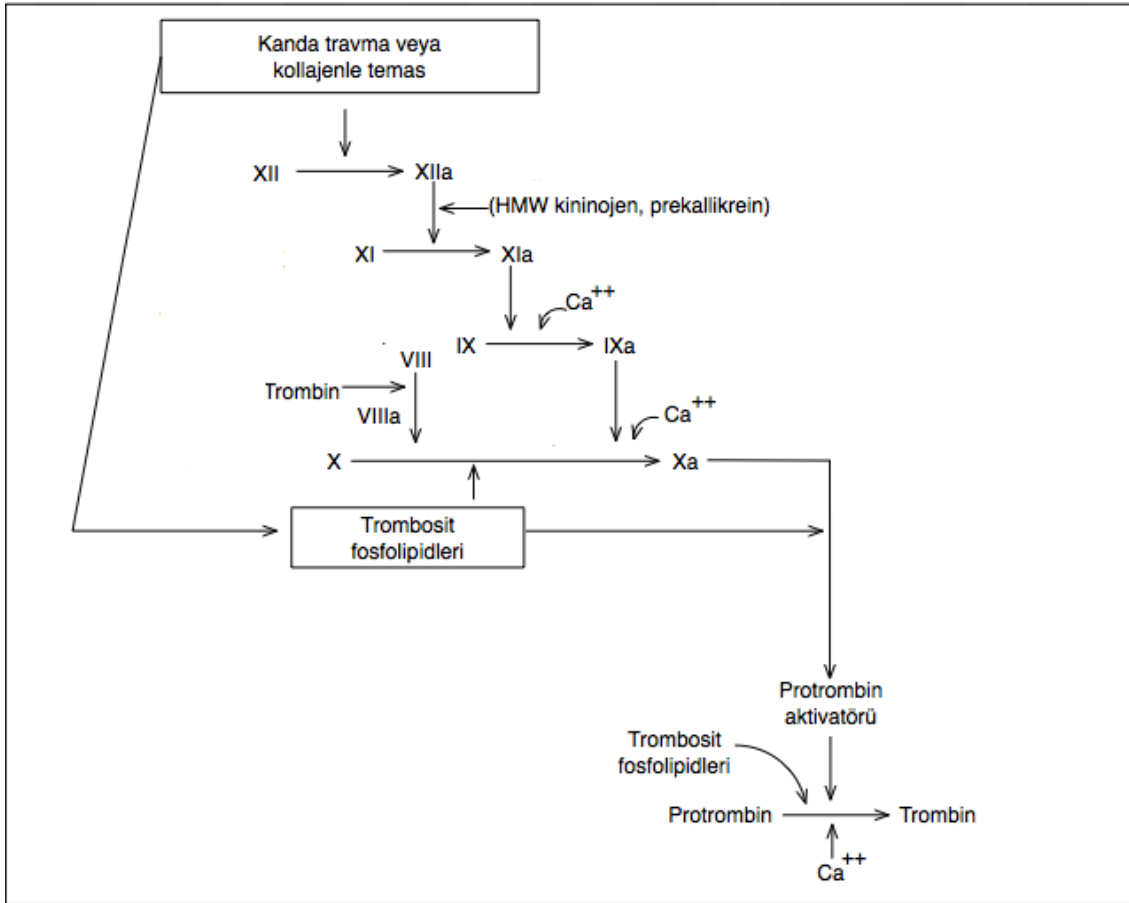


Şekil 2.2. Pıhtılaşma mekanizmasını başlatan ekstrinsek yol (Guyton ve Hall, 1996).

2.1.1.3.1.2. Pıhtılaşmanın Başlamasında İntrensek Mekanizma

GPIb-IX-V adlı reseptör kompleksi intrinsek mekanizmada önemli rol oynar. Megakaryositlerden köken alan söz konusu yaygın membran reseptör kompleksi, sadece trombositlerin yüzeyi üzerinde fonksiyoneldir (Li ve Emsley, 2013). GPIb-V-IX reseptörü için birincil ligand vWF olmasına rağmen, trombin, P-selektin, faktör XI, faktör XII, YMA kininojen ve aynı zamanda bakteriler gibi dolaşımdaki bir dizi başka liganda da bağlanabilir (McEwan, Andrews ve Emsley, 2009; Li ve Emsley, 2013).

Protrombin oluşumunu ve dolayısıyla pıhtılaşmayı başlatan ikinci mekanizma olan intrinsek yol, kanın kendisinin travmaya uğraması veya kanın travmatize bir damar duvarındaki kolajenle teması sonucu başlar ve Şekil 2.3'de gösterilen reaksiyonlar zinciri ile devam eder (Guyton ve Hall, 1996):



Şekil 2.3. Pıhtılaşma mekanizmasını başlatan intrinsek yol (Guyton ve Hall, 1996).

(1) Kanın travmaya uğraması ya da damar duvarındaki kolajenle teması, kanda iki önemli pıhtılaşma faktörünü değiştirir: FXII ve trombositler. FXII, kolajenle veya cam gibi ıslanabilir bir yüzeyle temas ettiğinde yeni bir konfigürasyon alarak “FXIIa” denen proteolitik bir enzime dönüşür. Aynı zamanda, kanın travmaya uğraması, trombositlerin de kolajene veya ıslanabilir bir yüzeye yapışarak hasarlanmasına neden olur ve bunun sonucunda, daha sonraki pıhtılaşma reaksiyonlarında rol oynayan lipoprotein yapıdaki TF’yi içeren trombosit fosfolipidleri ortama salınır (Guyton ve Hall, 1996).

(2) FXIIa, FXI’i enzimatik olarak aktive eder. Bu reaksiyon için ayrıca YMA kininojene gereksinim vardır ve söz konusu reaksiyon prekallikrein ile hızlandırılır (Hall, 2010).

(3) FXIa, enzimatik etki ile faktör IX’u aktive eder (Guyton ve Hall, 1996).

(4) FIXa ve kofaktörü (FVIII), trombosit fosfolipidleri ile birlikte etki göstererek [tenaz kompleksi (FXaz)] FX’u aktive ederler (Palta, Saroa ve Palta; 2014).

(5) İntrensek yolun son aşaması, ekstrinsek yolun son aşamasının aynısıdır. Yani, aktif faktör X, faktör V ve trombosit veya doku fosfolipidleriyle birleşerek protrombin aktivatörü kompleksini oluşturur. Bunu takiben, protrombin aktivatörü saniyeler içinde protrombinin trombine parçalanmasını başlatır ve bu şekilde daha önce bahsedildiği gibi pıhtılaşma işleminin son basamağı harekete geçmiş olur. (Guyton ve Hall, 1996)

2.1.1.3.1.3. Ekstresek ve İntrensek Yollar Arasındaki Etkileşim – Pıhtılaşmanın Başlaması

Geleneksel kaskat teorisine göre; kan damarının yırtılmasından sonra pıhtılaşma ekstrinsek ve intrinsek sistemlerin aynı anda aktivasyonu ile başlatılır. TF ekstrinsek yolu başlatırken, FXII ve trombositlerin damar duvarındaki kolajenle teması intrinsek yolu aktive eder (Guyton ve Hall, 1996; Palta, Saroa ve Palta; 2014).

Ekstresek ve intrinsek yollar arasındaki en önemli farklardan biri ekstrinsek yolun patlayıcı doğasıdır; bir kez başlatıldıktan sonra gelişme hızı yalnızca travmatize dokulardan salınan TF ile kanda bulunan FX, FVII ve FV miktarı ile sınırlandırılabilir. Ciddi doku travmasında pıhtılaşma 15 saniye gibi kısa bir sürede oluşabilir. İntrensek yol ise daha yavaş gelişir; pıhtılaşmanın oluşması için 1-6 dakikaya gereksinimi vardır (Guyton ve Hall, 1996).

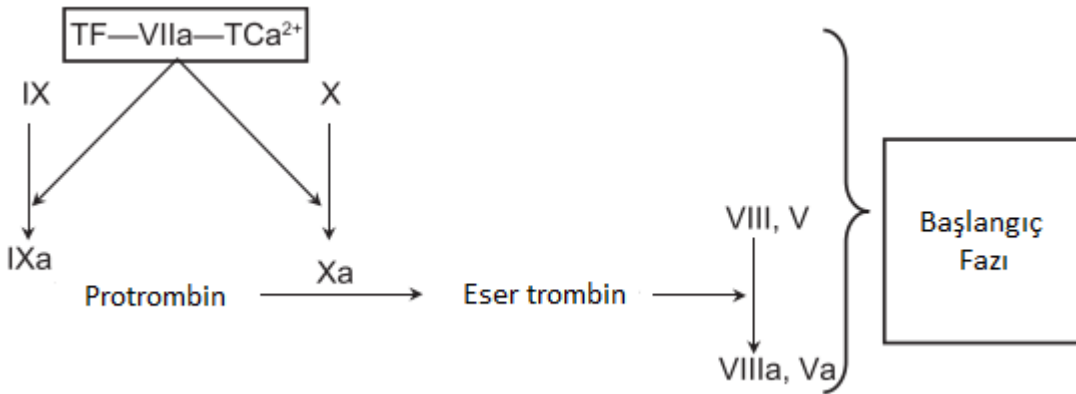
2.1.1.3.1.4. Pıhtılaşmanın Güncel Konsepti

Pıhtılaşma kaskatı geleneksel olarak, her ikisi de FX aktivasyonu üzerinde birleşen intrinsek ve ekstrinsek yollar olarak sınıflandırılmıştır. Klasik kan pıhtılaşma teorisi, *in vitro* koagülasyon testlerini anlamak için özellikle yararlıdır, ancak *in vivo* koagülasyon prosesindeki hücre-temelli yüzeylerin merkezi rolünü mekanizmaya dahil edememektedir (Bombeli ve Spahn, 2004). Ek olarak, *in vivo* hemostaz için kritik olan temas aktivasyonu, aşağıdaki gözlemlerden destek almaz. FXII, prekallikrein veya yüksek molekül ağırlıklı kininojeni olmayan kişiler anormal şekilde kanamazlar. İkincisi, sadece eser miktarda FXI bulunduran hastalar, olağandışı bir kanama olmaksızın büyük travmaya dayanabilir ve FXI'den tamamen yoksun olanlar (hemofili C) sadece hafif hemorajik bozukluk gösterirler. FVIII ve FIX (her ikisi de intrinsek yol faktörleri) eksiklikleri, sırasıyla hemofili A ve B'ye yol açmaktadır, ancak iki pıhtılaşma yolunun klasik tanımı, her iki tipte hemofili hastasının neden etkilenmemiş yoldan kanı pıhtılaştıramadığı konusuna açıklık getiremez (Palta, Saroa ve Palta, 2014).

İlgili konulara cevap vermek için, kan pıhtılaşmasının modern açıklaması, pıhtılaşma sürecinin daha özgün bir tanımını sağlar. Günümüzde, klasik teorilerin ancak *in vitro* koagülasyon testlerinin [Aktive Parsiyel Tromboplastin Zamanı (APTT), Protrombin Zamanı (PT)] makul bir modelini sağlayabildiği takdir edilmektedir (Palta, Saroa ve Palta, 2014).

Mevcut kanıtlar, intrinsek yolun paralel bir yol olmadığı, esas olarak ekstrinsek yol tarafından başlatılan trombin oluşumunu arttırdığı anlayışını desteklemektedir (Triplett, 2000). Yeni model, koagülasyonu aşağıdaki adımlar çerçevesinde tanımlar:

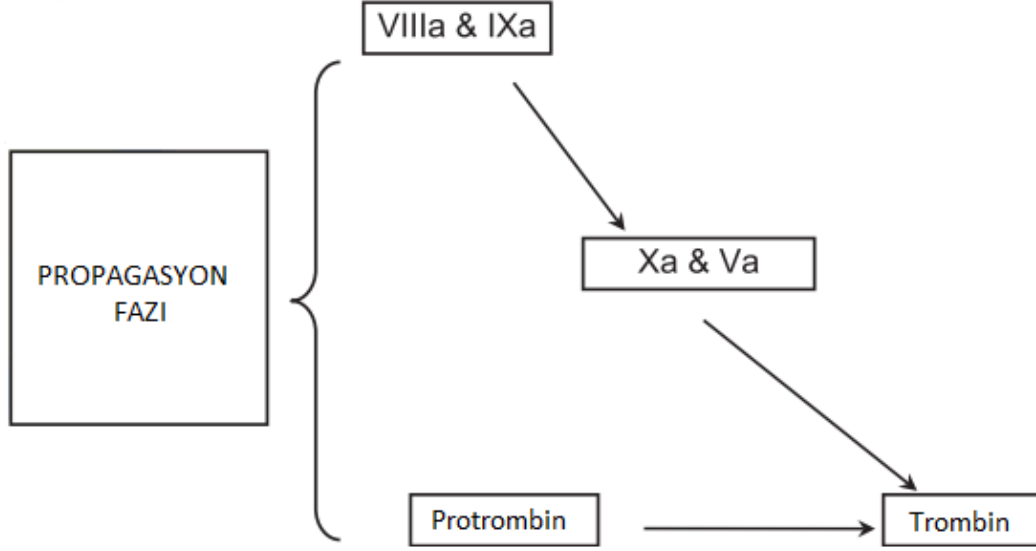
(1) Başlangıç: FIX ve FX'u aktive etmek için FVIIa'yı bağlayan, hasarlı damardaki TF'nin ifadesi ile meydana gelir. FIX'un TF-VIIa kompleksi tarafından bu aktivasyonu, klasik ekstrinsek ve intrinsek yollar arasında köprü görevi görür. FXa daha sonra trombin (FIIa) oluşturmak için protrombin (FII)'ye bağlanır. Bu reaksiyon yoluyla trombin oluşumu sağlam değildir ve TF yolu inhibitörü ile etkin bir şekilde sonlandırılabilir (Şekil 2.4) (Palta, Saroa ve Palta, 2014).



Şekil 2.4. Güncel pıhtılaşma konsepti (başlangıç fazı) (Palta, Saroa ve Palta, 2014).

(2) Amplifikasyon: Oluşan trombin miktarı yeterli olmadığından, trombin trombositle bağlayan çok sayıda pozitif geri bildirim döngüsü vardır. Başlangıç aşamasında üretilen trombin, protrombinaz kompleksinde (FXa, FV, doku ve trombosit fosfolipidleri, Ca^{2+}) kofaktör olarak görev yapan FV'i aktifleştirir. Ayrıca, FVIII'i aktifleştirerek FXa vasıtasıyla FII (protrombin)'in ve FIXa vasıtasıyla FXa'nın aktivasyonu hızlandırır (Palta, Saroa ve Palta, 2014).

(3) Propagasyon: Trombosit yüzeyinde biriken enzim kompleksleri (FXaz ve protrombinaz kompleksi) güçlü miktarlarda trombin oluşumu ve trombosit aktivasyonunu destekler. Bu durum, büyük bir pıhtı oluşturmak için sürekli olarak trombin ve sonrasında fibrin üretimini teminat altına alır (Şekil 2.5) (Palta, Saroa ve Palta, 2014).



Şekil 2.5. Güncel pıhtılaşma konsepti (propagasyon fazı) (Palta, Saroa ve Palta, 2014).

(4) Stabilizasyon: Trombin oluşumu, fibrin polimerlerini kovalent olarak bağlayan ve trombosit tıkaçına dahil edilen fibrine güç ve stabilite sağlayan FXIII'ün (fibrin stabilize edici faktör) aktivasyonuna yol açar. Ek olarak, trombin, pıhtıyı fibrinolizden koruyan trombin tarafından aktive edilebilir fibrinoliz inhibitörünü (TAFI) aktive eder (Bombeli ve Spahn, 2004; Lasne, Jude ve Susen, 2006).

2.1.1.3.1.5. Pıhtılaşmada Kalsiyum İyonlarının Rolü

İntrensek yolun ilk iki basamağı dışında, bütün reaksiyonların başlatılabilmesi veya hızlandırılabilmesi için kalsiyum iyonlarına gereksinim vardır. Bu nedenle kalsiyum iyonlarının yokluğunda kan pıhtılaşmaz (Guyton ve Hall, 1996; Owen, 2001).

Canlılarda kalsiyum iyon konsantrasyonu hiç bir zaman kanın pıhtılaşma kinetiğini etkileyecek düzeylere düşmez. Diğer yandan, bir kişiden kan alındığında kalsiyum iyon konsantrasyonu pıhtılaşma için gereken eşik düzeyin altına düşürülerek kanın pıhtılaşması engellenebilir. Bu amaçla kan, ya sitrat iyonları gibi maddelerle reaksiyona sokularak içerdiği kalsiyum deiyonize edilir ya da oksalat iyonları ile kalsiyumun presipitasyonu sağlanır (Pekelharing, 1892; Sabbatani, 1901a, 1901b; Guyton ve Hall, 1996).

Ekstresek pıhtılaşma sistemini değerlendirmek için yapılan PT (Quick, 1953; Bakan, 2011) ve intrinsek pıhtılaşma sistemini değerlendirmek için yapılan APTT (Langdell, Wagner ve Brinkhous, 1953; Bakan, 2011) ölçümlerinde sitratlı plazma, Ca^{++} kaynağı ve doku tromboplastini veya kontak aktivasyonu kullanır. Söz konusu testlerde, kan % 3,2 veya % 3,8 sodyum sitrat içine alınır ve plazma diferansiyel santrifüjleme ile hazırlanır (Hemker ve ark., 2003; Luddington; 2005). Sitratı uzaklaştırabilmek için gereken miktardaki Ca^{++} çözeltilisinin eklenmesiyle reaksiyonlar başlatılır (Mann ve ark., 2007).

Sitratla muamele edilen tam kanda, trombosit zengin plazma (PRP) veya trombosit fakir plazma (PPP) içine Ca^{++} ilavesiyle başlatılan reaksiyonların evrilmesi sırasında, Ca^{++} homeostasisinin yeniden yapılandırılması ile bağlantılı birçok zaman-bağımlı reaksiyon oluşur (Nelsestuen, 1976; Schiodt ve ark., 1992; Phillips ve ark., 1997; Pauls ve ark., 2000). Dolayısıyla, Ca^{++} ile başlatılan testlerin başlangıcı, Ca^{++} homeostasisini yeniden oluşturan çoklu süreçlerin meydana geldiği, belirsiz 'sıfır zaman' değerine karşılık gelir (Mann ve ark., 2007).

Kanın, daha sonraki hücrel fraksiyonasyonu söz konusu olduğunda veya olmadığında, sitratın içinde toplanmasının, Ca^{++} takviyesi ile tersine çevrilemeyen değişikliklerle sonuçlandığı trombografi kullanılarak ortaya konulmuştur. Sadece, FXIIa'yı inhibe eden CTI (Mısır Tripsin İnhibitörü) içeren plazmayla karşılaştırıldığında, CTI-sitratlı plazmada daha uzun bir gecikme süresinden sonra, maksimum trombin seviyesi oluşumunda kayda değer bir azalma gerçekleşmiştir. Dahası, şelasyondan bağımsız olarak kalsiyum sitratın, Tf-PCPS reaktifinin (rekombinant doku faktörü, fosfolipid veziküller ve Ca^{++}) ilavesini takiben, trombin oluşumunun dinamikleri üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu veriler, temas yolu katkısının yokluğunda, sitrat-şelatlı plazma kullanılarak ve $CaCl_2$ ilavesi ile başlatılan TF (rekombinant doku faktörü)-bağımlı reaksiyon çalışmalarının, reaksiyon dinamiklerinin yorumlanması açısından kusurlu olduğunu göstermektedir (Mann ve ark., 2007).

Rekalsifiye sitrat plazmasındaki trombin oluşumu dinamikleri açısından gözlenen zorluk tam kanda de gözlenmiştir. Tromboelastogram (TEG) deneylerinde, CTI'ya toplanan kan, sitrat ve CTI'ya toplanan aynı seri kanla karşılaştırılmıştır. Sitratın yokluğunda, CTI ve anti-XIa antikoru (α -XI-2) antikoagülasyonu için daha kısa bir fibrin pıhtısı zamanı (R-zamanı) gözlenmiştir (Mann ve ark., 2007). CTI veya α -XI-2 ile temas yolunun blokajı,

trombogram ve TEG metodolojilerinde TF ile başlatılan işlemleri incelemek için kullanılacak minimal değişmiş tam kan ve plazmayı verirken, Ca⁺⁺ şelasyonu tarafından indüklenen değişiklikleri önler (Rand ve ark., 1996; Mann ve ark., 2007). CTI'lı, CTI-sitratlı veya sadece sitratlı kandan elde edilen PRP'lerde test edilen dört farklı trombosit agonisti (epinefrin, ristosetin, ADP, kolajen) ile indüklenen trombosit agregasyon profillerinde ise önemli farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur (Mann ve ark., 2007). Veriler, kalsiyum sitratın hem intrinsek hem de ekstrinsek FXaz komplekslerini inhibe ettiğine, ancak protrombinaz kompleksi üzerinde düşük bir etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. (Mann ve ark., 2007)

2.1.1.4. Fibröz Organizasyon

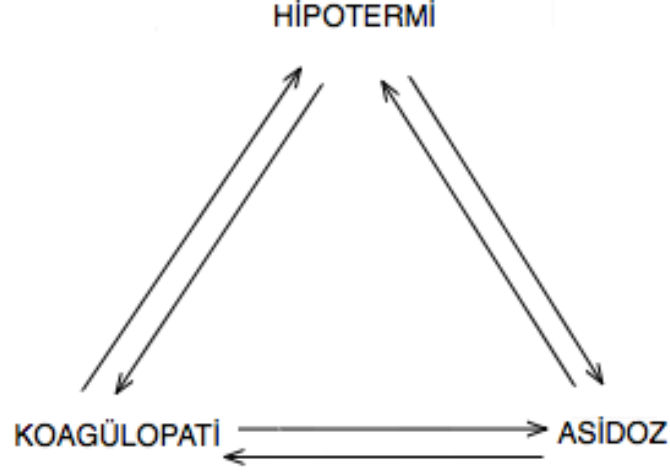
Trombositlerde bulunan alfa ve dens (delta) granüllerin içerikleri, trombositlerin temel fonksiyonları yanında, günümüzde yeni tanımlanmış inflamasyon, anjiyogenez, ateroskleroz ve yara iyileşmesi gibi farklı süreçleri gerçekleştirebilmek açısından çok önemlidir (Yıldız ve Özgürtaş, 2017). α granüller bünyelerinde; P-selektin, fibrinojen, fibronektin, FV, FVIII, PF-IV, PDGF ve TGF- α 'yı içerir (Heemskerk ve ark., 2002). α granüllerle yapılan bir çalışmada, 200'den fazla protein tanımlanmıştır (Maynard ve ark., 2007). δ granüller bünyelerinde; ATP, ADP, kalsiyum, serotonin, histamin ve epinefrini içerir (Heemskerk ve ark., 2002). δ granüllerle yapılan bir çalışmada ise, 40'tan fazla proteinin varlığı ortaya konulmuştur (Rendu ve Brohard-Bohn, 2001).

Damar duvarındaki küçük bir delikte oluşan pıhtı genellikle bir kaç saat içinde fibroblastlarca istilaya uğrar. Bu olay, trombositlerden salgılanan PDGF'yle kısmen hızlandırılır. Ayrıca, protrombinden üretilen trombinin; monositler, lenfositler, endotel hücreleri ve dendritik hücreler üzerinde mevcut olan proteaz aktive edici reseptörlerin aktivasyonu ile ortaya konulan pro-enflamatuar etkileri vardır. Söz konusu faaliyet, pıhtının tümüyle fibröz dokuya dönüşmesi için 1-2 hafta kadar sürer (Hall, 2010).

2.2. Ölümcül Üçlü ve Hasar Kontrol Ameliyatı

Ağır yaralı hastalara yapılan müdahaledeki hız gereksinimi “ölümcül üçlü” travmasını bertaraf etme ihtiyacından kaynaklanmaktadır (Blackbourne, 2008). Ölümcül üçlü; hipotermi, asidoz ve koagülopati döngüsünü kapsamaktadır (Parr ve Alabdi, 2004). Asidoz, hipovolemik şok ve uygun olmayan doku perfüzyonundan kaynaklanır (De Waele ve Vermassen, 2002). Hipotermi, kan kaybı ve termoregülasyonun sağlanamamasından köken alır (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000). Koagülopatinin nedenleri; hipotermi, asidoz, pıhtılaşma faktörleri/trombositlerin harcanması ve kan kaybıdır (Ferrara ve ark.,

1990; Cosgriff ve ark., 1997; Armand ve Hess, 2003; Martini ve ark., 2005). Koagülopati daha fazla kanamaya neden olarak asidoz ve hipotermiyi şiddetlendirir (Şekil 2.6) (Blackbourne, 2008). Döngü tam olarak etkinken neredeyse kesin olarak ölümcüldür (Blackbourne, 2008).



Şekil 2.6. “Ölümcül üçlü” kısır döngüsü (Blackbourne, 2008).

2.2.1. Hipotermi

İnsanlarda hipotermi, 35°C'nin altındaki vücut sıcaklığı olarak tanımlanmıştır. Düşen vücut sıcaklığı fizyolojik anomalilere neden olur (Çizelge 2.2.) (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000).

Çizelge 2.2. Hipotermimin etkileri (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000)

	Hafif (32,2°C – 35,0°C)	Orta (28°C-32,2°C)	Şiddetli (<28°C)
Genel	Titreme, O ₂ tüketimi ↑		Asidoz
Nörolojik		Konfüzyon	Koma
Kardiyovasküler	Kalp debisi ↑, periferel vazokonstriksiyon	Osborn dalgaları, bradikardi, atrial fibrilasyon	Ventrikular irritabilite veya fibrilasyon
Pulmoner	Taşipne, bronkore, bronkospazm	Bradipne	Apne
Renal		Soğuk diürez	
Pıhtılaşma			Trombositopeni, trombosit disfonksiyonu, bozulmuş pıhtılaşma enzim aktivitesi

Hipotermi, travma hastalarında oldukça ciddi bir problemdir (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000). Soğuk hemoglobin, oksijeni dokulara normatermik hemoglobin kadar kolay salamaz, dolayısıyla bu durum çoklu yaralanmaya sahip olan ve hipoksi gözlenen hastalarda özellikle önemlidir (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000). Ayrıca hipotermi, daha fazla kanamayı destekleyerek koagülopatiyi indükler (Cosgriff ve ark., 1997; Watts, Trask ve Soeken, 1998).

2.2.2. Koagülopati

Fizyolojik rahatsızlıklar, primer hemostazdaki bozukluklar, kan/plazmadaki anormallikler veya yayılmış intravasküler koagülasyon (DIC) nedeniyle yoğun bakım uzmanı koagülopatiyi gözlemleyebilir (Meybohm, Zacharowski ve Weber, 2013). Aslen dört olay travma sonrası koagülopatiyeye katkıda bulunur: Hemodilüsyon, pıhtılaşma faktörlerinin harcanması, hipotermi ve metabolik bozukluklar (örn., asidoz) (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000).

Dilüsyonel trombositopeni travma hastalarında en sık görülen pıhtılaşma bozukluğudur. Hemorajik şokun idaresinin bir parçası olarak uygulanan masif kristaloid infüzyonu, çözünür pıhtılaşma faktörlerini ve trombositleri seyreltir. Bir kan hacmi kadar değişim yapıldığında, kanda trombositlerin sadece %35-40 kadarı kalır. Trombositopeni ayrıca trombositlerin yara bölgesindeki kullanımıyla da şiddetlenmektedir (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000).

Asidozun varlığından veya takviye edilen sıvının miktarından bağımsız olarak hipotermi, koagülopatiyeye önemli derecede katkıda bulunur (Watts, Trask ve Soeken, 1998). Hipotermi, enzimatik pıhtılaşma kaskadı da dahil olmak üzere, neredeyse tüm kimyasal reaksiyonların hızının düşmesine neden olur (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000). PT ve APTT, orta derecede hipotermik hastalarda (35°C) kayda değer şekilde uzamaktadır (Reed ve ark., 1986; Johnston, Chen ve Reed, 1989). Hipotermik hastalardaki koagülasyon fonksiyonunun laboratuvar çalışmaları değerlendirilirken dikkat edilmelidir, çünkü numuneler çoğu hastane laboratuvarında 37°C'ye ısıtılmaktadır ve bu da hipotermiden köken alan koagülopatiyi gizleyebilmektedir (Reed ve ark., 1986; Rohrer ve Natale, 1992; Weigelt ve Lewis, 1996). Hipotermide, TxA₂'nin trombositlerce üretimi düşerek hasarlı damarlardaki vazokonstriktif tepki sekteye uğramaktadır (Valeri ve ark., 1987). Uzayan PT ve APTT, trombosit disfonksiyonu ve seyrelme değişimlerinin toplu etkisi, hızla geri dönüşümsüz koagülopatiyeye neden olabilir. Normatermi sağlandığında pıhtılaşma ve

trombosit anomalileri hızla düzelir (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000). Ancak, kan kaybı ve buna bağlı metabolik bozukluklar vücut sıcaklığı normale yaklaşımadan önce meydana gelmiştir (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000).

2.2.3. Asidoz

Asidoz, 7,36'dan daha düşük arteriyel pH olarak tanımlanır (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000). pH, 7'nin altına düşerse kişi zihin karışıklığı yaşayabilir, komaya girebilir ve hatta ölebilir (Tortora ve Derrickson, 2009). Kritik travma hastalarında solunum asidozuna sıklıkla rastlanmasına karşın, söz konusu hastalardaki en önemli asidoz çeşidi metabolik asidozun laktik tipidir (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000).

Arteriyel pH, arteriyel karbon dioksit basıncı bağlamında yorumlanmalıdır. Arteriyel P_{CO_2} analizi, metabolik asidozu, solunum asidozundan veya karışık asidozdan ayırt etmede yardımcı olur. Kronik asit/baz anomalilerinin (örn., kronik obstrüktif akciğer hastalığı veya kronik böbrek yetmezliği) söz konusu olmadığı durumlarda, 40 mm Hg P_{CO_2} 'deki her 10 mm Hg'lik değişim, arterial pH'da ters yönde 0,08 U'luk sapmaya neden olur (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000).

Henderson-Hasselbalch eşitliğinden hesaplanan baz açığı, 38°C ve 40 mm Hg P_{CO_2} 'de 7,40'lık bir pH elde etmek için tam olarak oksijenlenmiş kana eklenmesi gereken veya söz konusu kandan çıkartılması gereken baz miktarını verir. Bu sayı otomatik arteriyel kan gazı analiz raporunun parçasıdır ve 2,0 mmol/L'yi aşan bir baz açığı, nedenin araştırılmasını gerektirir (Rutherford ve ark., 1992).

Metabolik asidoz veya kötüleşen baz açığı görülen travma hastalarına serum laktat tayini yapılmalıdır. Serum laktatındaki yükselme, doku oksijen ihtiyacı ve tüketimi arasındaki bir dengesizliğe işaret eder (Eddy, Morris ve Cullinane, 2000).

Rotondo ve Bard (2004), kısaltılmış operasyonun travma hastalarındaki ölümcül üçlüyü bertaraf etmek üzere başarılı kullanımını bildirmiş ve %50 mortalite oranına sahip "hasar kontrolü" terimini geliştirmişlerdir (Rotondo ve Bard, 2004). Birçok travma merkezi, ağır yaralı travma hastalarına yönelik hasar kontrol yaklaşımlarıyla benzer sonuçlar bildirmişlerdir ve günümüzde bu uygulama standart olarak kullanılmaktadır (Burch ve ark., 1992; Sharp ve Locicero, 1992; Hirshberg ve Mattox, 1995; Johnson ve ark., 2001; Kouraklis, Spirakos ve Glinavou, 2002; Loveland ve Boffard, 2004).

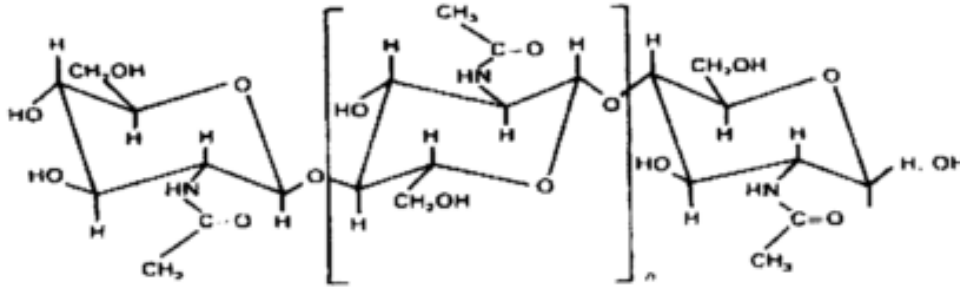
Hasar kontrol ameliyatından sonra şekillenen asidoz, hipotermi ve koagülopati mortalite uyarılarıdır (Aoki ve ark., 2000). Kısaltılmış operasyonun temel amacı mümkün olan en kısa sürede kanamayı ve ikincil olarak da tüm gastrointestinal sızıntıyı durdurma (Blackbourne, 2008). Hemostatların kullanımı bu noktada oldukça önemlidir.

2.3. Hemostazda Kullanılan Glukozaminoglikanlar

2.3.1. Poli-N-asetil Glukozamin (p-GlcNAc)

2.3.1.1 p-GlcNAc İçeren Ürünün Kaynağı, Yapısı ve Reaktivitesi

p-GlcNAc deniz diatomlarının bir salgısıdır (Vournakis ve ark., 1997; Ikeda ve ark., 2002). Tanımlanmış aseptik mikroalgal kültürlerden (tercihen *Thalassiosira fluviatili* olmak üzere, *Thalassiosira spp.*, *Coscinodiscus concinnus*, *Coscinodiscus radiatus*, *Cyclotella caspia*, *Cyclotella cryptica*, *Cyclotella meneghiniana*,) fermantasyon işlemi ile üretilip izole edilen, uzun ($\geq 60 \mu\text{m}$) ve ince ($0,1-0,5 \mu\text{m}$) nano/mikrolifler glukoaminoglikan yapıdadır, içerdiği lineer polimer molekülleri H bağlarıyla birbirlerine sıkıca bağlanmıştır ve şeker rezidüleri tamamen asetillenmiştir (Vournakis ve ark., 1997; Fischer ve ark., 2004; Vournakis ve ark., 2004; Fischer ve ark., 2007; Muzzarelli ve ark., 2007; Pietramaggiore ve ark., 2008). Bir homoglikan olan beta-poli-N-asetil glukozaminin [Poli(1 \rightarrow 4) β -N-asetil-D-glukozamin (*N*-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz)]'un kimyasal yapısı Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7. Beta-poli-N-asetil glukozaminin kimyasal yapısı (Vournakis ve ark., 2004).

p-GlcNAc yapılı Syvek[®] materyalinin kızıl ötesi spektrumundaki belirgin ve keskin şekilde ayrılmış pikleri, liflerinin kendine özgü, düzenli üç boyutlu kristal yapısıyla tutarlıdır (Fischer ve ark., 2004). Her lif, X-ışını saçılımı çalışmalarıyla belirlenen özgün beta tersiyer yapıyı oluşturmak üzere, zincir içi ve zincirler arası hidrojen bağlarıyla stabilize edilmiş yaklaşık 50 adet yüksek molekül ağırlıklı, tam asetillenmiş polisakkarit molekülünden oluşur (Blackwell, Parker ve Rudall, 1967; Blackwell, 1969; Gardner ve

Blackwell 1975; Vournakis ve ark., 2003; Vournakis ve ark., 2004). Kimyasal analizler, Syvek® p-GlcNAc'nin yaklaşık olarak 2000 *N*-asetil glukozamin rezidüsünden oluşan doğrusal bir polimer olduğunu ve molekül ağırlığı (MA) yaklaşık olarak 3×10^6 Da olduğunu göstermiştir. Syvek® p-GlcNAc, yüksek MA ve kristal yapısından dolayı kanda çözünmez ve yapısını korur (Fischer ve ark., 2004).

β -p-GlcNAc lifler güçlü kaotropik (hidrojen-bağı kıran) çözücülerle ayrık poli-*N*-asetil glukozamin polimer bileşenlerine bölünebilir ve α -p-GlcNAc partiküler yapısal formunu oluşturmak için anti-paralel yönde tekrar birleştirilebilir (Fischer ve ark., 2007). α -p-GlcNAc'nin amorfik agregatından ibaret olan (Fischer ve ark., 2007) söz konusu kuaterner yapı, daha fazla pozitif yükün açığa çıkmasına neden olmaktadır (Thatte ve ark., 2004a, 2004b).

2.3.1.2. p-GlcNAc ve p-GlcNAc İçeren Ürünün Hemostatik Etkinliği

p-GlcNAc polimerini içeren yama Syvek®, çok sayıda klinik öncesi ve klinik çalışmada hemostazı indüklemek için başarıyla kullanılmıştır. Domuz, köpek, tavşan ve sıçan kanama model çalışmaları polimerin katı formlarıyla gerçekleştirilmiştir. Birçok durumda, bu çalışmalarda kullanılan hayvanlar antikoagüle edilmiştir. Hemofili hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar başarıyla tamamlanmıştır. Kanamanın kontrolünün problemlili olduğu çeşitli endikasyonları ele alan insan klinik çalışmaları yayınlanmıştır. p-GlcNAc formüllü materyallerin, heparin veya varfarin ile antikoagüle edilen, işlevsel olmayan trombositli üremik, GPIIb/IIIa reseptör antagonistleri alan ve hemofili hastalarda etkili olduğu gösterilmiştir (Cole ve ark., 1999; Kulling ve ark., 1999; Hirsch ve ark., 2003; Jewelewicz ve ark., 2003; Khuri ve ark., 2003).

p-GlcNAc lif esaslı Syvek® yamanın, hemostazın elde edilmesinde fibrin yapıştırıcıdan yedi kat daha hızlı olduğu öne sürülmüştür (Muzzarelli ve ark., 2007). Bununla birlikte, New England Tıp Merkezi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda, p-GlcNAc lif esaslı Syvek® yamanın hemostaz oluşturmadaki göreceli kapasitesini değerlendirmek için domuz dalak hemostaz hayvan modeli üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, hemostazın başarıyla sağlanmasında Syvek® yamanın gazlı bezden 2 kat daha etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hemostazın sağlanması için gereken baskı miktarının karşılaştırıldığı aynı çalışmada, Syvek® yamanın gazlı bezden daha az baskı miktarı gerektirdiği gösterilmiştir (Fischer ve ark., 2004).

p-GlcNAc içeren yama, kateter çıkartıldığında oluşan hat boyunca ve femoral arter ponksiyon bölgesinde, hemostaza yol açan normal hücrel ve biyokimyasal olayların hızlandırılmış oranda gerçekleştiği katalitik bir yüzeydir. Yama kullanılmadan tek başına elle yapılan baskı hemostazla sonuçlanır, ancak hemostaz için gereken süre, söz konusu yama kullanılarak ulaşılan hemostaz süresinden çok daha uzundur. p-GlcNAc içeren yamanın uygulama protokolü, hemostazı sağlamak için diyagnostik vakalarda 10 dakika, girişimsel vakalarda ise 20 dakika elle baskı süresini gerektirmektedir (Hirsch ve ark., 2003).

Girişimsel radyoloji, girişimsel kardiyoloji ve hemodiyaliz uygulamalarında sıklıkla kullanılmış olan, eşlik eden kanama ve yalancı-anevrizma komplikasyonlarının oranını elle baskı uygulamasına göre azaltan ve genel olarak invazif mekanik cihazların kullanımına göre çok daha fazla azaltan p-GlcNAc içeren Syvek® yama teknolojisi; mekanik kapama ve elle baskı konseptleri arasında dengeli bir yaklaşım sunmaktadır (Carney ve ark., 2001; Resnic ve ark., 2001; Hirsch ve ark., 2003). Söz konusu yamanın hemostaz kabiliyeti sayesinde, bugüne kadar 500.000'den fazla klinik kardiyak ve radyolojik kateterizasyon vakası çok düşük komplikasyon insidansı ile tedavi edilmiştir (Hirsch ve ark., 2003).

2.3.1.3. p-GlcNAc'nin ve p-GlcNAc İçeren Ürünün Hemostatik Mekanizması

Yama, yaraya temas ettikten sonra katalitik bir yüzey gibi davranarak, normal fizyolojik mekanizmaların ivme kazanmasına yol açar ve yerel hemostazı hızlandırır. Ürün, yarayı kaplar ve arteryel ponksiyon bölgesinde veya doku yolunda yabancı materyal bırakmadan kanamanın hızla kesilmesine, dolayısıyla enfeksiyon ve lokalize yangılı doku yanıtları potansiyelinin azalmasına neden olur (Hirsch ve ark., 2003).

Sıçan aort halka deney sisteminde, p-GlcNAc'nin arteryel segmanların vazokonstriksiyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Aort halkalardan endotel katman çıkartıldığında söz konusu etki kaybolmaktadır. Ayrıca, p-GlcNAc'nin %70 deasetile türevlerinin laktat tuzunun (kitosan laktat) ve yengeç kitininin sıçan aort halkalarının kasılmasına neden olmaması, p-GlcNAc için özgünlüğe işaret etmektedir. p-GlcNAc ile indüklenen vazokonstriksiyonun endotele bağlı mekanizmasının kısmen, endotel hücrelerinden ET-1 salımının artırılması yoluyla, vasküler yumuşak kas hücrelerinde bulunan ET_A reseptörlerinin aktivasyonu sonucu düzenlendiği gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 2002).

Trombosit temas aktivasyon yanıtlarının yabancı yüzeylerde en aza indirgenmesi, biyomedikal cihazların geliştirilmesinde ortak bir hedeftir (Woodman ve Harker, 1990; Atalar ve ark., 2001). Buna karşın, trombositler ile yabancı maddeler arasındaki aktive edici etkileşimlerin optimizasyonu, topikal hemostatik materyallerin rasyonel tasarımı için umut vaat etmektedir. Trombosit temas aktivasyon mekanizmalarının anlaşılması, uygulanan hemostatik ajanların tasarımında özellikle yararlıdır (Fischer ve ark., 2005).

PRP'ye test bileşeninin eklenerek fibrin pıhtının oluşması için gereken sürenin belirlenmesiyle gerçekleştirilen fibrin pıhtı oluşum zaman analizi, Syvek® p-GlcNAc liflerinin, kontrol numuneleri (polimeri içermeyen numune veya gazlı bez) ile karşılaştırıldığında zamanı yarı yarıya azaltarak daha hızlı bir fibrin pıhtılaşma oranına, dolayısıyla daha hızlı hemostaza yol açtığını göstermiştir (Fischer ve ark., 2004). p-GlcNAc/PRP süspansiyonlarının spektrofotometrik analizinde ise, kalsiyum varlığında β -p-GlcNAc liflerinin ve bu liflerin modifiye edilmiş alfa formlarının trombositlerle etkileşiminin zaman ve konsantrasyonla orantılı olarak jelleşmeye, yani fibrin polimer oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Thatte ve ark., 2004a).

Benzer sonuçlar, PRP ve PPP'ye p-GlcNAc elyaf bulamacının ilavesinin, TEG'deki R-zamanını belirgin olarak düşürdüğünün gözlemlenmesiyle elde edilmiştir. Ek olarak p-GlcNAc ilavesi, trombosit mikropartiküllerini, trombositler tarafından üretilen tromboksan miktarını, trombositlere FX ve Annexin V bağlanmasını (fosfatidilserinin trombosit zarının dış yüzeyinde açığa çıkmasının sonucunda) arttırdığı ortaya konulmuştur. Ayrıca, p-GlcNAc liflerinin PRP'de tromboksan B2 (TxB2) üretimini arttırdığı belirlenmiştir. Bu ölçümler, trombositlerin p-GlcNAc elyaf bulamacı tarafından aktive edildiğini açıkça ortaya koymuştur (Valeri ve ark., 2004).

PRP'de, p-GlcNAc'nin trombosit morfolojisi üzerindeki etkisinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak tespit edildiği çalışmada, plazma proteinleri yokluğunda söz konusu liflerin temasının trombositlerde şekil değişikliği ve geri döndürülemez bir aktivasyon tepkisine özgü olan psödopod uzantılarına neden olurken, plazma proteinlerinin varlığında ek olarak trombositlerin toplandığı ve p-GlcNAc lifleri üzerinde kümeler oluşturduğu görülmüştür (Thatte ve ark., 2004a). p-GlcNAc liflerinin boyutları polimerize fibrine benzerdir ve trombositlerin, trombosit-fibrin ağlarına benzer bir şekilde, liflerle etkileşime girdiği belirlenmiştir (Fischer ve ark., 2004).

Fibrin polimerizasyonunun p-GlcNAc hızlandırmasının trombosit varlığına bağlı olup olmadığını saptamak için p-GlcNAc liflerinin trombositlerden arındırılmış plazma veya PRP ile etkileşiminin karşılaştırıldığı çalışmada, fibrin pıhtılaşmanın p-GlcNAc'ye bağlı hızlandırılmasının trombositler aracılığıyla sağlandığı ortaya konulmuştur (Fischer ve ark., 2005). Plazmadaki proteinlerin toplam karışımının, kalsiyum varlığında matriste adsorbe edilen plazma proteinleri ile SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) kullanılarak karşılaştırılması, kompleks plazma karışımındaki proteinlerin çoğunun matriste adsorbe edildiğini göstermiştir. Bu sonuç, plazma proteinleri ve trombosit yüzey proteinlerinin p-GlcNAc ile etkileşiminin kısmen, sıkı fakat özgün olmayan kimyasal ve fiziksel adsorpsiyon süreçleri tarafından yönlendirildiğine işaret etmektedir (Fischer ve ark., 2005).

p-GlcNAc lif temasının trombosit aktivasyonuna yol açtığına yönelik diğer kanıtlar; söz konusu temastan sonra floresan mikroskopu kullanılarak yapılan gözlemlerle hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun yükseldiğinin, yüzey zarının yapışkan özelliklerinin P selektinin ve GPIIb/IIIa kompleksinin ifadesi ile indüklendiğinin ve fosfatidilserinin trombosit zarının dış yüzeyinde açığa çıkmasının arttığına gösterilmesiyle elde edilmiştir. Buna karşın, integrilin (eptifibatid) uygulanan p-GlcNAc/trombosit karışımlarında hücre içi serbest kalsiyum derişiminin hücrenin dinlenme halindeki seviyesine yakın olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, integrilin fosfatidilserinin trombosit zarının dış yüzeyinde açığa çıkmasını inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, integrin sinyalizasyonunun trombositlerin p-GlcNAc-aktivasyonuna aracılık ettiğine dair ek kanıtlar sağlamıştır (Thatte ve ark., 2004a; Fischer ve ark., 2005).

Hücre yüzeyi integrinlerinin trombositler ve p-GlcNAc lifleri arasındaki etkileşimindeki rolünün araştırıldığı çalışmada ise, trombositten zengin plazmanın ayrı ayrı çeşitli anti-integrin antikolarıyla muamelesinden sonra spektrofotometrik analizleri yapılmıştır. Bu analiz, GPIIb/IIIa tüm molekülüne, söz konusu molekülün α zincirinin bileşenlerine (kalsiyuma bağlı bağlanma alanı CD41a ve CD41b) ve GPIb'ye karşı türetilen antikoların, jel oluşumunu yani fibrin polimer teşekkülünü önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Buna karşın, β_1 integrin (CD29) bileşenleri ile ilgili karma sonuçlar alınmıştır. Anti-CD49e (veya VLA5) antikoru ile muamele edilen trombosit numunesindeki jel oluşumu, muamele edilmemiş kontrol trombosit numunesinde gözlenene benzerdir. Anti-CD49f (anti-VLA6) antikoru ile trombositlerin önceden

muamele edilmesi ise kısmi, fakat dikkate değer olarak jel oluşumunu engellemiştir. Bu sonuçlar, hücre yüzeyi integrinlerinin p-GlcNAc lifi/trombosit etkileşimlerinde farklı düzeylerde rol oynadıklarını açıkça göstermektedir (Thatte ve ark., 2004a).

p-GlcNAc liflerinin, sitratlı plazmaya kalsiyum eklendiğinde, integrin b3 alt birimi (CD61) ve GPIb'yi de içeren trombosit yüzey proteinlerinin spesifik alt kümesini sıkıca bağladığı, western blot analizleriyle gösterilmiştir. p-GlcNAc/trombosit adsorpsiyon karışımına integrilin (GPIIb/IIIa kompleks fonksiyonunu inhibe etmek için), heparin (trombin inhibisyonu için) veya CTI (FXIIa inhibisyonu için) dahil edilmesi, integrin b3 alt birimi ve GPIb dahil trombosit yüzey proteinlerinin herhangi birinin p-GlcNAc'ye bağlanmasını önemli ölçüde etkilememiştir. Bu sonuç ise, integrin GPIIb/IIIa kompleksi de dahil olmak üzere trombosit yüzey proteinlerinin söz konusu bağlanmasının, integrin GPIIb/IIIa kompleksinin bir fibrin(ojen) reseptörü olarak fonksiyonuna, trombinin trombin reseptörleri par-1 ve par-4 gibi yüzey proteinleri üzerindeki etkisine veya FXIIa'nın fonksiyonuna bağımlı olmadığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, trombosit/p-GlcNAc aracılı fibrin polimerizasyonunda FXIIa'nın önemi, artan miktarda CTI'nın trombosit-p-GlcNAc karışımlarına eklenmesinden sonra pıhtılaşma zamanlarının ölçülmesiyle doğrulanmıştır. Sonuçlar, CTI'nın da trombosit/p-GlcNAc aracılı fibrin polimerizasyonunu doz bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir (Fischer ve ark., 2005).

Trombosit varlığında trombin oluşumunu hızlandıran glukozamin temelli materyaller, trombosit dayalı pıhtılaşma hızlandırmasının integrin aracılı dıştan-içe sinyale ve/veya intrinsek pıhtılaşma kaskadının devri için FXIIa aktivitesinin yüzey katalizine ne kadar bağlı olduğunu belirlemek için incelenmiştir. Bu iki mekanizmanın nispi katkısı, integrin fonksiyonlarını inhibe eden integrilin ve FXIIa'yı inhibe eden CTI'nın varlığında trombin oluşumu için lag (gecikme) sürelerinin ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Buna göre; α -p-GlcNAc'nin ve β -p-GlcNAc'nin kısmen/tamamen deasetile edilmiş türevlerinin (kitosan) jel formülasyonlarının protrombotik etkileri FXIIa inhibisyonuna duyarlı iken, β -p-GlcNAc aracılı trombin oluşumu hem FXIIa hem de integrin fonksiyonu inhibisyonuna karşı duyarlıdır. Bu sonuç, incelenen numunelerden sadece β -p-GlcNAc fiber materyalinin, hemostazın aktive edilmesinde en az iki ayrı mekanizma aracılığıyla çalıştığını göstermektedir. Ek olarak, aynı çalışma kapsamında, diğer materyallerle karşılaştırıldığında fibrin polimerizasyonunun β -p-GlcNAc mevcudiyetinde en hızlı olarak

şekillendiği ve söz konusu pıhtının en kuvvetlisi olduğu tromboelastografi ile belirlenmiştir (Fischer ve ark., 2007).

Özetlemek gerekirse, bildirilen sonuçlar hemostaz oluşturmak için trombositler ile p-GlcNAc lifleri arasındaki üç adımlı bir etkileşim mekanizması ile tutarlıdır (Thatte ve ark., 2004a). İlk olarak, esas itibariyle tüm ana plazma proteinleri, kimyasal/fiziksel adsorpsiyon prosesleri vasıtasıyla sıkı ama özgün olmayan bir şekilde p-GlcNAc'ye bağlanır (Fischer ve ark., 2005). Trombosit yüzey proteinlerinin kompleks bir alt kümesi, hücrenin p-GlcNAc/plazma protein matrisine yapışmasına aracılık eder (Fischer ve ark., 2005). Etkileşim, adsorbe edilen plazma proteinleri ile yüzey reseptörlerinin spesifik etkileşimlerinin yanısıra, trombosit yüzey proteinlerinin p-GlcNAc liflerine direkt kimyasal adsorpsiyonunu da içerebilir (Fischer ve ark., 2005). İkinci adımda, integrin-aracılı trombosit aktivasyonu, daha sonra trombin ve son olarak fibrin polimerizasyonunu oluşturarak pıhtıyı sabitleştirmek üzere, FXII aktivasyonu ile birlikte (Fischer ve ark., 2007) intrinsek koagülasyon faktör yolunu başlatır (Thatte ve ark., 2004a). p-GlcNAc/trombosit esaslı fibrin pıhtı oluşumu süreci, trombositlerin p-GlcNAc matrisinin üzerine aglütine olarak tromboksan ve serotonin gibi vazokonstriktif maddeleri üretme eğilimleriyle kuvvetlendirilir (Valeri ve ark., 2004). Son olarak, ortaya çıkan p-GlcNAc/fibrin/trombosit yapıları, hızlandırılmış yara kapatılması için lokal vazokonstriksiyonla birlikte trombosit aracılı pıhtı retraksiyonuna uğrar (Thatte ve ark., 2004a).

Kırmızı kan hücresi agregasyonunu aktive etme kabiliyetinin spektrofotometrik ölçümlerle belirlendiği *in vitro* çalışmada, Syvek® p-GlcNAc liflerinin konsantrasyonla orantılı olarak agregasyonu arttırdığı belirlenmiştir (Fischer ve ark., 2004; Thatte ve ark., 2004b). Alfa-yapı modifiyeli poli-N-asetil glukozaminin varlığında kırmızı kan hücrelerinin, konsantrasyona bağlı olarak, beta-yapılı poli-N-asetil glukozamin lifleri ile oluşturulanlardan daha güçlü agregatlar oluşturduğu bildirilmiştir (Thatte ve ark., 2004b).

In vitro veriler, p-GlcNAc liflerinin kırmızı kan hücrelerinin Annexin V bağlamasını arttırdığını ortaya koymuştur. *In vivo* veriler, p-GlcNAc içeren yamanın (Syvek®) kanayan yaraya bitişik dokuya sıkıca bağlanarak kanın yamadan veya yamanın çevresinden sızmasını engellediğini göstermektedir. Katı matris, kanayan yara ve yamanın yüzeyi arasındaki ara yüzde kırmızı kan hücresi agregasyonunu başlatmaktadır. Veriler, kırmızı kan hücresi agregasyonunun yamanın işlevinin önemli bir özelliği olduğu ve kanamanın

hızla kesilmesi açısından önemli olduğuna işaret etmektedir (Hirsch ve ark., 2003; Fischer ve ark., 2004; Valeri ve ark., 2004).

Kırmızı kan hücresi membranının çoklu integral ve hücre yüzeyi membran proteinleri içerdiği bilinmektedir. Bu membran proteinlerinin çoğu, bant 3 (anyon değişim proteini) ve glikoforinler de dahil olmak üzere, glikozile edilmiştir. Membran glikolipidleri ile birlikte bu proteinler, alyuvar hücresi yüzeyi üzerinde net bir negatif yük oluşturur, reseptör fonksiyonu gösterir ve yüzey antijeni olarak davranırlar. Kırmızı kan hücresi integral membran proteinleri arasında, proteinlerin glikoforin ailesi, alyuvar hücrelerinin yüzey yükünün büyük bir kısmını oluşturur. Glikoforinlerin hücre dışı domeynleri (bölgeleri), hücre yüzeyinde bir negatif yük katmanı oluşturan çok miktarda sialik asit rezidüsü içerir (Thatte ve ark., 2004b). Her bir kırmızı kan hücresinin yüzeyinde yaklaşık 100 negatif yük bulunmaktadır (Stryer,1988).

p-GlcNAc ile kaplanmış lamlara tam kan uygulandıktan sonra çoklu foton mikroskopisi kullanılarak yapılan görüntüleme, kırmızı kan hücrelerinin p-GlcNAc lifleri etrafında toplandığını ortaya koymuştur. Buna karşın, Sığır Serum Albümini (BSA) kaplı kontrol lamlarında kırmızı kan hücreleri bir miktar “Brown hareketi” (bir sıvıda yüzen veya asılı parçacıkların rastlantısal hareketi) göstermiş ve 60 dakika inkübasyondan sonra bile toplanmamışlardır. Kırmızı kan hücrelerinin p-GlcNAc lifleri ile etkileşimi, söz konusu hücrelerin çoğunda diskositlerin ekineositlere dönüşmesine yol açmış; bununla birlikte, alyuvarlar BSA kaplı lamlarda uzun süreli inkübasyondan sonra bile diskositik olarak kalmıştır. p-GlcNAc lifleri üzerinde 1 dakikalık aralıklarla 15 dakika boyunca yapılan gözlem sonucu, kırmızı kan hücrelerinin % 50'sinin toplanması için gereken sürenin 6 ± 1 dakika (ortalama \pm SEM; n = 5) ve maksimum toplanmanın 10 ila 15 dakikalık inkübasyon sırasında olduğu belirlenmiştir (Thatte ve ark., 2004b).

Aynı çalışmada, p-GlcNAc lifleri ve BSA ile kaplanmış lamlara, tripsin ile muamele edilmiş, nöraminidaz ile işleme tabi tutulmuş ve kontrol olarak söz konusu enzimlere tabi tutulmamış alyuvarlar eklenmiştir. Lamlar görüntülenmiş ve toplanan kırmızı kan hücreleri gözle sayılmıştır. Enzim uygulanan kırmızı kan hücrelerinde, p-GlcNAc aracılığındaki adezyon ve agregasyonda önemli bir azalma gözlemlenmiştir. Tripsin ile muamele edilen numunelerde alyuvar hücrelerinin toplanmasının inhibisyonu, nöraminidaz ile muamele edilenlerdekinden biraz daha fazladır. Bu durumun, tripsinin kırmızı kan hücresi yüzeyindeki tüm protein reseptörlerini uzaklaştırırken, nöraminidazın

sadece siyalik asit içeren glikozillenmiş hücre yüzeyi reseptörlerinden iyonik yükleri uzaklaştırması ile açıklanabileceği öne sürülmüştür (Thatte ve ark., 2004b).

p-GlcNAc aracılı kırmızı kan hücresi toplanmasını gözlemledikten sonra, araştırmacılar bu etkileşimlerin potansiyel mekanizmalarını daha iyi tanımlamak için, p-GlcNAc polimerleri üzerindeki yüzey yüklerinin doğasını, zeta potansiyellerini ölçerek araştırmışlardır. Zeta potansiyellerinin ölçümü için polimerlerin küçük bir örneği ezilmiş ve deiyonize distile su içinde yavaşça dispersiyon haline getirilmiştir. Dispersiyon, bir vorteks karıştırıcı ile iyice karıştırılmıştır. Söz konusu β -p-GlcNAc polimerlerinin pozitif yüzey yükleri 28.37 ± 0.86 mV (zeta-potansiyeli, ortalama \pm SEM, n = 8), alfa yapısı modifiyeli p-GlcNAc'nin pozitif yükü ise 16.94 ± 0.35 mV (ortalama \pm SEM, n = 8) olarak belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada sunulan veriler, kırmızı kan hücrelerinin p-GlcNAc lif materyalleri ile *in vitro*'daki doğrudan etkileşiminin, kırmızı kan hücresinin yüküne ve p-GlcNAc materyalleri üzerindeki karşılık gelen yüklere bağlı olduğunu göstermektedir. Modifiye edilmiş üç boyutlu alfa-yapıya sahip partiküler p-GlcNAc'nin toplam pozitif yüzey yükleri, modifiye edilmemiş β -p-GlcNAc lifine göre daha düşük olsa da söz konusu partikül form kırmızı kan hücreleri ile kuvvetli bir etkileşim göstermiştir. Araştırmacılar bu farkın, p-GlcNAc'nin alfa yapısal modifikasyonunun, negatif yüklü kırmızı kan hücrelerinin bağlanabildiği pozitif yüklerinin daha fazla açığa çıkmasına neden olmasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Bu sonuçlardan, yüzey pozitif yüklerinin dışında, polimerlerin üçüncül yapısının ve fiziksel durumunun, kırmızı kan hücreleri ile etkileşimlerinde kritik olduğu anlaşılmaktadır (Thatte ve ark., 2004b).

Kan içinde bulunan oldukça fazla sayıdaki kırmızı kan hücresi nedeniyle, ilgili etkileşim, p-GlcNAc ile sağlanan hemostazda önemli bir rol oynamaktadır. Yara bölgesine p-GlcNAc bandajının uygulanmasıyla, oldukça yüksek sayıdaki kırmızı kan hücresi, bandaj üzerindeki p-GlcNAc liflerinde toplanır. Eşzamanlı olarak, trombositler p-GlcNAc liflerine yapışmaya başlar ve etkinleşirler. Bu da pıhtılaşma yolunun, trombojenik kaskatın ve vazokonstriksiyonun kümülatif etkisine bağlı olarak hemostatik tıkaçın hızla şekillenmesine yol açar (Thatte ve ark., 2004b; Muzzarelli ve ark., 2007).

2.3.2. Kitin

2.3.2.1. Kitinin Kaynağı, Yapısı ve Reaktivitesi

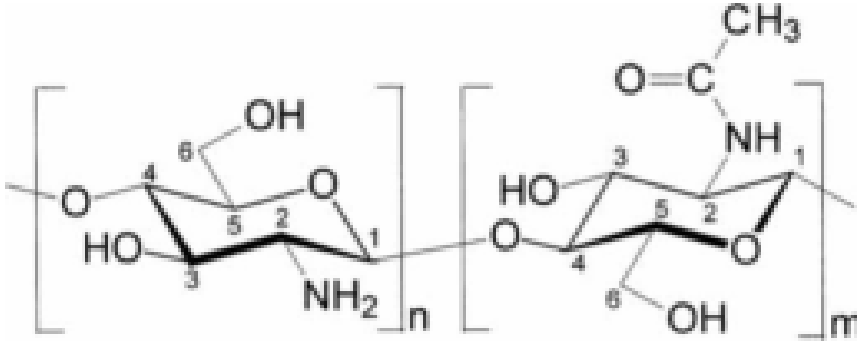
Kitin, selülozdan sonra yeryüzündeki ikinci en yaygın doğal polisakkarittir (Dutta, Dutta, ve Tripathi, 2004; Muzzarelli, 2011; Salaberria, Labidi ve Fernandes, 2015). En çok

krustase kabuklarında, böceklerin dış iskeletlerinde, bazı fungusların ve mayaların hücre duvarlarında mevcuttur (Ravikumar, 1999; Hoven ve ark., 2007; Dash ve ark., 2011; Azuma ve ark., 2014). Kitin, doğada çok çeşitli mikrokristal formlarda mineraller ve protein kontaminantları ile kompleks halinde bulunur (Falini ve Fermani, 2004). Söz konusu kitin-mineral-protein komplekslerinin doğal amorf supramoleküler yapıları, fizyolojik bariyer fonksiyonlarını yansıtmaktadır (Fischer ve ark., 2007). Krustase (örn., *Chionoecetes spp.*) kabuklarının işlenerek içerdikleri kitinin ayrıştırılması, esas olarak, proteinlerin uzaklaştırılmasını ve yengeç kabuklarında yüksek konsantrasyonlarda bulunan kalsiyum karbonatın çözülmesini içerir (Ravikumar, 1999; Sugamori ve ark., 2000; Percot, Viton ve Domard, 2003). Kitin, kolloidal kitin elde edilmek üzere, konsantre hidroklorik asit (Karrer ve Hofmann, 1929; Muzzarelli, 1977), sülfürik asitin sulu çözeltisi (Jeuniaux, 1966), fosforik asit (Leger, Cooper ve Charnley, 1986) veya metansülfonik asit (MSA) (Hirano ve Nagao, 1988) muameleleriyle ile daha da saflaştırılabilir. Halihazırdaki endüstriyel kimyasal işlem, kitini etkin bir şekilde izole etse de, söz konusu işlem sırasında kitinin MA'sı azalmaktadır (Synowiecki ve Al-Khateeb, 2003).

Kitin ayrıca organik asitler, antibiyotikler ve enzimler gibi mayalama yan ürünlerinden de elde edilebilir. Kitin yakın dönemde süngerlerin iskelet oluşumları içinde tespit edilmiştir ve deniz süngerlerinden izole edilebilir (Lingmei ve ark., 2016). İzole edilen kitin bazlı iskeletler, yaklaşık 40-100 nm çapındaki kitin liflerinin çapraz bağlanmasından oluşan mikro yapıları bir ağdır ve bu ağın şekli bandajlarla benzerlik göstermektedir (Anitha ve ark., 2014; Wysokowski ve ark., 2015).

Kitin, β -D (1 \rightarrow 4) glukozidik bağlarla bağlanmış *N*-asetil-D-glukozamin (*N*-asetil-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz) birimlerinin (A ünitesi) yüksek molekül ağırlıklı bir doğrusal polimeridir (Ravikumar, 1999; Sugamori ve ark., 2000). Bazı glukopiranoz rezidüleri deasetildir ve 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz (D ünitesi) olarak mevcuttur (Hudson ve Smith, 1998; Whang ve ark., 2005). Kitinin DD'si, söz konusu 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz yapısal birimlerinin miktarına bağlı olarak, %50'nin altındadır. Kitin olarak adlandırılan tam asetillenmiş formdaki kitin doğada mevcuttur. Deasetilasyonun derecesine göre kitin, çoğunlukla birincil alifatik amino grupları biçiminde olan %5 ila 8 (w/v) arasında azot içerir (Dutta, Dutta ve Tripathi, 2004). Krustase kitin nanolifleri (tipik olarak 350 x 18 nm), *T. fluviatilis* (p-GlcNAc) mikroliflerinden (60 x 0,1 μ m) açıkça daha kısadır (Kulling ve ark., 1999; Chan ve ark.,

2000). Kitinin ayrıca, α ve γ formları da mevcuttur (Somorin ve ark., 1979; Dash ve ark., 2011). Bir heteroglikan olan kitinin kimyasal yapısı Şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8. Kitinin kimyasal yapısı. Kitin, $m > 50$ değeri ile kopolimer yapısındadır (Whang ve ark., 2005).

Oldukça hidrofobik yapıdaki kitin, suda ve organik çözücülerin çoğunda çözünmez. Çözünürlüğünün ve kimyasal reaktivitesinin düşüklüğüyle selüloza benzeyen bir materyaldir. C-2 konumundaki hidroksil grubu bir asetamido grubu ile değişmiş selüloz olarak kabul edilebilir. Selüloz gibi, doğal bir yapısal polisakkarit olarak işlev görür. Beyaz ve elastik olmayan bir polisakkarittir. Doğal olarak bulunan polisakkaritlerin çoğunluğunun aksine kitin baziktir (Ravikumar, 1999).

İçerdiği asetamid gruplarının üç boyutta hidrojen bağlanmasına katkıda bulunma kabiliyetleri nedeniyle oldukça kristalli bir polimerdir (Whang ve ark., 2005). Hidrojen bağlarının yüksek yoğunluğu nedeniyle suda, organik çözücülerin çoğunda ve seyreltik asidik/bazik çözeltilerde çözünmez (Qin ve ark., 2010). Kitinin katı halini çözebilmek için, zincirler arası itmeyi tetikleyen veya moleküller arasındaki hidrojen bağlanmasını bozan çözücülere ihtiyaç duyulur (Whang ve ark., 2005). Hekzafloroizopropanol ve hekzafloroaseton (Capozza, 1975), mineral asitlerin sulu çözeltileri/kloroalkoller (Austin ve ark., 1981; Dutta, Ravikumar ve Dutta, 2002), kalsiyum klorür dihidrat/metanol (Tamura, Nagahama ve Tokura, 2006), lityum klorür/dimetilasetamid (Rutherford ve Austin, 1978; Dutta ve ark., 2003; Yılmaz ve Bengisu, 2003; Tsiopstias ve Panayiotou, 2008), lityum klorür/*N*-metil-2-pirolidon (NMP) (Yılmaz ve Bengisu, 2003; Bouyer ve ark., 2010) veya *N*-metil morfolin-*N*-oksit/ H_2O (Dutta ve ark., 1997; Ravikumar, Dutta ve Nakamura, 2000) gibi yüksek derecede polar çözücüler ve konvansiyonel çözücü sistemleri kitini çözer. Bu polar çözücülerin kullanımı, biyopolimerin reaktivitesiyle ilgili

sorunları kısmen azaltmış olsa da, toksisiteleri veya aşındırıcılıkları, seri üretimi ve ortaya çıkan jellerin potansiyel uygulamalarını engelleyebilir (Shen ve ark., 2016).

Kitini çözmek ve jelleştirmek için kullanılan yeni alternatifler arasında, 2000'li yıllardan beri geliştirilen iyonik sıvı (IL)'ler, derin ötektik çözücüler (DES'ler) ve alkali veya alkali/(tio)üre sulu sistemler bulunmaktadır (Shen ve ark., 2016). Bu bağlamda, 1-bütül-3-metilimidazyolyum klorür ([C₄mim]Cl) (Xie, Zhang ve Li, 2006), 1-bütül-3-metilimidazyolyum asetat ([C₄mim][OAc]) (Wu ve ark., 2008; Silva ve ark., 2011), 1-alil-3-metilimidazyolyum bromür ([Amim]Br) (Prasad ve ark., 2009; Yamazaki ve ark., 2009) ve 1-etil-3-metilimidazyolyum asetat ([C₂mim][OAc]) (Qin ve ark., 2010) tipik kitin çözücü IL'lerdir.

Asetat anyonunun alkali özelliğinin bir sonucu olarak, [C₂mim][OAc]'nin sadece kitini değil, ham krustase kabuklarını da kolayca çözebildiğinin gösterildiği çalışmada; bu yolla elde edilen kitinin, mevcut endüstriyel süreçlerden elde edilen kitinden daha yüksek saflıkta olduğu ve moleküler ağırlığının daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. (Qin ve ark., 2010)

DES'ler, hidrojen bağlaması yoluyla kendi kendine birleşebilen iyonik ve iyonik olmayan bileşenlerinin ısıtılmasıyla elde edilip, söz konusu saf bileşenlerinden çok daha düşük erime noktasına (mp) sahip olan sıvılardır (Abbott ve ark., 2003; Shen ve ark., 2016). Daha ucuz ve tamamen iyonik bileşenler içermiyor olmaları dışında, IL'lerle hemen hemen aynı fizikokimyasal özelliklere sahiptirler (Dominguez de Maria ve Maugeri, 2011; Sharma ve ark., 2013). Klasik örnekler, sırasıyla 12°C veya 69°C'lik mp'ye sahip DES'leri oluşturan, kolin klorürün (mp: 302°C) üreyle (mp: 133°C) veya tiyoüreyle (mp: 175°C) olan kombinasyonlarıdır (Abbott ve ark., 2003).

Kitini çözmek ve jelleştirmek için kullanılan diğer çözücü sistemi, alkali/üre (veya tiyoüre) sulu sistemleridir (Cai ve Zhang, 2005; Hu ve ark., 2007). Tipik olarak, alkali/üre çözücü sistemlerinin çözme gücü; NaOH/tiyoüre > LiOH/üre > NaOH/üre >> KOH/üre sulu çözeltisi sırasına sahiptir (Zhang, Ruan ve Gao, 2002; Cai ve Zhang, 2005).

Yukarıda sıralanan çözücülerin hepsinin etki mekanizmaları tam olarak belirlenememiş olsa da, yaygın olarak kabul edilen görüş; çözücünün hidrojen bağı alıcı (N-O, Cl⁻, OAc⁻, vb.) ve/veya donörlerinin (üre veya tiyoüredeki -NH₂) karıştırma, ısıtma veya düşük

sıcaklık muamelesi üzerine, biyopolimerdeki zincirler arası ve zincir içi hidrojen bağlarını ayırdıkları şeklindedir (Petruš, Gray ve BeMiller, 1995; Cai ve Zhang, 2006; Hu ve ark., 2007; Wang, Gurau ve Rogers, 2012; Sharma ve ark., 2013;).

Kitin; toksik olmama, düşük immünojenite, biyobozunurluk ve anti-mikrobiyal aktivite gibi birçok yararlı özelliğe sahiptir. Bu nedenle biyomedikal alanda çok çeşitli potansiyel uygulamaları bulunmaktadır (Robinson ve Stirling, 1968; Sugamori ve ark., 2000; Lingmei ve ark., 2016; Paul ve ark., 2014). *İn vivo*'da kitin, hasar görmüş dokuda immüno-potansiyelize etkilere sahiptir, makrofajların fagositik kabiliyetinin aktivasyonunda rol oynar (Nishimura, Ikeuchi ve Tokura, 1985) ve makrofaj-histiyosit hücre hatlarını indükleyerek yaraların restorasyonunu teşvik eder (Schmidt ve ark., 1993). Ayrıca, interferon, doku nekroz faktörü ve interlökin-I gibi sitokinleri içeren bir yara iyileşme mekanizmasının da söz konusu sürece dahil olabileceği öne sürülmüştür (Muzzarelli., 1992).

Kitosan ile karşılaştırıldığında kitin daha fazla kan uyum (antirombojenite) özelliği gösterir; asetilasyon derecesi yaklaşık %75 oranında olan polimer, kitosandan daha hızlı bozunur, ayrıca kitin daha az makrofajı aktive eder (Brunner ve ark., 2009). Kitin ve kitosanın, kitinaz ve lizozim tarafından *N*-asetil gruplarının miktarına ve polimer omurgasındaki dağılımlarına göre sindirilebildiği bilinmektedir (Sashiwa ve ark., 1990; Aiba, 1992). Lizozim, A ünitesindeki 1→β bağları hidrolize eder (Imoto ve ark.,1992). Lizozim spesifitesi, on altı olası tetrad sekansının sadece ikisine karşı tercihli bir hidroliz olarak belirlenmiştir, yani, -AA-AA- ve -AA-AD- dizileri tercihen ortalarındaki glikozidik bağdan kesilir (Varum ve ark., 1996). Kitin ek olarak analjezik etkiye sahiptir ve birçok hastada yara pansuman malzemesi olarak kullanılmıştır (Maeda ve ark.,1995).

2.3.2.2. Kitinin Hemostatik Etkinliği

Brandenberg ve ark. (1984), beyin ameliyatı geçiren kediler için kitinin hemostatik bir ajan olarak etkinliğini bildirmişlerdir. Yara sargı malzemesi olarak kitin kullanılan klinik deneyimler sırasında, söz konusu polimerin hemostatik etkisi kaydedilmiştir (Sugamori ve ark., 2000).

Kitin (MA = 300 kD, DD < %10), kitosan (MA = 80 kD, DD > %80 ve selülozun kan koagülasyonu üzerindeki etkisini değerlendirilmek üzere köpek tam kanının kullanıldığı çalışmada, modifiye Lee-White metodu ile kitinin doz bağımlı olarak tam kan pıhtılaşma

zamanı (WHBCT)'yi azalttığı ortaya konulmuştur. Kullanılan en yüksek kitin derişimi olan 0,1mg/ml'nin, 12 dakika olan kontrole ait kan pıhtılaşma zamanını 3,7 dakika azaltırken, aynı derişimdeki kitosan süspansiyonunun kan pıhtılaşma zamanını 4,7 dakika azalttığı gözlemlenmiştir. Selülozun da kan pıhtılaşma zamanını azalttığı, ancak etkisinin kitinden daha zayıf olduğu belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile karşılaştırıldığında, tüm örneklerde trombosit agregasyon oranları önemli ölçüde artmıştır. En yüksek trombosit agregasyon oranını kitin göstermiştir (Okamoto ve ark., 2003).

Kitin (DD = %36), kitosan (DD = %97) ve kitosan türevlerinin pıhtılaşma üzerindeki genel etkilerinin taze insan tam kanı kullanılarak Lee-White metoduyla değerlendirildiği çalışmada, kitinin WHBCT'yi en çok düşüren materyal olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, antikoagüle edilmiş kandan elde edilen PRP kullanılarak, söz konusu materyallerin trombosit aktivasyonu üzerine etkilerinin, plazma rekalsifikasyon zamanı (PRT)'nin ölçülmesi ve SEM'le değerlendirilmesi sonucunda, kitinin test edilen materyallerle kıyaslandığında en yüksek hemostatik kabiliyete sahip olduğu ortaya konulmuştur. Bu farklı gözlemin, muhtemelen kullanılan kan türündeki ve koagülasyon test prosedürünün detaylarındaki farklılıklardan kaynaklandığı öne sürülmüştür (Janvikul ve ark., 2006).

Kitin süspansiyon spreynin [yüksek derecede kristalli kitin nanolif süspansiyonu (%97,5), %70'lik glikolik asit (%0,56), kitosan (%0,97) ve klorhekzidin (%0,40); viskozite < 100 cps), pH 5,5] kanama miktarını önemli ölçüde azalttığı fare yara modelinde gösterilmiştir. Ayrıca, krustase kitin nanolifleri, üretim teknolojisinin daha basit olmasından dolayı, p-GlcNAc mikroliflerinden daha ucuzdur (Muzzarelli ve ark., 2007).

2.3.2.3. Kitinin Hemostatik Mekanizması

Kitinin sıçan intakt ve endoteli çıkartılmış aort halkalarında vazorelaksasyona sebep olduğu gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 2002).

Kitin, sığır kanı proteinleri (Nishimura ve ark., 1984) ve serum albümini (Ledema-Osuna ve ark., 2010; Kaya ve ark., 2016) de dahil olmak üzere vücut sıvılarındaki proteinlerle doğrudan etkileşime girebilir, trombositlere yapışarak, fibrin monomerin polimerizasyonunu hızlandıran bir kitin/trombosit kompleksi oluşturarak kan pıhtılaşmasına neden olur (Thatte ve ark., 2004a; Fischer ve ark., 2005).

Çeşitli materyallerin süspansiyonlarının köpek kanından elde edilen PRP ile karıştırılması sonrasında gerçekleşen trombosit agregasyonunun çift agregometre (dual aggregometer) kullanılarak ölçüldüğü çalışmada, kitin tarafından uyarılan trombosit agregasyon düzeyinin, kitosan, selüloz ve lateksi içeren diğer tüm materyallerinkinden daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Yıkanmış trombosit kullanıldığında, kitin tarafından uyarılan agregasyon düzeyi kitosaninkine benzer olurken, pıhtılaşma düzeyinin PRP ile edilenden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Enzim İmmunoassay (EIA) ve SEM yöntemleri ile desteklenen, fiziksel kontrol olarak lateksin, kimyasal kontrol olarak ise selülozun kullanıldığı söz konusu çalışmada böylece, kitinin trombositleri sıkıca bağlama yoluyla doğrudan etkilediği ve bu etkinin plazma varlığında arttığı ortaya konulmuştur. Araştırmacılar, amino rezidüsü bulunduran kitin ve kitosan ile selülozun kimyasal yapıları arasındaki tek farkın söz konusu fonksiyonel grup olduğunu belirterek amino rezidüsünün trombosit agregasyonundaki önemine işaret etmişlerdir (Okamoto ve ark., 2003).

β -p-GlcNAc, kısmen deasetile β -p-Glc-NAc jel, tamamen deasetile β -p-Glc-NAc jel, α -p-GlcNAc, kitin ve kitosanın fibrin pıhtı oluşumu için intrensek pıhtılaşma kaskadının devrinin hızlandırılmasına etkilerinin florojenik yöntemle değerlendirildiği çalışmada, tuz kontrolüyle kıyaslandığında, söz konusu materyallerin tümünün trombin oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı belirlenmiştir. Kitinin, karşılaştırılan materyaller arasında, β -p-GlcNAc'den sonraki en trombojenik materyal olduğu belirlenmiştir. TEG analizinde fibrin polimerizasyonu için nispi başlangıç zamanlarının, florojenik deneyle ölçülen trombin oluşumunun kinetiğiyle paralellik gösterdiği ortaya konulmuş, ayrıca kitinin indüklediği fibrin pıhtısının kuvvetinin, p-GlcNAc ile elde edilenden daha zayıf nitelikte olduğu gösterilmiştir. Çalışmada aynı zamanda, kitinin protrombotik etkisinin FXIIa inhibisyonuna duyarlı olduğu, ancak integrilin inhibisyonuna anlamlı miktarda duyarlı olmadığı belirlenmiştir (Fischer ve ark., 2007).

2.3.3. Kitosan

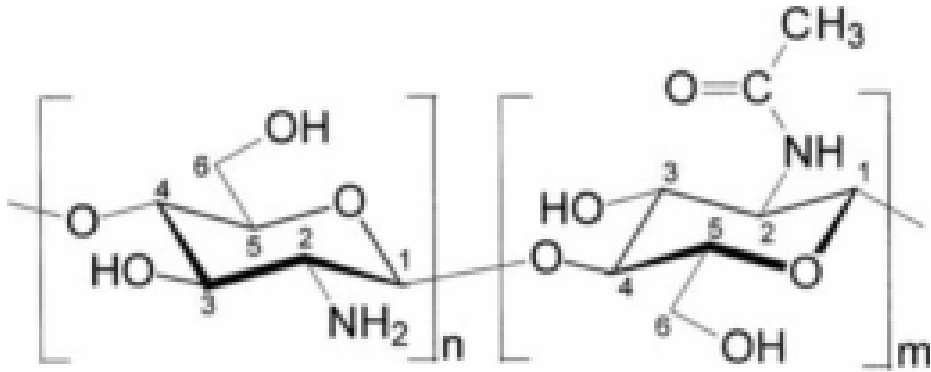
2.3.3.1. Kitosanın Kaynağı, Yapısı ve Reaktivitesi

Kitosana doğada nadiren rastlanır. *Mucor rouxii*'de bulunan kitosanın (Arcidiacono and Kaplan, 1992), söz konusu fungustaki oluşumu kitinin enzimatik deasetilasyonu yoluyla gerçekleşir (Hudson ve Smith, 1998). Doğrusal bir polisakkarit olan kitosan, kitinin kısmi *N*-deasetile türevidir (Şekil 2.9) (Malette ve ark., 1983; Lee, Wan ve Park, 1995; Ravikumar, 1999; Kim ve Venkatesan, 2014). *N*-deasetilasyon neredeyse hiçbir zaman tam değildir (Hudson ve Smith, 1998). Kitosan rastgele dağılmış β -(1-4)-bağlı-D-

glukozamin ve *N*-asetil-D-glukozaminden oluşan bir doğrusal polisakkarittir (Kim ve Venkatesan, 2014). Tipik kitosanlar %70-95 arasında deasetiledir, bu nedenle katyonik polimerlerdir (Fischer ve ark., 2004).

Kitosan, güçlü bir baz ve asit ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak, krustaselerin kabuklarından, bir atık ürünü olarak üretilmektedir (Klokkevold ve ark., 1999). Söz konusu üretim işlemi esas olarak, proteinlerin uzaklaştırılmasını ve yengeç kabuklarında yüksek konsantrasyonlarda bulunan kalsiyum karbonatın çözünmesini içerir (Ravikumar, 1999; Dutta, Dutta, ve Tripathi, 2004). Oluşan kitin %40 sodyum hidroksit içinde 120°C 'de 1-3 saat boyunca deasetile (%70) edilir (Ravikumar, 1999; Dutta, Dutta, ve Tripathi, 2004). Bu muamele, görece düşük ve geniş değişkenliğe sahip molekül ağırlıklı (40 - 100 kDa) ürünle sonuçlanır (Fischer ve ark., 2004).

İkinci metot, *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* veya *Streptomyces*'ten sitrik asitin üretilmesi için olana benzer fermantasyon prosesleriyle ilişkilidir ve fungus misellerine alkali uygulaması sonucu kitosan-glukan komplekslerinin oluşumunu içerir (Ravikumar, 1999). Alkali, proteini bertaraf eder ve aynı anda kitini deasetile eder (Ravikumar, 1999). Alkali derişimine bağlı olarak, bazı alkali çözümler glukanlar da bertaraf edilir (Muzzarelli, Tanfani ve Scarpini, 1980).



Şekil 2.9. Kitosanın kimyasal yapısı. Kitosan, n > %50 değeri ile kopolimer yapısındadır (Whang ve ark., 2005).

Kitosan karışık amorf bir katyonik polimerdir ve çözelti halindeyken düzensiz sargı konfigürasyonundadır. Söz konusu polimer, düzenli ve sabit üç boyutlu bir tersiyer yapıya sahip olmadığından, p-GlcNAc liflerinden önemli ölçüde farklıdır (Fischer ve ark., 2004).

Tamamen kitosandan oluşan Clo-Sur P.A.D. (Scion Cardio-Vascular, Miami, FL) ve plastik bir destek malzemesi olan PET (polietilen tereftalat) üzerine kaplanmış ince bir kitosan tabakasından oluşan ChitoSeal™ (Abbott Vascular Devices, Redwood City, CA) hemostatik yamalar piyasaya sürülmüştür (Fischer ve ark., 2004). Clo-Sur P.A.D. ve ChitoSeal™ yama ürünlerinde bulunan kitosan bileşenlerden yapılmış zarların kızıl ötesi spektrumları, söz konusu ürünlerle Syvek® pGlcNAc lifleri arasında yapısal farklılıkların bulunduğunu göstermektedir. Kitin, kitosan ve hiyalüronik asit gibi N-asetil glukozamin içeren polimerlerin, Syvek® p-GlcNAc liflerinde bulunan kristalin üç boyutlu beta formunda değil, düzensiz sargı formunda var olduğu bilinmektedir. Clo-Sur P.A.D. 'deki kitosanın %DD'si yaklaşık olarak 87 ± 10 'dur (Fischer ve ark., 2004).

Doğal polisakkaritlerin çoğu, örn., selüloz, dekstran, dekstrin, pektin, aljinik asit, agar, agaroz, karajenanlar nötr veya asidik iken, kitosan da kitin gibi baziktir (Ravikumar, 1999; Dutta, Dutta, ve Tripathi, 2004). Kitosan; asetik asit, formik asit vb. asitlerin çok seyreltik sulu çözeltilerinde çözünür olmasına rağmen, suda veya organik çözücülerin çoğunda çözünmez.

Kitosan, normal vücut bileşenlerine biyolojik olarak parçalanabilir olması ve toksik olmaması nedeniyle biyouyumludur. Söz konusu doğal polimer, memeli hücrelerine ve mikroorganizmalara sıkıca bağlanır. Ayrıca, kitosan fungistatik, hemostatik ve analjeziktir (Landes ve Bough, 1976; Rao ve Sharma, 1997; Dutta, Dutta ve Tripathi, 2004; Paul ve ark., 2014).

2.3.3.2. Kitosanın ve Kitosan İçeren Ürünlerin Hemostatik Etkinliği

Kitosanın heparinize edilmiş tavşanlarda lingual kanamayı (Klokkevold ve ark., 1999) ve beyin dokusunda yaygın kılcal kanamayı inhibe ettiği (Brandenberg ve ark., 1984), sıçanlarda ise siklofosamid tarafından tetiklenen hemorajik sistit oluşumunu önlediği (Okamura ve ark., 1995) gösterilmiştir.

Kitosanın, çeşitli türlerden alınan tam kanla temas halinde bir pıhtı oluşturduğu ve WHBCT'yi normalin yaklaşık %40'ı kadar düşürdüğü gösterilmiştir (Rao ve Sharma, 1997). Farklı materyallerin kan koagülasyonu üzerindeki etkisini değerlendirilmek üzere tam kanın kullanıldığı benzer bir çalışmada, kitosanın (DD > %80) doz bağımlı olarak WHBCT'yi azalttığı ortaya konulmuştur. Çalışma kapsamında kullanılan en yüksek

kitosan derişimi olan 0,1 mg/ml'nin, 12 dakika olan kontrole ait kan pıhtılaşma zamanını 4,7 dakika azalttığı gözlemlenmiştir (Okamoto ve ark., 2003).

İlk raporlar, kitosan içeren Clo-Sur P.A.D'nin etkin kullanımının, teşhis hastaları için %3,7 ve girişimsel hastalar için %5 komplikasyon oranı ile 10 ila 15 dakika elle baskı süresini gerektirdiğine işaret etmektedir (Hirsch ve ark., 2003).

Bununla birlikte, kitosan içeren yamaların hemostaz oluşturmadaki göreceli kapasitesini değerlendirmek üzere domuz modeli üzerinde gerçekteştirilen hayvan deneyinde, hemostazın başarıyla sağlanmasında Clo-Sur P.A.D.'nin başarısız olduğu, ChitoSeal™'nin ise gazlı bezin yarısı kadar etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, hemostazın sağlanması için gereken baskı miktarının karşılaştırılmasında, gazlı bezin her iki yamadan da daha az baskı miktarı gerektirdiği sonucuna varılmıştır (Fischer ve ark., 2004).

2.3.4. Belirli Kitosan Türevleri

2.3.4.1. Belirli Kitosan Türevlerinin Yapıları, Sentez ve Reaktiviteleri

Kitosanın en basit türevi olan kitosan asetat tuzu, primer amin gruplarının protonlanması yoluyla yüksek katyonik özellik göstermekte ve suda çözünebilmektedir. HemCon® sargı, kitosan asetat içeren hemostatik bir pansumandır (Burkatovskaya ve ark., 2008). Söz konusu pansumanın matrisi oluşturulurken, kitosan tercihen glutamik asit, laktik asit, formik asit, hidroklorik asit ve/veya asetik gibi asitlerin çözeltilerine eklenir (McCarthy, Kenton ve Morgan, 2005).

Kitosan laktat gibi suda çözünen kitosan türevlerinin bakterisidal ve fungusidal aktivite gösterdikleri ortaya konulmuştur (Papineau ve ark., 1991; Sudharshan ve ark., 1992). HemCon® sargının, farelerde patojenik bakterilerle enfekte edilen tam kalınlıkta kesik yaralarına ve üçüncü derece yanık yaralarına uygulandığında, bakterilerin gelişimini önleyerek ölümcül enfeksiyonları engellediği gösterilmiştir (Burkatovskaya ve ark., 2006; Dai ve ark., 2009).

Kitosanın pH>6,5 değerlerindeki düşük çözünürlüğü, söz konusu polimerlerin diğer türevlerinin sentezi ve karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalardaki temel motivasyon kaynağı olmuştur. Kitosanın görece komplike türevleri, ılımlı koşullar altında kolayca elde edilebilir (Lee, Wan ve Park, 1995) ve substitüe edilmiş glukanlar olarak düşünülebilirler (Ravikumar, 1999). Kitosanın, *N,O*-karboksimetil (Marguerite, Pham ve Claude, 1992), *N*-sülfat (Holme ve Perlin, 1997), hidroksipropil (Wenming, Peixin ve Qin, 2002); *N*-(2-

hidroksi) propil-3-trimetil (Seong, Whang ve Ko, 2000) ve *N,N,N*-trimetil (Sieval ve ark., 1998; Zhishen, Dongfen ve Weiliang, 2001; Verheul ve ark., 2008) gibi suda çözünlüğe sahip türevleri kimyasal modifikasyonlarla hazırlanmıştır.

Kitosanın azot içeriği çoğunlukla birincil alifatik amino grupları biçimindedir. C-2 pozisyonlarındaki söz konusu amino gruplarının miktarına bağlı olarak kitin ile kıyaslandığında, kitosan türevlendirmeye daha açıktır. Bu nedenle kitosan, *N*-alkilasyonun (Paul ve ark., 2014) yanısıra, aminlere özgü olan Schiff reaksiyonuna kolaylıkla girer (Lee, Wan ve Park, 1995; Ravikumar, 1999).

Kitosan oda sıcaklığında aldehit ve ketonlarla, sırasıyla aldiminleri ve ketiminleri oluşturur. Sodyum borohidrit veya sodyum siyanoborohidrit ile hidrojenasyon sonrası *N*-alkil kitosan oluşur (Masri, Randall ve Stanley, 1977; Ravikumar, 1999; Sashiwa ve Shigemasa; 1999; Dutta, Dutta, ve Tripathi, 2004). Kitosanın söz konusu indirgeyici *N*-alkilasyonu ve *N,N*-dialkilasyonu çeşitli aldehitler ile gerçekleştirilmiştir (Muzzarelli ve ark., 1982a, 1982b; Muzzarelli ve Tanfani, 1985; Tong ve ark., 1991; Kim ve ark., 1997; Sashiwa ve Shigemasa; 1999). *N,N*-dialkilasyon alternatif olarak formik asit ve formaldehit kullanılarak sağlanabilir (Verheul ve ark., 2008). *N,N*-dialkil kitosan ise, metil iyodür kullanılarak kuaternize edilebilir (Kim ve ark., 1997; Jia et al., 2001; Kim ve Choi, 2002; Verheul ve ark., 2008).

Kitosanın amino grubunun direkt kuaternizasyonu, alkil halojenürlerin bazik ortamdaki kullanımıyla gerçekleştirilebilir (Domard ve ark., 1987; Curti, de Britto ve Campana, 2003). Söz konusu yaklaşımla, TMK'yı da içeren (Sieval ve ark., 1998; Thanou ve ark., 2000; Runarsson ve ark., 2008), çeşitli kuaternize trialkil türevleri elde edilmiştir. Kitosan ayrıca, 2,3-epoksipropil-trimetil amonyum klorür ile reaksiyona sokularak kuaternize edilebilir (Zhao ve ark., 2010).

Az ya da çok hacimli süstitüent varlığı, kitosanın hidrojen bağlarını zayıflatır; bu nedenle, *N*-alkil kitosanlar, alkil zincirlerinin hidrofobikliğine rağmen su içinde çözünür veya şişerler (Ravikumar, 1999; Sashiwa ve Shigemasa; 1999; Dutta, Dutta, ve Tripathi, 2004) ve kitosanın film oluşturma özelliğini korurlar (Muzzarelli, 1977; Dutta, Ravikumar ve Dutta, 2002).

2.3.4.2. Belirli Kitosan Türevlerinin Hemostatik Etkinlikleri

Hayvanlar üzerinde elde edilen veriler, etken madde olarak kitosan asetat içeren HemCon® sargısının kanamayı azaltma ve hayatta kalma oranını iyileştirdiğini göstermiştir. Söz konusu sargının; 25'i göğüs, kasık, kalça ve abdomen; 35'i uzuvlar; 4'ü boyun ve yüz bölgesi üzerinde olmak üzere; toplamda 64 askeri vakadaki kullanımı raporlanmıştır. Vakaların %66'sında HemCon® sargısı, gazlı bezle başarı sağlanamadığında kullanılmış ve %100'lük başarı oranı yakalanmıştır. Vakaların %97'sinde HemCon® sargısının kullanımı, kanamanın kesilmesi veya hemostazın iyileştirilmesiyle sonuçlanmıştır. Sargının kullanımının, turnikelerin kanamayı kontrol altına alamadığı alanlarda en çok faydayı sağladığı, yara bölgelerine kolaylıkla yerleştirilemeyen uzuv yaralanmalarında ise kullanımının zor olduğu bildirilmiştir. Söz konusu sargının uygulaması sonrasında hiçbir komplikasyon veya yan etki bildirilmemiştir (Wedmore ve ark., 2006). Saha kullanımıyla ilgili şikayetlerden biri, 5 mm kalınlığında liyofilize edilmiş kitosan asetat pedinin kurduğunda parçalara ayrılması, nemlendiğinde ise aşırı miktarda jelleşmesi olmuştur (Muzzarelli ve ark., 2007). Bununla birlikte, ürünün hemodiyaliz sonrası ponksiyon alanı kanamasını azaltmak için güvenilir ve etkili olduğu bildirilmiştir (Bachtell ve ark., 2006; Burkatovskaya ve ark., 2006; Wedmore ve ark., 2006).

Örülmüş DeBakey greftlerinin, kitosan asetat ile muamele edildiklerinde, kanı geçirmediikleri gözlemlenmiştir. 24 saat sonunda incelenen greftler, tekrar kanamanın olmadığını ortaya koymuştur (Malette ve ark., 1983). Wistar sıçanları üzerinde yapılan *in vivo* çalışma, kitosan asetatın atardamar kaynaklı kanamanın durdurulmasında yüksek etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Pogorielov ve ark., 2015).

Sodyum hidroksit muamelesi ile deasetilasyonunun akabinde hidroklorik asit uygulaması, kitinin suyu emme kabiliyetini artırarak jelleşmesine olanak sağlar. Mikrokristalin yapıdaki söz konusu kitosan hidroklorürün (%DD: 58 ve 67) kanı emip tutma yetisinin, kolajen hidroklorürünkinden (Avitene™) ve medikal absorban pamuğunkinden anlamlı şekilde fazla olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Aynı çalışmanın *in vivo* kısmında, ortopedik cerrahi sırasında kontrol edilmesi zor olan süngerimsi kemikten kaynaklanan kanamanın köpek modeli kullanılmıştır. Söz konusu modelde, kitosan hidroklorürün medikal absorban pamuktan anlamlı olarak daha yüksek (p<0.05), kolajen hidroklorürle ise karşılaştırılabilir düzeyde hemostatik etki sergilediği ortaya konulmuştur. (Sugamori ve ark., 2000).

Kitin, kitosan ve türevlerinin pıhtılaşma üzerindeki genel etkilerinin, taze tam kan kullanılarak Lee-White metoduyla değerlendirildiği çalışmada; kitin (DD: %36), kitosan (DD: %97), *N,O*-karboksimetil kitosan (NOCC) ve etken madde olarak jelatin içeren pozitif kontrol SPONGOSTAN®'in (Johnson & Johnson Medical N.V., Belçika) boş kontrole göre WHBCT'yi anlamlı olarak ($p<0.05$) düşürdüğü gözlemlenmiştir. Buna karşın; PNAC (kımsen *N*-asetillenmiş kitosan, DD: %56), *N*-sülfatlanmış kitosan veya *N*-(2-hidroksi)propil-3-trimetil amonyum kitosan klorür (HTAAC)'nin WHBCT üzerinde belirgin bir etkisi olmamıştır. Sonuçlar, kitinin en yüksek hemostatik kabiliyete sahip olduğunu göstermektedir. Kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosanın, pıhtılaşma yetisinde azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Suda çözünen türevleri elde etmek üzere kitosan üzerinde yapılan ek modifikasyonların ise, pıhtılaşma yetisini tedricen azalttığı ortaya konulmuştur. Buna karşın, söz konusu eğilime NOCC'nin uymadığı ve bu türevin pıhtılaşmayı hızlandırdığı belirlenmiştir.

2.4. Hidrojeller

Hidrojeller, üç-boyutlu ağ yapısı nedeniyle suda çözünmeyen hidrofilik bir polimeri ve suyu içeren iki bileşenli sistemler olarak tanımlanırlar (Park ve Nho, 2003). Polimer jelleri oldukça düşük elastisite modülüne sahiptirler, dolayısıyla minimal mekanik irritasyona sebep olurlar. Kanla, vücut sıvılarıyla veya dokularla temas halindeyken yüksek biyo-uyumluluk gösterirler (Rosiak, 1994).

2.4.1. Fiziksel Hidrojeller

Fiziksel hidrojeller, zincir dolanmaları, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları, hidrofobik veya elektronlar aracılığıyla etkileşimler gibi fiziksel etkileşimlerle çapraz bağlıdırlar (Shen ve ark., 2016). Fiziksel birliktelikler genellikle, ısı-geri dönüşümlü ve “yeşil” (çapraz bağlayıcı içermeyen) sol-jel geçiş sürecine yol açarlar (Rwei ve ark., 2009; Hu ve ark., 2011).

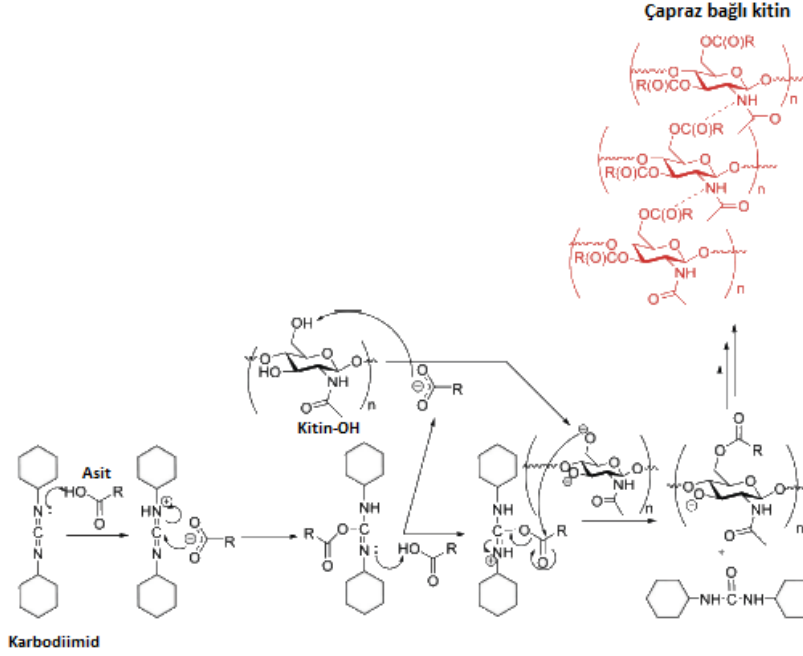
Kitinin en yaygın olarak kullanılan biyo-uyumlu türevi olan kitosandan hidrojel üretilmesi görece kolaydır çünkü söz konusu türev, asetik asit gibi asitlerin seyreltik sulu çözeltilerinde çözülebilir. Bu türevin sulu çözeltilerinden, hidrofobik veya elektrostatik birleşimleri meydana getiren fiziksel bir çapraz bağlayıcı ilavesiyle, pH'ye duyarlı özgün hidrojeller oluşturulabilir (Lee ve ark., 2001; Shu, Zhu ve Song, 2001). Anyon ($-COO^-$ veya $P_3O_{10}^{5-}$) ve katyon ($-NH_3^+$) arasındaki elektrostatik etkileşimi sağlayıp pH-duyarlı kitosan hidrojellerin oluşumuna yol açan fiziksel iyonik çapraz bağlayıcılardan sodyum sitrat (Shu, Zhu ve Song, 2001) ve tripolifosfat (TPP) (Lee ve ark., 2001; Hu ve ark., 2008;

Csaba, Köping-Höggård ve Alonso, 2009; Ngah ve Fatinathan, 2010; Sureshkumar ve ark., 2010) kullanılmıştır. Bu tür pH duyarlı kitosan hidrojelinde, çapraz bağlama yoğunluğu, iyonik çapraz bağlayıcı çözeltinin konsantrasyonunun ve pH değerinin ayarlanmasıyla kontrol edilmiştir; örneğin, sitrat çözeltisinin düşük konsantrasyonu ve yüksek pH'ı, yüksek şişme oranı, yani düşük çapraz bağlanma yoğunluğuyla sonuçlanmıştır (Shu, Zhu ve Song, 2001).

2.4.2. Kimyasal Hidrojeller

Kitin bazlı hidrojellerin kalıcı yapısını ve etkin şişmesini garanti altına almak için, kovalent olarak bağlı bir 3D hidrofilik ağ, genellikle jelasyon sırasında kimyasal çapraz bağlayıcıların, yani 1,2,3,4-bütantetrakarboksilik dianhidrit (BTCA) (Kono ve Fujita, 2012; Kono ve Zakimi, 2013), süksinik anhidrit (SA) (Yoshimura ve ark., 2005; Yoshimura, Matsuo ve Fujioka, 2006), sitrik asit (CA) (Bodnar, Hartmann ve Borbely, 2005; Demitri ve ark., 2008), epiklorohidrin (ECH) (Zhou ve ark., 2007), etilen glikol diglisidil eter (EGDE) (Rodriguez, Alvarez-Lorenzo ve Concheiro, 2003; Kamari, Wan Saime ve Lai Ken, 2009) ve divinil sülfon (DVS) (Anbergen ve Oppermann, 1990; Kabra, Gehrke ve Spontak, 1998; Lu, Hu ve Gao, 2000) gibi bifonksiyonel veya çok fonksiyonlu küçük moleküllerin kullanılmasıyla elde edilmektedir. Kimyasal çapraz bağlayıcılar, bir polimer zincirini diğerine bağlayan kovalent bağlar oluşturur. Çapraz bağlama reaksiyonlarının mekanizmasına göre, kitin için kimyasal çapraz bağlayıcılar iki tipte sınıflandırılabilir: (a) karboksilik asitler ve karboksilik anhidritleri içeren esterleştirici maddeler; ve (b) organoklor, epoksit ve vinil bileşikleri içeren eterleştirici ajanlar. İlk tip çapraz bağlayıcılar, kitin jellerinde –COOR bağlarının ve muhtemelen birkaç peptid bağının (–CONH–) oluşmasına neden olurken, ikinci tip çapraz bağlayıcıların kitin için kullanımı R–O–R bağlarının ve muhtemelen bazı sekonder amin bağlarının (R–NH–R) oluşmasıyla sonuçlanır (Shen ve ark., 2016).

Karboksilik asit (örn., CA) ve biyopolimer arasındaki kondensasyonu için, suda çözünebilir karbodiimidin (örn., 1-[3-(dimetilamino) propil]-3-etilkarbodiimid metiyodür ve N, N'-disikloheksil-karbodiimid) aracı olarak kullanıldığı bir yol vardır (Bodnar, Hartmann ve Borbely, 2005). Mekanizma potansiyel olarak biyopolimer ile reaksiyona girebilen ve kendisini toksik olmayan bir üre türevine dönüştürebilen kararsız bir açıl-ara madde oluşmasını içerir (Şekil 2.10) (Shen ve ark., 2016).



Şekil 2.10. Karbodiimid-aracılı çapraz-bağlama (karbodiimid olarak *N,N'*-disikloheksil karbodiimid kullanılmıştır) (Shen ve ark., 2016).

2.4.3. Işınla Çapraz Bağlama

Radyasyon reaksiyonları çapraz bağlı bir yapı oluşturmak üzere polimeri uyarmak için elektron ışınlarını, gama ışınlarını, X-ışınlarını veya ultraviyole ışığı kullanır (Park ve Nho, 2003). Işınlama, polimer zincirleri arasında kovalent bağlanmanın oluşturulması için kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntem; kolay ve tekrarlanabilir süreç kontrolü, jelleştirme ve sterilizasyonu bir teknolojik basamakta birleştirme, kimyasal jelleştirme için söz konusu olan muhtemelen zararlı ve bertaraf edilmesi zor olan başlatıcı ve çapraz bağlayıcıların eklenmesini gerektirmemesi gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Bu avantajlar, özellikle gıda ve farmasötik endüstrilerinde, ışınlamanın jelleştirme için tercih edilen yöntem olmasının nedenleridir (Rosiak ve Ulanski, 1999; Park ve Nho, 2003; Shen ve ark., 2016).

20 kGy dozunda γ -ışın radyasyonu kullanıldığında, ağırlıkça %20'lik biyopolimer çözeltilerinden [örn., selüloz/IL/su, karboksimetil selüloz ve karboksimetil kitosan sulu çözeltileri], hidroksil radikallerinin yardımıyla sadece küçük bir miktar (%17-30) jel agregatı (topaklar) elde edilebilir (Hara ve ark., 2004; Wang ve ark., 2008; Kimura, Nagasawa ve Taguchi, 2014). Işınlama dozunun artırılması jel verimini arttırabilmektedir (Park ve Nho, 2003; Zhao ve ark., 2003; Zhao, Mitomo ve Yoshii, 2008).

Polimer zincirlerinin degradasyonu, özellikle yüksek enerjili dozlarda ve düşük polimer konsantrasyonlarında (ağırlıkça % 10) ışınlanma sırasında çapraz bağlanma ile rekabet eder ve bu da ağ yapısının tahrip olmasına ve gerilme mukavemetinin azalmasına neden olur (Zhao ve ark., 2003).

Çizelge 2.3’de gösterildiği gibi, C-H bağlarının radyasyona maruz kalmaları sonucunda kırılmalarıyla, makroradikallerin tercihen selülozun zayıflamış 1 ve 4 pozisyonlarında ortaya çıktığı, türevlerin makroradikallerinin ise radikal çapraz bağlama sırasında yan zincirlerde olduğu bildirilmiştir (Wach, Mitomo ve Yoshii, 2004; Wang ve ark., 2008).

2.4.4. Kompozit Hidrojeller

Hazırlanmaları konusunda bugüne kadar çok fazla temel araştırma yapılmasına rağmen, saf hidrojellerin, enjeksiyonlu termoset jeller (Shen ve ark., 2016), membran ayrımı (Zhang ve ark., 2001) ve aktif iyonların kapsüllemesi (Turner ve ark., 2004) gibi, sadece birkaç somut ve operasyonel uygulaması bulunmaktadır. Aslında, saf hidrojellerin çoğu, bazı yapısal eksikler veya özellik eksiklikleri nedeniyle belirli bir amaca uygun değildir. Başka bir polimer veya inorganik madde ile karıştırılarak, her iki bileşenin avantajları ile yeni yapısal malzemeler elde edilebilir ve bu da sonuçta elde edilen kompozit hidrojellerin çeşitli alanlarda cazibesini büyük ölçüde artırır (Shen ve ark., 2016).

Çizelge 2.3. Biyopolimerlerin (selüloz, kitin ve türevleri) yapıları ve radikal çapraz-bağlama sırasındaki olası makroradikalleri (Shen ve ark., 2016)

Biyopolimer	Makroradikal	
Selüloz		
Kitin		
Metilselüloz (MC)		
Hidroksietil selüloz (HEC)		
Hidroksipropilmetil selüloz (HPMC)		
Karboksümetil selüloz (CMC)		
Karboksümetil kitin (CMCh)		
Karboksümetil kitosan (CMCts)		

Kompozit hidrojelilerin hazırlama işlemleri, çözünme (veya dağılma) ve çapraz bağlanma dahil olmak üzere saf hidrojelilerin hazırlanma işlemlerine dayanır. Saf hidrojelilerin yapılmasıyla karşılaştırıldığında, doğal polimer bazlı hibrid hidrojelilerin yapılması sırasındaki tek ek adım, genellikle aynı çözücü kullanılarak hazırlanan iki biyopolimer çözeltisinin, çapraz bağlayıcı içeren veya içermeyen bir jele dönüştürülmeden önce karıştırılmasıdır (Shen ve ark., 2016).

Doğal polimerlerin, işlenmelerindeki kısıtlama ve mekanik özelliklerinden ötürü, yara örtü materyalleri olarak kullanımları sınırlıdır. Doğal ve sentetik polimerlerin birleştirilmesi bu noktada optimal özellikler sağlayabilir (Park ve Nho, 2003). Biyopolimer/sentetik polimer hidrojelilerin hazırlama işlemleri, sentetik polimerlerin [örn., Polietilen glikol (PEG) ve Polivinil alkol (PVA)] karışıma eklenmesi dışında, doğal polimer bazlı hibrid hidrojelinkilerle aynıdır (Nishio ve Manley, 1988; Lee, Kim ve Kim, 1996; Seves ve ark., 2001; Liang ve ark., 2008). Bununla birlikte, aşılama için, sentetik polimerin monomerleri, biyopolimer çözeltisinde, ısıtma (Williamson ve ark., 1998; Chauhan, Guleria ve Sharma, 2005), ışınlama [mikrodalga (Pandey ve Amin, 2013; Pandey ve ark., 2013), elektron-ışını (Said, Abd Alla ve El-Naggar, 2004; Amin ve ark., 2012), UV ışınlanması (Kelly ve ark., 2013)] veya her ikisinden sonra (Hanh, Huy ve Hien, 2015) genellikle bir başlatıcının yardımıyla homopolimerize edilir.

Polimerler çoğunlukla çapraz bağlanan veya parçalananlar olarak ayrılırlar. Suyla homojen karışımlarında PVA ve Poli-N-vinilpirolidon (PVP) kolaylıkla çapraz bağlanırlar (Park ve Nho, 2003). PVA, çeşitli membran ve hidrojelilerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılır (Bodugöz ve ark., 1999). PVP hidrojelilerinin biyo-uyumlulukları oldukça yüksektir ve yara örtüleri olarak kullanılırlar (Zhai ve ark., 2000). Gama ışınması kullanılarak PVA/PVP/gliserin/kitosan karışımından jellerin elde edildiği çalışmada, jel miktarının ve kuvvetinin ışınanın dozuyla paralel olarak arttığı belirlenmiştir (Park ve Nho, 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kitosanın Saflaştırılması

KH (C3646, Sigma-Aldrich, Almanya), literatürde belirtilen yöntem (Gan ve ark., 2005) esas alınarak saflaştırılmıştır. Buna göre; son derişim 0,1 g/ml olacak şekilde AMAR NEURO 102 A karıştırma fonksiyonlu otoklavın reaktörüne KH ve NaOH çözeltisi (1M) eklenmiştir. Söz konusu karışım, 70°C'de 1 saat 20 dakika boyunca 121 devir/dakika rotor hızında karıştırılmıştır. NaOH uygulanmış kitosan, aşındırıcı çözeltiden temizlenmek üzere; Buchner hunisi kullanılarak vakum altında süzöldükten sonra ultra-saf suyla yıkanmıştır. Yıkanan materyal, vakum etüvünde 40°C'de gece boyunca kurutulmuştur.

Kurutulan kitosan, derişimi 0,01 g/ml olacak şekilde asetik asit çözeltisinde (0,1M) manyetik karıştırıcı kullanılarak 135 devir/dakika'da 20 saat boyunca karıştırılarak çözülmüştür. Çözünmeyen partikül kalıntıları Buchner hunisi kullanılarak vakum altında ayrıştırılmıştır.

Filtratın pH'ını 8,0'a ayarlamak için NaOH çözeltisi (1M) kullanılarak, beyaz presipitat formunda kitosan elde edilmiştir. Kitosan presipitatu ultra-saf su kullanılarak iyice yıkanmıştır. Söz konusu materyal, -80°C'de 3 saat boyunca dondurulmuş ve 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir. Sonuçta, KS elde edilmiştir.

KH'nin saflığı, literatürde belirtilen yöntem (Gan ve ark., 2005) esas alınarak belirlenmiştir. Buna göre; KH ve KS materyalleri %0,5'lik asetik asit çözeltisinde çözülecek, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kızıl Ötesi ve Raman Spektroskopi Laboratuvarı'nda söz konusu materyallerin FT-IR (Fourier Transform Infrared) Spektroskopi ile transmittans spektrumları hizmet alımı yoluyla ortaya konulmuştur. Sonuçlara, atmosferik ayarlama (H₂O ve CO₂ için) ve taban çizgisi (baseline) düzeltmesi yapılmıştır. Saflık değerlendirmesi, söz konusu numunelerin FT-IR transmisyon piklerinin konumları karşılaştırılarak yapılmıştır.

Saflaştırma işleminin KH üzerindeki degradatif etkisini değerlendirmek üzere; KH ve KS'nin kütle dağılımları (Mn, Mw ve Mz), Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'da, Agilent Technologies 1200 Series marka ve modeli BDK cihazı kullanılarak hizmet alımı yoluyla belirlenmiştir. Yürütme işlemi, PL aquagel-

OH MIXED (PL1149, Agilent, Kaliforniya, ABD) kolonda, tampon olarak %0,5'lik asetik asit kullanılarak yapılmıştır. Numuneler yürütme tamponunda, derişimleri 2,5 mg/ml olacak şekilde gece boyunca çözülmüş ve enjekte edilmiştir (10 µl). Akış hızı 0,6 ml/dk'dır. Numunelerin mol kütlesi dağılımlarını ortaya koyabilmek için sapma endeksi detektöründen elde edilen veri GPC/SEC yazılımı (Agilent, Kaliforniya, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin çiziminde pullulan standartları (Mp = 180 – 708.000 g/mol) (PL2090, Agilent, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır.

Numunelerin kütlece ortalama polimerizasyon dereceleri Eşitlik 1 kullanılarak hesaplanmıştır. DP_w : Kütlece ortalama polimerizasyon derecesi, M_w : Kütlece ortalama mol kütlesi ve M_o : Tekrarlayan birimin mol kütlesi'dir.

$$DP_w = M_w/M_o \dots \dots \dots \text{(Eşitlik 1)}$$

Numunelerin kütlece ortalama polimerizasyon derecelerinin ortalaması Eşitlik 2 kullanılarak hesaplanmıştır. $\overline{DP_w}$; Kütlece ortalama polimerizasyon derecelerinin ortalaması, f ; Fraksiyon sayısı, DP_{w_i} ; i . fraksiyonun kütlece ortalama polimerizasyon derecesi, A_i ; i . fraksiyonun kütlesi, A_T ; Toplam kütle 'dir.

$$\overline{DP_w} = \sum_{i=1}^f \frac{DP_{w_i} \times A_i}{A_T} \dots \dots \dots \text{(Eşitlik 2)}$$

3.2. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi

Saflaştırma işleminin KH'nın asetil grupları üzerindeki degredatif etkisini değerlendirmek ve takip eden protonasyon reaksiyonlarındaki hesaplamalarda kullanılmak üzere; KH ve KS numunelerinin deasetilasyon dereceleri, 1H NMR spektrumundaki karakteristik piklerin integral değerleriyle (Çizelge 3.1.) literatürde belirtilen yöntem (Hirai, Odani ve Nakajima, 1991; Verheul ve ark., 2008) esas alınarak, Nova (Mestrelab, Santiago de Compostela, İspanya) adlı yazılımın yardımıyla hesaplanmıştır (Eşitlik 1 ve 2). Buna göre; her kitosan numunesinin 1,2 mg'ı, 500-600 µl %2 (w/w)'luk DCI/D₂O (hidroklorik asit-d₁/su-d₂) içinde çözülmüş ve bir NMR tüpüne aktarılmıştır. Kimyasal kaymalar, her numuneye internal referans ($\delta = 0$) olarak yaklaşık 1 mM eklenen NaTMSp'ye dayandırılmıştır. Numunenin 1H spektrumları, Slovenya Ulusal Kimya Enstitüsü NMR

Merkezi (SloNMR)'da, Agilent Technologies DD2 600 MHz NMR spektrofotometrede bir HCN Cold prob ile 47°C'de kaydedilmiştir.

KH ve KS numunelerinin asetilasyon derecelerinin hesaplanmasında Eşitlik 3, DD'lerinin hesaplanmasında ise Eşitlik 4 kullanılmıştır.

$$\% \text{ Asetilasyon} = \left(\frac{[CH3]}{[H2-H6]} \times 2 \right) \times 100 \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 3})$$

$$\% \text{ Deasetilasyon} = 100 - (\% \text{ Asetilasyon}) \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 4})$$

Çizelge 3.1. Kitosan numunelerinin asetilasyon derecelerinin hesaplanmasında kullanılan sinyal bölgelerinin atamaları.

Grup	δ_H (ppm)
2-NHAc	1.97-2.14
H1	4.60-5.80 ^a
H2-H6	3.05-4.23 ^b

^a Kitosan numuneleri için, H1 sinyalleri rezidüel çözücü sinyaliyle çakıştığından H2-H6 protonlarının sinyalleri değerlendirilmiştir.

^b Kitosan numuneleri için aralık.

3.3. Kitosan Türevleri

3.3.1. Protonlanmış Kitosan Türevleri

3.3.1.1. Kitosan Asetat Türevlerinin Hazırlanması

Kitosan asetat türevi (K-Ac) literatürde belirtilen yöntem (Rinuado, Pavlov ve Desbrieres, 1999; McCarthy ve ark., 2005) esas alınarak hazırlanmıştır. Kitosan asetat karışımını hazırlamak üzere; önce öğütülen sonra bir elek yardımıyla elenen KS numunesinin 0,25 gramı ultra-saf suda bir manyetik karıştırıcı kullanılarak disperse edilmiştir (500 rpm). Karıştırma işlemi devam ettirilirken, söz konusu dispersiyona 262 µl glasiyal asetik asit (100063, Merck, Almanya) ve toplam hacim 50 ml olacak şekilde ultra-saf su eklenmiştir. Denge, ~25°C'da 24 saatten sonra kurulmuş ve pH ölçümüyle kontrol edilmiştir. Kitosan asetat süngerini elde etmek üzere, söz konusu karışım -80°C'de 3 saat boyunca dondurulmuş ve 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

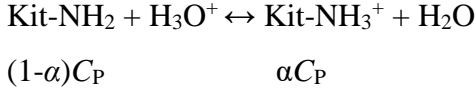
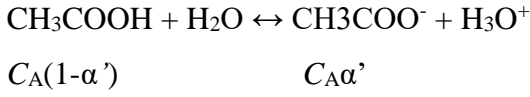
3.3.1.2. Kitosan Sitrat Türevinin Hazırlanması

Kitosan sitrat türevi (K-Ci)'yi elde etmek üzere; önce öğütülen sonra bir elek yardımıyla elenen KS'nin 0,25 gramı ultra-saf suda bir manyetik karıştırıcı kullanılarak disperse

edilmiştir (500 rpm). Karıştırma işlemi devam ettirilirken, söz konusu dispersiyonun içine 254,9 mg sitrik asit (251275, Sigma-Aldrich, Almanya) ve toplam hacim 50 ml olacak şekilde ultra-saf su eklenmiştir. Denge, 25°C’da 96 saatten sonra kurulmuş ve pH ölçümüyle kontrol edilmiştir. Kitosan sitrat süngerini elde etmek üzere, söz konusu karışım -80°C’de 3 saat boyunca dondurulmuş ve 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

3.3.1.3. Protonasyon Derecelerinin Belirlenmesi

Protonasyon derecelerini belirlemek üzere literatürde (Rinaudo, Pavlov ve Desbrieres, 1999) verilen yaklaşım kullanılmıştır. Buna göre:



α' asetik asitin ayrışma derecesi, α kitosanın protonasyon derecesi, C_A ve C_P , sırasıyla toplam asit ve polimer derişimleridir.

Zayıf asit, ayrışma sabitiyle karakterize edilebilir:

$$K = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COOH}]} = [\text{H}_3\text{O}^+](\alpha'|1 - \alpha') \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 5})$$

Ayrışma derecesi α' , kitosan varlığında direkt olarak H_3O^+ derişiminden etkilenmektedir ve α'' olarak tanımlanabilir.

pH ölçümleri kullanılarak belirlenen H_3O^+ etkin derişimi, eşitlikte yerine konulursa α'' hesaplanabilir.

Elektronötralite prensibine göre:

$$C_{A\alpha''} = C_P\alpha + [\text{H}_3\text{O}^+] \rightarrow$$

$$\alpha = (\alpha''C_A - [\text{H}_3\text{O}^+]) / C_P \text{ dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 6})$$

Kit-NH₃⁺ ‘nın belirgin ayrışma sabiti:

$$K_a = [\text{H}_3\text{O}^+](1-\alpha)/\alpha \text{ dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 7})$$

Söz konusu eşitlikler iyonik kuvvet (I) 'nın 0 olduğu yani ideal çözelti koşullarında geçerlidir. Sentez karışımlarındaki serbest iyonların K değeri ve dolayısıyla PD (Protonasyon Derecesi) üzerindeki etkisini değerlendirmek üzere literatürde (Kennedy; 1990) verilen yaklaşım kullanılmıştır:

Monoprotik bir asitin ayrışması aşağıdaki şekilde verilebilir;



Sadece molar derişim üzerinden ifade edildiğinde, ayrışma sabiti $K_{A(DER)}$;

$$K_{A(DER)} = [H^+] [A^{z-1}] / [HA^z] \text{ dir.....(Eşitlik 8)}$$

Tüm türler, $K_{A(DER)}$ 'i sıfır iyonik kuvvette alacağı değerde koruyacak etkin derişimler veya aktiviteler olarak tanımlanırsa;

$$K_{A(TERM)} = a_{H^+} \cdot a_{A^{z-1}} / a_{HA^z} \text{ elde edilir.....(Eşitlik 9)}$$

$K_{A(TERM)}$, tüm iyonik kuvvet değerlerinde sabit olan termodinamik asit ayrışma sabitidir. Uygulamada ne Eşitlik 11 ne de Eşitlik 12 kullanışlıdır, çünkü cam pH elektroduyla ölçülen H^+ , $-\log a_{H^+}$ 'ya $-\log [H^+]$ 'dan daha kesin tepki verirken, zayıf asit ve tuzları gerçek molar derişimler olarak hesaplanmaktadır. Dolayısıyla söz konusu durumda, K_A 'nın en kullanışlı şekli aşağıdaki gibi verilen karma asit ayrışma sabitidir;

$$K_{A(KAR)} = a_{H^+} \cdot [A^{z-1}] / [HA^z] \text{.....(Eşitlik 10)}$$

Eşitlik 11'deki asitin ayrılmış ve ayrılmamış formları, molar derişimlerinin aktivite katsayılarıyla (f) çarpımı olarak ifade edilirse, karma ve termodinamik ayrışma sabitleri arasındaki ilişki;

$$K_{A(TERM)} = K_{A(KAR)} \cdot f_{A^{z-1}} / f_{HA^z} \rightarrow$$

$$K_{A(KAR)} = K_{A(TERM)} \cdot f_{HA^z} / f_{A^{z-1}} \text{ 'dir.}$$

Asetik asit için $z = 0$ olduğundan;

$$K_{A(KAR)} = K_{A(TERM)} \cdot f_{HA(0)} / f_{A(-1)} \text{ 'dir.....(Eşitlik 11)}$$

Aktivite katsayılarının hesaplanmasında kullanılan Guggenheim ve Schindler eşitliği I (iyonik kuvvet) = 0,1'e kadar hassastır:

$$\log f_i = -A \cdot z_i^2 \sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}) \text{ dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 12})$$

z_i i iyonunun yüküdür, çözücünün sıcaklığı ve dielektrik sabiti ile değişen A sabiti aşağıdaki şekilde hesaplanabilir;

$$A = 1,824 \cdot 10^6 \times (\epsilon T)^{-3/2} \text{ dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 13})$$

ϵ suyun dielektrik sabiti, T ise Kelvin ölçeğindeki sıcaklıktır.

Dielektrik su sabitinin 0,1° - 99°C aralığında ölçülen değerleri aşağıdaki eşitliğe uyar (Malmberg ve Maryott, 1956):

$$\epsilon = 87,740 - 0,40008t + 9,398(10^{-4})t^2 - 1,410(10^{-6})t^3 \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 14})$$

t, santigrat cinsinden sıcaklığın derecesidir.

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2 \text{ dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 15})$$

c_i , i iyonunun molar konantrasyonudur.

Asetik asit için;

$$\log f_{\text{HA}(0)} = -A \cdot 0^2 \sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}) = 0 \rightarrow f_{\text{HA}(0)} = 10^0 = 1 \rightarrow$$

Eşitlik 12'den aşadaki eşitliğe ulaşılır;

$$K_{\text{A(KAR)}} = K_{\text{A(TERM)}} / f_{\text{A}(-1)} \text{ dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 16})$$

Asetat iyonu için Eşitlik 13'den aşağıdaki eşitliğe ulaşılır;

$$\log f_{\text{A}(-1)} = -A \cdot (-1)^2 \sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}) = -A \cdot \sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}) \text{ 'dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 17})$$

z yüklü bir monoprotik asit olan asetik asit için Eşitlik 17 ve Eşitlik 18'den;

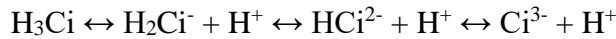
$$pK_{A(KAR)} = pK_{A(TERM)} - A \cdot \sqrt{I} / (1 + \sqrt{I}) \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 18})$$

elde edilir.

Sitrik asitin n. ayrışması için ise;

$$pK_{A(KAR),n} = pK_{A(TERM),n} - A \cdot \sqrt{I} (2n-1) / (1 + \sqrt{I}) \text{ 'dir} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 19})$$

Sitrik asitin ayrışması aşağıdaki şekilde verilebilir;



Sitrik asitin n. ayrışması için asit ayrışma sabitleri;

$$K_{A(1)} = \frac{aH^+ [H_2Ci^-]}{[H_3Ci]} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 20})$$

$$K_{A(12)} = K_{A(1)} \times K_{A(2)} = \frac{aH^+ [H_2Ci^-]}{[H_3Ci]} \times \frac{aH^+ [HCl^{2-}]}{[H_2Ci^-]} = \frac{aH^{+2} [HCl^{2-}]}{[H_3Ci]} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 21})$$

$$K_{A(123)} = K_{A(1)} \times K_{A(2)} \times K_{A(3)} = \frac{aH^+ [H_2Ci^-]}{[H_3Ci]} \times \frac{aH^+ [HCl^{2-}]}{[H_2Ci^-]} \times \frac{aH^+ [Ci^{3-}]}{[HCl^{2-}]} = \frac{aH^{+3} [Ci^{3-}]}{[H_3Ci]} \text{ ,dir.} \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 22})$$

3.3.2. Trimetil Kitosan Türevi

3.3.2.1. Trimetil Kitosan Türevinin Hazırlanması

TMK türevini elde etmek üzere literatürde belirtilen yöntem (Sieval ve ark., 1998) kullanılmıştır. Buna göre; 2 g KS öğütülüp elekten geçirildikten sonra, 4,8 g sodyum iyodür, 11 ml %15'lik sulu sodyum hidroksit çözeltisi ve 11,5 ml metil iyodür ile birlikte 80 ml 1-metil-2-pirolidon içinde, su banyosu kullanılarak 60°C'de 1 saat boyunca 1000 rpm'de karıştırılmıştır. Metil iyodürü reaksiyon karışımında tutabilmek üzere Allihn Yoğunlaştırıcısı kullanılmıştır. Ürün, 35 ml etanol kullanılarak çöktürülmüş ve santrifüjleme (3500 rpm, 15 dk) ile izole edilmiştir. Süpernatant döküldükten sonra, presipitat 200 ml dietil eter ile yıkanmıştır. İzolat, 80 ml 1-metil-2-pirolidon içinde, su banyosu kullanılarak 60°C'de 1 saat boyunca 1000 rpm'de karıştırılmıştır. Çözeltinin içine 4,8 g sodyum iyodür, 11 ml %15'lik sulu sodyum hidroksit çözeltisi ve 7 ml metil iyodür eklenmiştir. Karıştırma işlemi 60°C'de 30 dk boyunca devam ettirilmiştir. Daha sonra, çözeltinin içine 2 ml metil iyodür ve 0,6 g sodyum hidroksit eklenmiş ve karıştırma işlemi

1 saat boyunca devam ettirilmiştir. Hazırlanan ürün, iyotu klorla değiştirmek üzere 40 ml %10'luk sulu sodyum klorür (S7653, Sigma-Aldrich, Almanya) içinde çözülmüştür. Ürün etanol ile (1:2) çöktürüldükten sonra santrifüjleme (3500 rpm, 15 dk) ile izole edilmiştir. Süpernatant dökülmüş ve izolat 200 ml etanol ile yıkandıktan sonra tekrar santrifüjleme (3500 rpm, 5 dk) yapılmıştır. Son olarak, izolat 200 ml dietil eter ile yıkanmış, santrifüjleme ile izole edilmiş (3500 rpm, 5 dk) ve vakum etüvünde 40°C'de gece boyunca kurutularak TMK elde edilmiştir.

3.3.2.2. Trimetil Kitosan Türevinin Saflaştırılması

TMK türevinin saflığı, söz konusu numunenin ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronükleer Tek Kuantum Korelasyonu) ve ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu) spektrumlarındaki korelasyonlara dayanılarak SloNMR'da değerlendirilmiştir.

Ek saflaştırma işlemi, Sieval ve ark. (1998)'in önerdiği metot modifiye edilerek, TMK'nın kristallendirilmesi yoluyla uygulanmıştır. Buna göre; söz konusu türev ultra-saf suda çözülmüştür (4 mg/ml). Çözeltinin derişimi, vakumlu evaporatör (60°C, 50 rpm) kullanılarak, 40 mg/ml olacak şekilde arttırılmıştır. Beherdeki çözelti buz kabının içine konulmuş ve presipitasyon sağlanmıştır. Sonra, etanol kullanarak ekstra presipitasyon sağlanmış, presipitat ayrılmış ve 'TMKa' olarak adlandırılmıştır. Daha sonra, süpernatana dietil eter uygulanarak tekrar presipitasyon sağlanmıştır. Dietil eter uygulaması sonucu elde edilen fraksiyon, naylon filtre kullanılarak (Millipore, NY1104700, İrlanda) vakum altında dietil eterle yıkanmış ve 'TMKb' olarak adlandırılmıştır. Saflaştırma protokolünün verimini değerlendirmek üzere, TMKb fraksiyonu, SloNMR'da, ^1H -NMR spektroskopisiyle analiz edilmiştir.

Trimetilasyon işleminin KS üzerindeki degradatif etkisini değerlendirmek üzere; TMK fraksiyonlarının kütle dağılımları (M_n , M_w ve M_z), UNAM'da, Agilent Technologies 1200 Series marka ve modelli boyut dışlama kromatografisi (BDK) cihazı ile hizmet alımı yoluyla belirlenmiştir. Yürütme işlemi, PL aquagel-OH MIXED (PL1149, Agilent, Kaliforniya, ABD) kolonda, tampon olarak ultra-saf su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TMK numunesi yürütme tamponunda, derişimi ~2,5 mg/ml olacak şekilde gece boyunca çözülmüş ve enjekte edilmiştir (10 μl). Akış hızı 0,6 ml/dk'dır. Numunelerin mol kütleleri dağılımlarını ortaya koyabilmek için sapma endeksi detektöründen elde edilen veri GPC/SEC yazılımı (Agilent, Kaliforniya, ABD) kullanılarak analiz edilmiştir. Kalibrasyon

eğrisinin çiziminde pullulan standartları ($M_p = 180 - 708.000 \text{ g/mol}$) (PL2090, Agilent, Kaliforniya, ABD) kullanılmıştır.

TMKb'nin 0,325 gramı bir erlene aktarılıp toplam hacim ultra-saf su kullanılarak 50 ml'ye tamamlanmıştır (kitosan ana zincirinin derişimi 5 mg/ml'dir – Ek 1E). İçerik, bir manyetik karıştırıcı kullanılarak (500 rpm) 24 saat boyunca 25°C'da inkübe edilmiştir. TMKb süngerini elde etmek üzere, söz konusu çözelti -80°C'de 3 saat boyunca dondurulmuş ve 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir.

3.3.2.3. Trimetil Kitosan Türevinin Deasetilasyon ve Metilasyon Derecelerinin Belirlenmesi

TMKb fraksiyonunun deasetilasyon ve metilasyon dereceleri, 1H NMR spektrumundaki karakteristik piklerin integral değerleriyle (Çizelge 3.2) literatürde belirtilen yöntemler (Hirai, Odani ve Nakajima, 1991; Verheul ve ark., 2008) esas alınarak, Nova (Mestrelab, Santiago de Compostela, İspanya) adlı yazılımın yardımıyla hesaplanmıştır (Eşitlik 21 - 24). Buna göre; 1,25 mg TMKb, 600 µl D₂O (su-d₂) içinde çözülmüş ve bir NMR tüpüne aktarılmıştır. Kimyasal kaymalar, her numuneye internal referans ($\delta = 0$) olarak yaklaşık 1mM eklenen NaTMSP'ye dayandırılmıştır. Numunelerin 1H spektrumları, SloNMR'da Agilent Technologies DD2 600 MHz NMR spektrometrede bir HCN Cold prob ile 47°C'de kaydedilmiştir.

Çizelge 3.2. Metillenmiş kitosan türevlerinin asetilasyon ve metilasyon derecelerinin hesaplanmasında kullanılan sinyal bölgelerinin atamaları.

Grup	δH (ppm)
2-NHAc	1.97-2.14
2-NHMe	2.82-2.92
2-NMe ₂	2.97-3.13
2-NMe ₃ ⁺	3.28-3.38
6-OMe	3.42-3.48
3-OMe	3.50-3.56
H1	4.60-5.80

1H NMR sinyal bölgelerinin atamaları, TMK'nın aynı spektrometrede kaydedilen 2D COSY (Korelasyon Spektroskopisi), ¹H-¹³C HSQC ve ¹H-¹³C HMBC spektrumlarındaki (EK 2B) korelasyonlara dayanarak, SloNMR'da, doğrulanmıştır.

TMKb numunesinin asetilasyon derecesinin hesaplanmasında Eşitlik 23, DD'sinin hesaplanmasında ise Eşitlik 4 kullanılmıştır.

$$\% \text{ Asetilasyon} = \left(\frac{[CH_3]}{[H]} \times \frac{1}{3} \right) \times 100 \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 23})$$

TMKb numunesinin N,N,N-trimetilasyon derecesinin hesaplanmasında Eşitlik 24 kullanılmıştır.

$$\% -N^+Me_3 = \left(\frac{[(CH_3)_3]}{[H]} \times \frac{1}{9} \right) \times 100 \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 24})$$

TMKb numunesinin 3-O-metilasyon derecelerinin hesaplanmasında Eşitlik 25 kullanılmıştır.

$$\% 3-OMe = \left(\frac{[(3-OCH_3)]}{[H]} \times \frac{1}{3} \right) \times 100 \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 25})$$

TMKb numunesinin 6-O-metilasyon derecelerinin hesaplanmasında Eşitlik 26 kullanılmıştır.

$$\% 6-OMe = \left(\frac{[(6-OCH_3)]}{[H]} \times \frac{1}{3} \right) \times 100 \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 26})$$

3.5. Kitosan ve Türevlerinin Çözünürlüklerinin Belirlenmesi

Hemostat olarak kullanılacak materyalin, uygulama bölgesinden ayrılarak embolizasyon riski oluşturmasını engellemek üzere, çözünürlüğünün düşük olması tercih edilmelidir. Kitosan ve elde edilen türevlerinin çözünürlükleri literatürde belirtilen yöntem (Verheul ve ark., 2008) esas alınarak belirlenmiştir. Türevlendirme yöntemlerinin, kitosan ana zincirinin çözünürlüğü üzerindeki etkisini belirlemek üzere; 5 mg/ml kitosan ana zincirini içeren numunelerin sulu karışımlarının 25°C ve 500 nm'deki % transmitansları (%T₅₀₀) Biochrom Libra S70 marka ve modellenli UV/Vis spektrofotometre ile ölçülmüştür.

3.6. *In silico* Etkinlik Tayini

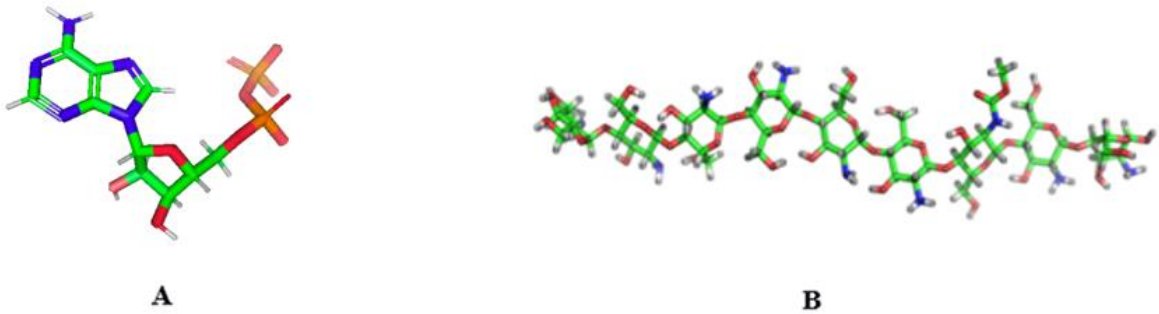
3.6.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarıyla, kitosanın trombosit agregasyonu ve

pıhtılaşma üzerindeki etki mekanizmalarının kısmen açıklanması hedeflenmiştir. Bu amaçla, P2Y₁₂R ve GpIIb/IIIa trombosit reseptörlerinin yanında, fibrinojenle kitosanın etkileşimleri doking çalışmalarıyla saptanarak söz konusu mekanizmalar ortaya konulmuştur.

3.6.1.1. P2Y₁₂ Reseptörü (P2Y₁₂R) Doking Çalışmaları

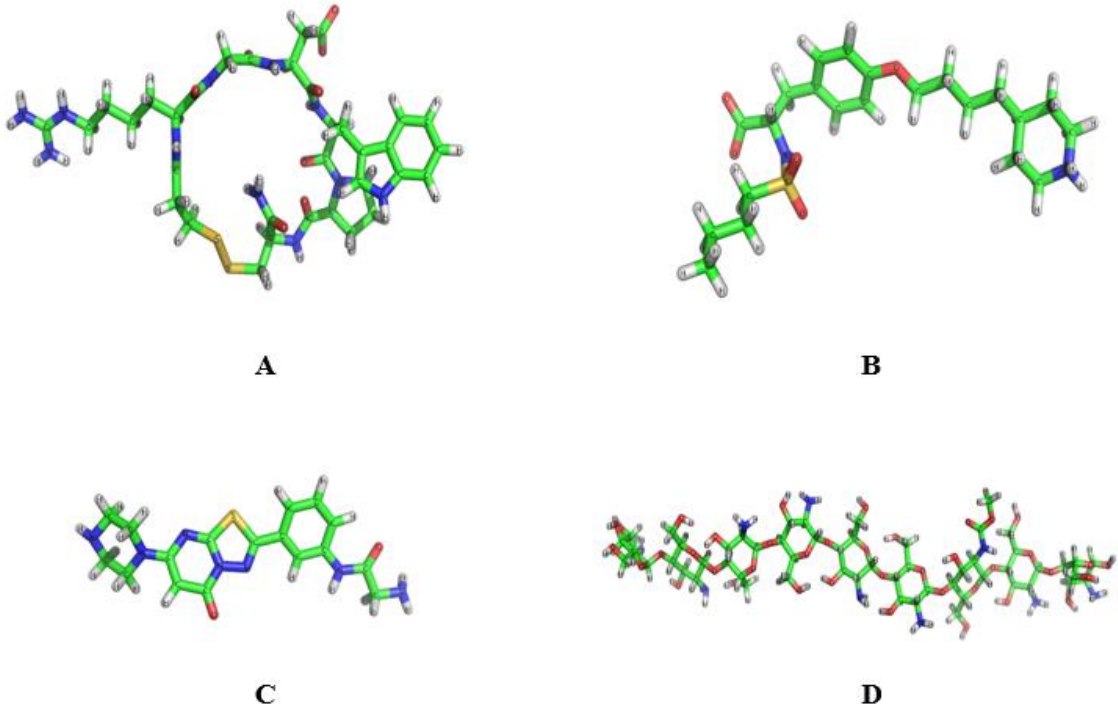
P2Y₁₂R'nin kitosanla etkileşiminin ortaya konulduğu doking çalışmasından önce, söz konusu reseptörün, referans ligandı ADP ile etkileşimi değerlendirilmiştir. Bu ön çalışmadan sonra, aynı reseptör üzerinden kitosanın agonist etkisi incelenilmiştir. Doking çalışması, AutoDock Vina yazılımıyla (The Scripps Research Institute, CA, ABD) Genetik Algoritma (LGA) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AutoDock/Vina PyMOL grafik arayüzü (<http://www.user.gwdg.de/~dseelig/adplugin.html>), reseptör ve ligandların PDBQT [Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)] dosyalarını hazırlamak için kullanılmıştır. ADP ve Kitosan ligandlarının yapıları Zinc veri tabanından (<http://zinc.docking.org>) elde edilmiş ve PyMOL kullanarak PDB biçimine dönüştürülmüştür (Şekil 3.1). Protein P2Y₁₂ yapısı (PDB ID 4PY0) Protein Data Bank'dan elde edilmiştir. Su molekülleri çıkartılmıştır. Protein reseptör ve ligandların tüm hidrojen Gasteiger yükleri hesaplanmış, ilave edilmiş ve polar olmayan hidrojen birleştirilmiştir. Reseptörün aktif yöresinde bulunan ADP kullanarak, 22.50 Å _ 22.50 Å _ 22.50 Å üç boyutlu doking gridleri oluşturulmuştur. Doking metodu, varsayılan LGA parametreleriyle gerçekleştirilmiştir. Yapışma modu analizi, bağlama enerjisi hesabı ve sabitlenmiş konformasyonlarının bağlanma aktivitesinin tahmini AutoDock/Vina PyMOL eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Zinc veritabanından elde edilen ve PDB biçimine dönüştürülen ADP (A) ve Kitosan (B) ligandlarının yapıları.

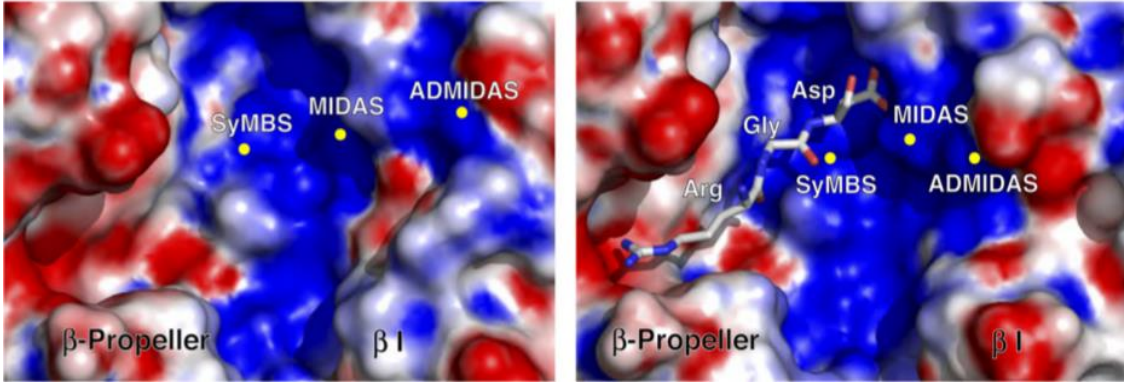
3.6.1.2. Glikoprotein IIb/IIIa Doking Çalışmaları

GPIIb/IIIa'nın kitosanla etkileşiminin ortaya konulduğu doking çalışmasından önce, söz konusu reseptörün, referans antagonist ligandları İntegrilin, Tirofiban ve RUC-2 ile etkileşimleri değerlendirilmiştir. Antagonist doking çalışması, AutoDock Vina yazılımıyla LGA yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AutoDock/Vina PyMOL grafik arayüzü, reseptör ve ligandların PDBQT dosyalarını hazırlamak için kullanılmıştır. İntegrilin, Tirofiban, RUC-2 ve Kitosan yapıları Zinc veri tabanından elde edilmiş ve PyMOL kullanarak PDB biçimine dönüştürülmüştür (Şekil 3.2). GPIIb/IIIa reseptör yapısı (PDB İD 3FCU) Protein Data Bank'dan elde edilmiştir. Su molekülleri çıkartılmıştır. Protein reseptör ve ligandların tüm hidrojen Gasteiger yükleri hesaplanmış, ilave edilmiş ve polar olmayan hidrojenlerle birleştirilmiştir. Reseptörün aktif yöresinde bulunan kalsiyum ve magnezyum iyonlarının Metal İyon Bağımlı Yapışma Bölgesi (MIDAS) konumu kullanılarak, 68 Å _ 68 Å _ 68 Å üç boyutlu doking gridleri (Şekil 3.3A) oluşturulmuştur. Doking metodu, varsayılan LGA parametreleriyle gerçekleştirilmiştir. Yapışma modu analizi, bağlama enerjisi hesabı ve sabitlenmiş konformasyonlarının bağlanma aktivitesinin tahmini AutoDock/Vina PyMOL eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Zinc veritabanından elde edilen ve PDB biçimine dönüştürülen İntegrilin (A), Tirofiban (B), RUC-2 (C) ve Kitosan (D) ligandlarının ve yapıları.

Ön çalışmadan sonra, Kitosan kullanılarak agonist doking çalışması gerçekleştirilmiştir. Fibrinojendeki Arg-Gly-Asp tripeptid dizisi, GpIIb/IIIa reseptörü ile bağlanmadan sorumlu olan peptid yapısıdır (Zhu ve ark., 2008). Bu nedenle, kristal halinde bulunan söz konusu tripeptid dizisinden GpIIb/IIIa reseptöründe doking gridleri oluşturmada yararlanılmıştır (Şekil 3.3B).



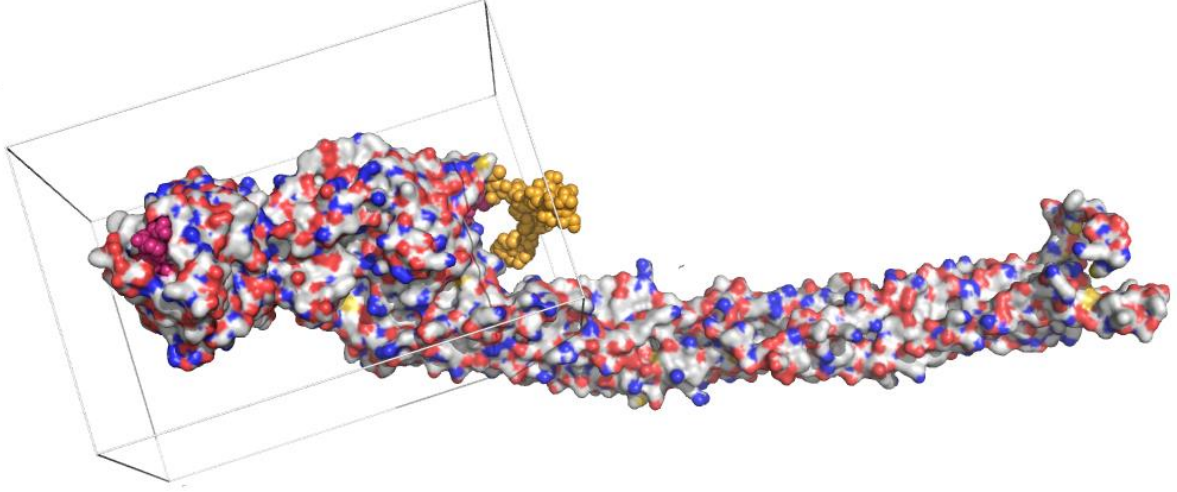
Şekil 3.3. Reseptörün aktif yoresinde bulunan kalsiyum ve magnezyum iyonlarının MIDAS, ADMIDAS (Metal İyon Bağımlı Yapışma Bölgesi Yanı) ve SyMBS (Sinerjistik Metal İyon-Bağlanma Bölgesi) konumları (A), Arg-Gly-Asp tripeptid dizisinden GpIIb/IIIa reseptöründe doking gridleri oluşturulması (B).

3.6.1.3. Fibrinojen Doking Çalışmaları

Fibrinojen üzerinde yapılan doking çalışması için insan fibrinojeni ile kitosan kullanılmıştır. Doking çalışması, AutoDock Vina yazılımıyla LGA yöntemi kullanılarak yapılmıştır. AutoDock/Vina PyMOL grafik arayüzü, reseptör ve ligandların PDBQT dosyalarını hazırlamak için kullanılmıştır. Ligand olarak kullanılan Kitosanın yapısı Zinc veri tabanından (<http://zinc.docking.org>) elde edilmiş ve PyMOL kullanarak PDB biçimine dönüştürülmüştür. Hedef olarak seçilen insan fibrinojeni (PDB ID 3GHG), Protein Data Bank'dan temin edilmiştir. Su molekülleri çıkartılmıştır. Protein reseptör ve ligandın, tüm hidrojenlerinin Gasteiger yükleri hesaplanmış, ilave edilmiş ve polar olmayan hidrojen birleştirilmiştir. Kör doking metodu kullanarak daha büyük bir aktif yörede, 105 Å _ 84 Å _ 68 Å üç boyutlu doking gridleri oluşturulmuştur (Şekil 3.4). Doking metodu, varsayılan LGA parametreleri ile gerçekleştirilmiştir. Yapışma modu analizi, bağlama enerjisi hesabı ve sabitlenmiş konformasyonlarının bağlanma aktivitesinin tahmini AutoDock/Vina PyMOL eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Moleküler Dinamik Çalışmaları

Moleküler dinamik (MD) simülasyon yaklaşımı kullanarak, kitosan ve türevlerinin, eritrosit membran modeliyle etkileşimi Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda incelenmiştir. Böylece, kitosan türevlerinin moleküler olarak, kanın pıhtılaşma sürecinde eritrositlerle etkileşim mekanizmasının açıklanabilmesi hedeflenmiştir.



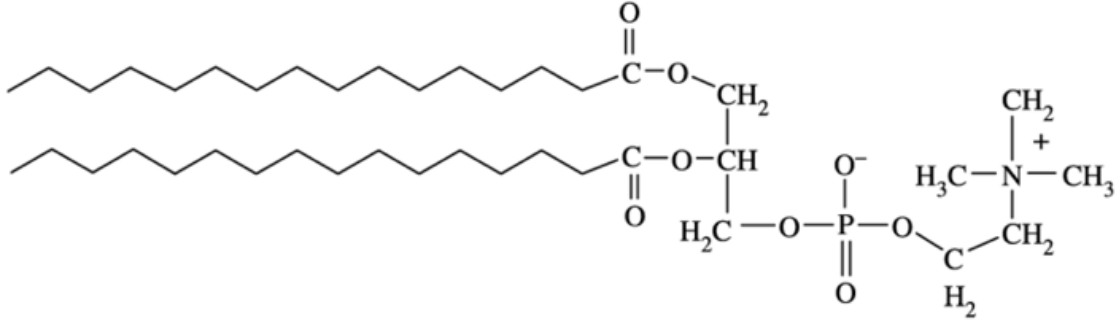
Şekil 3.4. Fibrinojenin yapısı ve kör doking metodu kullanarak oluşturulan doking gridleri.

Söz konusu çalışmalar kapsamında öncelikle bir MD sistemi oluşturulmuştur. Bu sistem içinde kitosan ve türevleri, bilayer membran, su molekülleri, iyon ve tuzlar bulunmaktadır.

Başlangıç yapısı olarak Kitin, GLYCAM oligosakkarit kurucusu (<http://glycam.org/tools/molecular-dynamics/oligosaccharide-builder/build-glycan?id=1>) kullanılarak oluşturulmuştur. Kitin yapısı, manuel olarak asetil gruplarının çıkartılmasıyla kitosan molekülüne dönüştürülmüştür. Çalışmalarda, %100 deasetile D alfa zinciri ve D beta zinciri kitosan formları kullanılmıştır. Zincirler; nötr kitosan, protonlanmış kitosan, dimetil kitosan ve trimetil kitosan olmak üzere 4 grupta sınıflandırılmıştır. Söz konusu polimerlerin her biri 10 monomer alt birimini içermektedir.

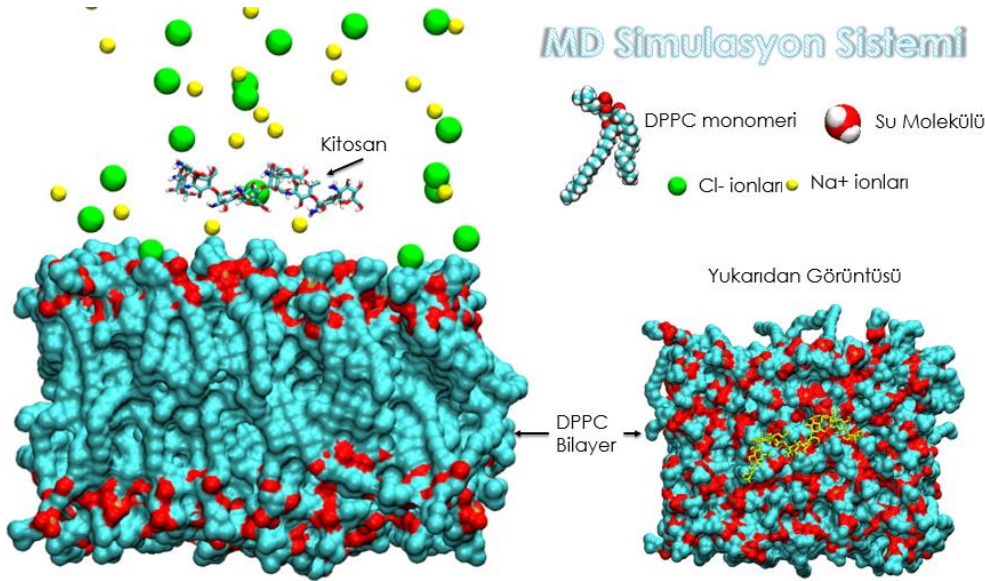
Fosfatidilkolinler, baş grubu olarak kolin içeren bir fosfolipit sınıfıdır. Bu tür fosfolipidler, kırmızı kan hücrelerinin özellikle dış tabakasında en yaygın olarak bulunan hücre zar lipidlerindedir (Mohandas ve Gallagher, 2008). Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC) membranı MD simülasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu nedenlerden

ötürü, eritrosit membranını modellemek için DPPC molekülünden (Şekil 3.5) oluşturulan DPPC membranı seçilmiştir.



Şekil 3.5. DPPC molekülünün yapısı (Yuan, Jameson ve Murad, 2009).

Su molekülleri TIP3P su modeli olarak, kullanılan iyonlar ise, sodyum ve klor atomları olarak seçilmiştir. MD simülasyon için bilayer DPPC, su molekülleri ve iyonlar Desmond MD kodu (D. E. Shaw Research, NY, ABD) kullanılarak oluşturulmuştur. Simülasyon sistemi Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Pozitif yüklü simülasyon elemanları (protonlanmış kitosan ve N-trimetil kitosan), 10 adet klor iyonu ile nötrale edilmiştir. Simülasyon sisteminin sıcaklığı 37°C ve basıncı 1.01325 bar olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3.6. Kitosan ve DPPC membranı simülasyon sistemi.

Tüm MD simülasyonları Desmond MD kodu kullanılarak oluşturulmuş ve Maestro Release 2016-3 yazılımı (<https://www.schrodinger.com/news/announcing-schrodinger-software-release-2016-3>) kullanılarak görüntülenmiştir. MD simülasyon sistemleri hazırlandıktan sonra, MD simülasyon üretimi, Evias® Yüksek Performanslı Hesaplama Kümesinde GPU hızlandırılmalı Nvidia® Kartları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir MD simülasyonu, 3 kere tekrarlanmış ve toplamda 24 tane MD simülasyonu üretilmiştir. Sonuçta, her sistemin 100 ns'lik bir MD simülasyonu ve 1000 farklı konformasyon görüntüsü (frame) elde edilmiştir.

Elde edilen MD simülasyon verileri daha sonra analiz edilmiştir. Görsel tespit analizinden sonra diğer nicel analizler yapılmıştır. Nicel analizler kapsamında RMSD (Atomik pozisyonların karelerinin ortalamasının karekökünün sapması) ve iyonik/elektrostatik etkileşim analizleri gerçekleştirilmiştir. RMSD analizleri, VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) programı kullanılarak hesaplanmıştır. İyonik/elektrostatik etkileşimler, Discovery Studio yazılımları (<http://www.3dsbiovia.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php>) kullanılarak hesaplanmıştır. İyonik/elektrostatik etkileşimleri değerlendirmek için hesaplanan etkileşim mesafeleri 3Å, 5Å ve 8Å olarak seçilmiştir. Nicel analiz sonuçlarını grafiksel olarak görüntülemek için Python (<https://www.python.org>) ve Matplotlib (<https://matplotlib.org>) yazılımları kullanılmıştır.

3.7. Jelleştirme

PVA (Sigma-Aldrich, P8136, Almanya)/PVP (Fluka, 81438, ABD)/gliserin (Palmera, Malezya)/K-Ci ve PVA/PVP/gliserin/TMK kompozit hidrojelleri literatürde belirtilen yöntem (Park ve Nho, 2003) esas alınarak hazırlanmıştır. Buna göre; PVA/PVP (6/4 içerik) 90°C'deki ultra-saf suda çözülmüş ve daha sonra manyetik karıştırıcı kullanılarak oda sıcaklığında gliserin ve KS türevleriyle karıştırılmıştır. Gliserinin derişimi ağırlıkça %3, kitosan ana zincirinin derişimi ağırlıkça %0,3 ve PVA/PVP/gliserin/kitosan (ana zincir) çözeltilerinin katı derişimi ağırlıkça %15'tir.

PVA/PVP/gliserin/kitosan türevi çözeltilerini fiziksel olarak çapraz bağlamak üzere; söz konusu çözeltilerden 5'er mg katı içeriğe (PVA/PVP/gliserin/kitosan ana zinciri) sahip hacim, ayrı viyallere aktarılarak "dondurma – çözme" döngüsü 3 kere tekrarlanmıştır. Her dondurma çözme döngüsü, sıcaklığın 1 saat süreyle -85°C'ye indirilmesinden sonra, 45dk süreyle oda sıcaklığında çözme işleminin gerçekleştirilmesinden oluşmaktadır. Söz konusu

döngülerin uygulanması sonucu kriyojeller; Jel-1K (K-Ci içeren jel) ve Jel-2K (TMK içeren jel) elde edilmiştir.

Alternatif olarak, PVA/PVP/gliserin/kitosan türevi kompozit hidrojelleri literatürde belirtilen yöntem (Hiep ve ark., 2003) modifiye edilerek hazırlanmıştır. Buna göre, viyallerdeki 5'er mg katı içeriğe (PVA/PVP/gliserin/kitosan ana zinciri) sahip çözeltiler, 90 sn süreyle 800 W dozunda mikrodalga ışımasıyla jelleştirilmiştir. Elde edilen hidrojeller; Jel-1M (K-Ci içeren jel) ve Jel-2M (TMK içeren jel) olarak adlandırılmıştır.

3.8. İn vitro Etkinlik Tayini

Biri boş kontrol olmak üzere toplamda 9 örneğin WHBCT'si, Lee ve White yöntemi (Janvikul ve ark., 2006) modifiye edilerek, Başkent Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı'nda değerlendirilmiştir. KS ve türevleri için, 5'er mg kitosan ana zincirini içeren numune üçer adet viyale eklenmiştir. Jeller için ise, 5 mg katı içerik bulunduran numune üçer adet viyale eklenmiştir. Sitratlü tüplere (VACUETTE® TUBE 2 ml 9NC Coagulation sodium citrate 3.2%) sağlıklı bir gönüllüden toplam 30 ml taze kan alınmıştır. Kan, 1'er ml'lik hacimlerde viyalere konulmuştur. Pıhtılaşma reaksiyonları, 0,5 M'lık CaCl₂ çözeltisinden viyalere 30'ar µl eklenerek başlatılmıştır. Kan pıhtılaşması, viyal ters çevrildiğinde kan akışının durması olarak tanımlanmıştır. WHBCT, kan ekleme işleminin başlangıcından her üç viyaldeki kan pıhtılaşmasının sonuna kadar geçen süre olarak gerekçelendirilmiştir. Deney, dokuz sağlıklı gönüllüden alınan kan kullanılarak, test edilen her örnek için dokuz kere tekrarlanmıştır.

3.9. Antimikrobiyal Etkinlik Tayini

Test edilen örnekler, kitosan türevleri söz konusu olduğunda, ilgili sünger formunun kitosan ana zinciri derişimleri 0,2 mg/ml olacak şekilde ultra-saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Jeller söz konusu olduğunda ise, katı içerik derişimi 0,2 mg/ml olacak şekilde ilgili jellerin ultra-saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. Örneklerin antimikrobiyal etkinlikleri Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST)'ın önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda belirlenmiştir. Bu amaçla 96 kuyucuklu mikropaklar kullanılmıştır. Her kuyucuğa 100'er µL Katyon ilaveli Mueller Hinton Broth (CMHB) (212322, Becton Dickinson, ABD) konulmuştur. Daha sonra ilk kuyucuklara, örneklerden 100'er µL eklenerek ilgili seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Son aşamada ise densitometre (Biosan) yardımı ile McFarland 0,5 bulanıklığına eşit olacak şekilde

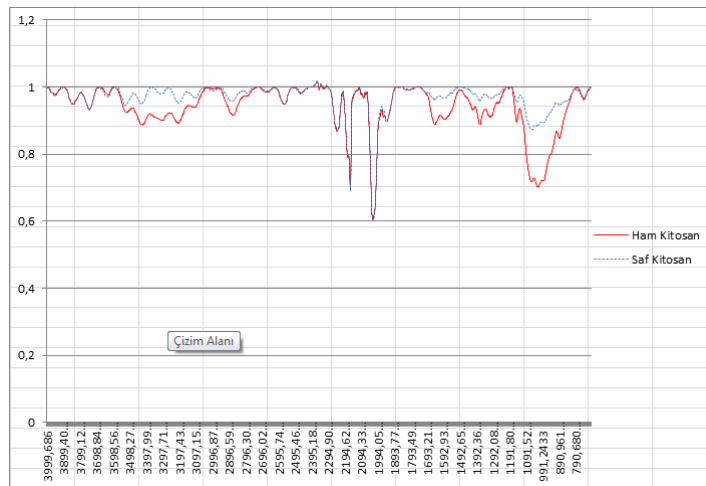
hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/100 oranında sulandırılarak tüm kuyucuklara 100'er µL ilave edilmiştir. Son kuyucuklar, örnek ilavesi yapılmaksızın (besiyeri + bakteri süspansiyonu) kontrol kuyucukları olarak kullanılmıştır. Mikroplaklar 16-20 saat 37°C' de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda üremenin inhibe edildiği en düşük derişim Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) olarak belirlenmiştir. Ayrıca kontrol için antibiyotik olarak siprofloksasin kullanılmış ve sonuçları EUCAST klinik kontrol tablolarına göre değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Kitosanın Saflaştırılması

Hayvansal kaynaklı biyomalzemelerin tıbbi uygulamalarının, doğal olarak protein kirliliği riski içermesinden kaynaklı olarak, yeni materyallerin geliştirilme süreçlerinde kullanılan kitosanın yüksek saflıkta olması ve protein kirliliğinden arındırılması gerekmektedir. Gan ve ark. (2005) tarafından, kitosan materyalinin saflaştırılmasında kullanılan temel işlem, söz konusu materyalin kuvvetli bir baz olan NaOH içinde 2 saat süreyle 70°C’de inkübe edilmesidir. Saflaştırma işleminden sonra, ham kitosandaki potansiyel protein kontaminasyonu ortaya koyabilmek üzere, ham kitosan ve saflaştırılmış formunun FT-IR analizlerinin tranmitans spektrumları karşılaştırılmıştır. Spektrumlardaki fark, protein molekülleri ve pigmentler gibi yabancı maddelerin uzaklaştırılmasına bağlı olarak, saflaştırmadan sonra ham kitosan materyalinin yüzey kimyasında meydana gelen değişikliklere atfedilmiştir (Gan ve ark., 2005).

Çalışmamızda, temin edilen KH’nın saflaştırılmasında, Gan ve ark. (2005) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır. KH ve saflaştırılmış formunun FT-IR analizlerinin tranmitans spektrumlarının pik değerlerinde herhangi bir farklılığın görülmemesi (Şekil 4.1), KH’nın protein veya pigment kontaminasyonundan arı olduğunu ortaya koymuştur. Pikler arasındaki yoğunluk farkları, FT-IR analizinin kalitatif düzeyde uygulanmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.1. KH ve KS’nin FT-IR analizleri.

x eksenini dalga boyu (cm^{-1})’nu, *y* eksenini tranmitans değerlerini göstermektedir.

Kitosanın saflaştırma işleminin, polimerin molekül ağırlığı üzerindeki etkisi değerlendirilmek üzere KH ve KS'nin Mw dağılımları BDK yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Ek 3). Mw değerleri kullanılarak söz konusu kitosan numunelerinin DPw ve \overline{DPw} değerleri hesaplanmıştır (Ek 1A, Çizelge 4.1). Saflaştırma işlemi sonucunda, KH'nın \overline{DPw} değeri 11.149'dan 6.322'ye düşmüş, bir başka deyişle KH zincirinde kırılma meydana gelmiştir.

Çizelge 4.1. Kitosan numunelerinin Mw, DPw ve \overline{DPw} değerleri.

	Mw (Da)	DPw	\overline{DPw}
KH	2.032,2	11	11.149
	23.149,0	129	
	3.140.500,0	17.447	
KS	11.026,0	61	6.322
	2.722.200,0	15.123	

4.2. Kitosanın Deasetilasyon Derecesinin Belirlenmesi

¹H NMR spektrumundaki karakteristik piklerin integral değerleri (Ek 2A, Şekil 1-2) kullanılarak KH ve KS numunelerinin deasetilasyon dereceleri belirlenmiştir (Ek 1B).

Buna göre;

$$\%DD_{(KH)} = \sim 79$$

$\%DD_{(KS)} = \sim 85$ olarak hesaplanmıştır.

4.3. Protonlanmış Kitosan Türevlerinin Protonasyon Derecelerinin Belirlenmesi

Protonlanmış kitosanların protonasyon dereceleri potansiyometrik olarak ortaya konulmuştur (Ek 1C). Buna göre;

$$\%PD_{(K-Ac)} = 64-67$$

$\%PD_{(K-Ci)} > 74$ olarak hesaplanmıştır.

Rinaudo, Pavlov ve Desbrieres (1999), kitosanın farklı derişimlerdeki asetik asit sulu çözeltileri içindeki protonasyonunu, asetik asitin pKa değerine dayanarak potansiyometrik olarak hesaplamışlardır. Araştırmacılar, söz konusu hesaplamaları ideal çözeltiler varsayımı altında gerçekleştirerek, iyonik kuvvetin asetik asitin ayrışma sabiti üzerindeki etkisini gözardı etmişlerdir. Ancak çözeltideki iyonlar ve özellikle de sulu çözeltideki iyonlar için, idealite varsayımlarına dayanan hesaplamalar, seyreltik çözeltiler için bile, genellikle çok yanıltıcıdır. Bunun nedeni, Columb kuvvetlerine bağlı olarak gerçekleşen farklı yüklü iyonlar arasındaki çekimin ve aynı yüklü iyonlar arasındaki itmeyin, van der Waals kuvvetlerine bağlı olarak nötral türler arasında gerçekleşen çekme ve itmeye göre çok uzun bir menzilde etkili olmasından kaynaklanmaktadır (Schwendeman, 1996).

Reaksiyon hız sabitlerinin iyonik kuvvetle ilişkisine birincil tuz etkisi adı verilir. Geçiş durumu kuramına göre, standart bir çözeltilerin hız sabiti k_0 'ı ikinci çözeltilerin hız sabiti k 'ya bağlayan eşitlikte:

$$k = k_0 \times \frac{f_A f_B}{f^*} \dots\dots\dots(\text{Eşitlik 27})$$

f_A ve f_B tepkenlerin, f^* ise standart çözeltideki geçiş durumu kompleksinin aktivite katsayılarıdır. Eşitlik 27'ye Debye-Hückel teorisinin (bir iyonun aktivite katsayısı $-\log f_i = A \cdot z_i^2 \sqrt{I}$ ilişkisine uyar) uygulanması sonucu Bronsted eşitliği elde edilir (Purich, 2010):

$$\log k = \log k_0 + 2A z_A z_B \sqrt{I} \dots\dots\dots(\text{Eşitlik 28})$$

Eşitlik 28'e göre; iyonik kuvvet arttıkça, benzer-yüklü iyonların arasındaki reaksiyon hızı artar. Benzer olmayan-yüklü iyonların arasındaki reaksiyon hızı ise iyonik kuvvetin artmasıyla azalır. İyonik kuvvetteki artışın her katyonik iyonun anyonik iyonlarla çevrilmesini, benzer şekilde her anyonik iyonun katyonik iyonlarla çevrilmesini arttırdığı söz konusu niteleyici etkiye, iyonik perdeleme adı verilir (Purich, 2010).

İyonik kuvvetin sade tanımlaması $I = 0,5 \sum c_i \cdot z_i^2$, makromoleküler polielektrolitler (örn. proteinler, nükleik asitler, sülfatlı karbohidratlar vb.) ele alınırken yetersizdir. Bunun temel nedeni, polielektrolitlerin iyonik yüklerinin makromolekül üzerinde dağılması ve

mikroiyonlarda olduğu gibi toplanmamasıdır. Bir makromoleküler polielektrolitin etkin iyonik kuvvetini tahmin etmekte kullanılan bir yaklaşım, özellikleri iyonik kuvvete hassas olan düşük molekül ağırlıklı elektrolitlerin derişiminin sistem üzerindeki eşdeğer etkisini değerlendirmektir (Purich, 2010).

Çalışmamızda, bir makromoleküler polielektrolit olan protonlanmış kitosanın PD'si hesaplanırken; söz konusu polielektrolitin iyonik kuvvete katkıda bulunmadığı ve iyonik kuvvetin sadece çözeltideki serbest anyonlar tarafından belirlendiği I_{min} varsayımı altında bir PD_{min} değeri belirlenmiştir. Ayrıca, söz konusu polielektrolitin anyonlarla birlikte serbest iyonlar gibi davrandığı I_{maks} varsayımı altında bir PD_{maks} değeri belirlenmiştir. Gerçekte, katyonik iyonların polimer üzerinde konumlanmasının iyonik perdelemeye kısmen ket vuracak olmasından, PD'nin söz konusu varsayımsal iki değer arasında olması gerektiği öne sürülmüştür.

K-Ac için yapılan düzeltmede; I_{min} değeri, idealite koşulunda yapılan hesaplamaya göre çözeltilinin içerdiği anyon derişimi göz önünde bulundurularak, I_{maks} değeri ise KS'nin tamamen protonlandığı ve çözeltideki polikasyonların da serbest iyonlar şeklinde hareket ettiği varsayımsal koşul göz önünde buldurularak hesaplanmıştır. Dolayısıyla, ilgili türevin %PD'sinin gerçekte 64-67 arasında olacağı söylenebilir. Söz konusu hesaplamayla, K-Ac çözeltilisinin iyonik içeriğinin kitosan polimerinin PD değerinde en az %5'lik artışa sebep olacağını ortaya konulmuştur.

K-Ci için yapılan düzeltmede; I_{min} değeri, idealite koşulunda çözeltilinin içerdiği anyon derişimi göz önünde bulundurularak, I_{maks} değeri ise ek olarak söz konusu koşuldaki polikasyonların da serbest iyonlar olarak davranacağı varsayımı altında hesaplanmıştır. Gerçekte K-Ci çözeltisinde bulunan iyon derişimi, idealite koşulu altında yapılan hesaplamayla ortaya konulan iyon derişiminden yüksektir. Bu nedenle, ilgili çözeltideki polikasyonun gerçek %PD değerinin, hesaplanan %PD değerinden (%73) yüksek olduğu söylenebilir.

4.4. Kitosanın Trimetilasyonu

Kitosan polimerindeki 2-aminoglukoz birimlerinin halka protonları, 1H NMR spektrumlarında δ_H 3,6 ila 4,5 ppm (H2-H6) ve 4,6 ila 5,8 ppm (H1) 'de sinyallere sahiptir. 1H - ^{13}C HSQC NMR spektrumlarında bu sinyaller, sırasıyla karbohidratların karbon kimyasal kayması için tipik aralık olan δ_C 73 - 82 ppm ve 95 - 105 ppm'de korelasyon

göstermektedir. ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrumundaki korelasyonlar, su rezidüel sinyalinin (δ_{H} 4,53 ppm) aşağısındaki sinyallerin anomerik protonlardan kaynaklandığını doğrulamıştır. Söz konusu durum, COSY NMR spektrumunda H2 protonlarının δ_{H} 3,6 ve 3,8 ppm kimyasal kayma aralığındaki çapraz pikleriyle de desteklenmektedir. Anomerik protonların diğer halka protonlarına kıyasla nispeten büyük kimyasal kayma dağılımları tipiktir ve bu kimyasal kaymaların glukoz birimlerinin konformasyonuna güçlü bağımlılığını yansıtır. Altıncı pozisyondaki metilen grupları, δ_{H} 3,86, δ_{C} 65,2 ppm spektrumundaki ters fazlarıyla multiplisite düzeltmeli ^1H - ^{13}C HSQC NMR'da belirlenmiştir (Ek 2B).

^1H NMR spektrumlarında yaklaşık olarak δ_{H} 2,09 ppm'de singlet gösteren 2-NH asetil grupları, ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrumunda δ_{C} 25,2 ppm'deki metil karbonuyla ve ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrumunda δ_{C} 117 ppm'deki karbonil karbonuyla ilişkilendirilmiştir (Ek 2B).

^1H NMR spektrumlarında 3-OMe ve 6-OMe modifikasyonları sırasıyla δ_{H} 3,5 – 3,6 ve 3,4 – 3,5 ppm'de singletlere neden olmuştur (Ek 2C). ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrumunda bu sinyaller, metoksi karbonlarına özgü olan δ_{C} 60 - 61 ppm'de beklenen korelasyonları göstermişlerdir. ^1H - ^{13}C HMBC'deki çapraz pikler, 3-OMe protonlarıyla C3 (δ_{H} 3,53; δ_{C} 80,3 ppm) ve 6-OMe protonlarıyla C6 (δ_{H} 3,45; δ_{C} 75,5 ppm) arasındaki korelasyon sinyalleriyle, iki metoksi grubu sinyalinin kesin olarak atanmasını sağlamıştır (Ek 2B).

2-NMe₃⁺sinyalleri δ_{H} 3,3 ve 3,4 ppm'de gözlenmiştir (Ek 2C). Bu grupların karbon kimyasal kayması, kuarterner azotlara bağlı karbon atomlarıyla uyumlu olarak, 57 ppm'dedir. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrumunda bu grupların protonları, aynı kuarterner karbondaki iki metil grubu arasındaki korelasyonlara karşılık olarak δ_{C} 57ppm'de; C2 glukoz karbonlarına karşı ise 80 – 81 ppm'de korelasyon sinyalleri göstermiştir. Yüksek derecede modifiye edilmiş bir kitosan numunesi olması nedeniyle TMK'daki tek veya çift metillenmiş 2-amino gruplarının düşük relatif fraksiyonları, bunların 2D NMR spektrumlarındaki atamalarını engellemiştir. (Ek 2B)

TMK numunesinin modifiye polimere ek olarak, metilleme işleminde kullanılan N-metil-2-pirolidon reaktifini görece yüksek miktarda içerdiği belirlenmiştir. Reaktif, δ_{H} 3,49 (2H, t, J = 7,0 Hz), 2,82 (3H, s), 2,41(2H, t, J = 7,0 Hz) ve 2,03 (2H, m, 7,0 Hz) ppm'de

sinyallere sahiptir. Söz konusu sinyalleri ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrumlarındaki çapraz pikleri metilen gruplarına aittir. İlgili karbon atomlarının kimyasal kaymaları sırasıyla δ_{C} 53,2, 33,7 and 20,0 ppm olup; bir azot atomunun yanındaki, bir karbonil grubunun yanındaki ve iki alifatik karbonla çevrelenmiş konumlanmalarıyla uyumludur. δ_{H} 2,82'deki proton sinyali, azot atomuna bağlı metil grubuna karşılık gelmektedir. ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrumunda belirlendiği üzere, tüm proton sinyalleri karbonil karbonununun δ_{C} 181 ppm'deki sinyaliyle ilişkilidir (Ek 2B). Bu durum, ancak bileşik halkasal ise mümkündür.

TMK numunesi N-metil-2-pirolidon safsızlığını görece yüksek miktarda içermesinden dolayı dietil eter kullanılarak çöktürme yoluyla tekrar saflaştırılmış ve elde edilen numune TMKb olarak adlandırılmıştır. TMK'nın ^1H NMR spektrumunda, δ_{H} 2,41 ppm'deki iyi ayrılmış N-metil pirolidon sinyalinin integrali, δ_{H} 4,7 ve 5,8 ppm arasındaki anomerik 2-aminogluoz protonlarının integralinin 2,48 katıdır. Söz konusu değer, reaktif ile glikozidik üniteler arasında 1,2/1 molar oranına karşılık gelmektedir. Aynı bileşene ait sinyaller, TMK'nın saflaştırılmasıyla elde edilen TMKb numunesinin ^1H spektrumunda da tespit edilmiştir. İlgili ^1H NMR spektrumunda, δ_{H} 2,41 ppm'deki proton ve anomerik bölgedeki protonlar arasındaki 0,02 integral oranıyla belirlendiği üzere, saflaştırılmış numunedeki N-metil-2-pirolidon içeriği orijinal numunedekinin %1'inden daha az olduğu belirlenmiştir (Ek 2C).

^1H NMR spektrumundaki karakteristik piklerin integral değerleri (Ek 2C) kullanılarak TMKb'nin deasetilasyon ve metilasyon dereceleri belirlenmiştir (Ek 1D). Buna göre TMKb'nin ilgili değerleri;

% DD = ~84

% $-\text{N}^+\text{Me}_3$ = ~79

% 3-OMe = ~68

% 6-OMe = ~68 olarak hesaplanmıştır.

Sieval ve ark. (1998)'in önerdiği yöntemle sentezlenen TMK'nın ve sentezde kullanılan kitosan materyalinin Mw değerlerinin BDK kullanılarak belirlendiği bir çalışmada; yüksek

oranda N-trimetilasyon (% -N⁺Me₃= 86) ile sonuçlanan sentez koşulunun, kitosan zincirinde kırılmaya neden olduğu belirlenmiştir (Verheul ve ark., 2008). Çalışmamızda, aynı yöntemle KS materyelinden trimetil kitosan sentezlenmiş (TMKb, % -N⁺Me₃= 79) ve söz konusu materyallerin Mw değerleri BDK kullanılarak belirlenmiştir. Belirenen Mw değerleri (Ek 3) kullanılarak, KS ve TMK türevinin \overline{DPw} değerleri hesaplanmıştır (Ek 1A). Trimetilasyon işlemi sonucunda, KS'nin \overline{DPw} değeri 6.322'den 277'ye düşmüş, bir başka deyişle KS zincirinde kırılma meydana gelmiştir.

4.5. Kitosan ve Türevlerinin Çözünürlükleri

Türevlendirme yöntemlerinin, kitosan ana zincirinin çözünürlüğü üzerindeki etkisini ortaya koyabilmek üzere; 5 mg/ml kitosan ana zincirini içeren numune karışımlarının ~25°C 'deki %T₅₀₀ değerleri ölçülmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. %T₅₀₀ değerleri.

	% T ₅₀₀			$\overline{\%T}_{500}$
	KH	10,5	10,7	11,2
KS	71,7	71,5	71,6	71,6
K-Ac	97,1	97,1	97,1	97,1
K-Ci	89,2	89,1	89,1	89,1
TMKb	90,4	90,4	90,6	90,5

Kitosan ana zincirinin ilgili ortamlardaki çözünürlükleri; K-Ac>TMK>K-Ci>KS>KH şeklinde belirlenmiştir.

O-metillenmiş glukozamin birimleri sadece hidrojen alıcı olarak işlev görürken, O-metillenmemiş birimler sulu çözücülerle etkileşimlerinde hidrojen köprülerini hem kabul edebilir hem de bağışlayabilir. Yüksek derecede O-metilasyonun, yüksek kuaternizasyon dereceleri söz konusu olduğunda dahi TMK'lerin çözünürlüğünü azalttığı bildirilmiştir (Sieval ve ark., 1998; Verheul ve ark., 2008). Çalışmamızda kullanılan TMK türevi, diğer materyallerle karşılaştırıldığında en yüksek polikasyonik özelliğe (% -N⁺Me₃= 84) ve en düşük \overline{DPw} değerine sahip olmasına rağmen, yüksek derecede O-metilasyonundan (%3-OMe = 72, %6-OMe = 77) kaynaklı olarak, K-Ac'den (%PD = 64-67) daha düşük çözünürlük özelliği göstermiştir. Ek olarak, trimetil grubunun kasyonik özellik

kazandırdığı amin grubunu aynı zamanda sterik olarak engellemesinin de, TMK'nın çözünürlüğünün azalmasında etkili olabileceği öne sürülmüştür.

Honary, Hoseinzadeh ve Shalchian (2010), sodium sitrat (0,2 mg/ml) ve kitosan (0,2 mg/ml) arasındaki etkileşimi türbidimetrik titrasyon kullanarak incelemiştir. Asidik koşullarda (pH:1-4) çözeltinin berrak olduğunu, pH arttırıldıkça çözeltinin bulanıklaştığını, ancak pH = 7'de çözeltinin tekrar berraklaştığını, yani etkileşimin ortadan kalktığını belirlemiştir (Honary, Hoseinzadeh ve Shalchian, 2010). Çapraz bağlama yoluyla kitosan modifikasyonu literatürde geniş bir şekilde tarif edilmiştir ve kitosan bazlı materyaller hazırlamak için nispeten kolay bir yöntemdir. İyonik çapraz bağlama işleminde, negatif yüklü bileşenler ile pozitif yüklü kitosan zincirleri arasında bir iyonik köprü ağı oluşur. İyonik çapraz bağlayıcılar arasında, küçük boyutlu anyonlar (sitrat, sülfat gibi) veya iyonik moleküller (örneğin fosfat taşıyan gruplar) yaygın olarak kullanılır (Szymańska ve Winnicka, 2015). Çalışmamızda, K-Ci'nin (%PD>73) K-Ac (%PD = 64-67)'den daha yüksek polikatyonik özellik göstermesine rağmen çözünürlüğünün daha düşük olması, K-Ci söz konusu olduğunda karışımda bulunan iki ve üç değerlikli sitrat iyonlarının KS üzerinde oluşturduğu zincir içi ve zincirler arası sitrat köprülerine bağlanmıştır.

4.6. *In silico* Etkinlik Tayini

4.6.1. Moleküler Modelleme Çalışmaları

4.6.1.1. P2Y₁₂ Reseptörü (P2Y₁₂R) Doking Çalışmaları

Kitosanın (DD> %85, MA = 40.000Da), p-GlcNAc (MA = 2,6x10⁶ Da)'nin kısmi (DD = %70) ve tam (DD = %100) deasetilasyonu ile elde edilen kitosan türevlerinin (0,5 mg/ml) 21 °C'de 15 dk inkübasyonları sonucunda PRP'de jelleşmeye, yani fibrin pıhtı oluşumuna neden olan herhangi bir etkileşim göstermedikleri bildirilmiştir. Öte yandan, p-GlcNAc liflerinin ve bu liflerin modifiye edilmiş alfa formlarının trombositlerle etkileşiminin zaman ve konsantrasyonla orantılı olarak fibrin polimer gelişimine neden olduğu belirlenmiştir (Thatte ve ark., 2004a).

Sitratlı köpek tam kanından hazırlanan PRP'nin kullanıldığı çalışmada, 15 mg/ml derişimli kitosan hidroklorür (%DD: 58)'in normal sıcaklıkta 5 dk süreyle inkübasyonunun trombosit aktivasyon sürecinde yer alan β -TG ve PF-IV maddelerinin salımını arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, 7,5 mg/ml derişimli aynı materyalin PRP'de 10 dk süreyle

inkübasyonunun, trombositlerdeki psödopod miktarını arttırdığı, SEM kullanılarak gösterilmiştir (Sugamori ve ark., 2000).

Glukozamin bazlı çeşitli materyallerin PPP ve PRP içinde 23°C'de inkübasyonunun trombin üretim kinetikleri üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmada, kitosanın protrombik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Protrombik etkinin kitin kullanımı söz konusu olduğunda arttığı ve p-GlcNAc kullanımıyla en yüksek seviyeye çıktığı ortaya konulmuştur. Kitosanın protrombik etkisinin GPIIb/IIIa kompleksinin inhibisyonundan anlamlı seviyede etkilenmezken, FXIIa inhibisyonuna duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Fischer ve ark., 2007).

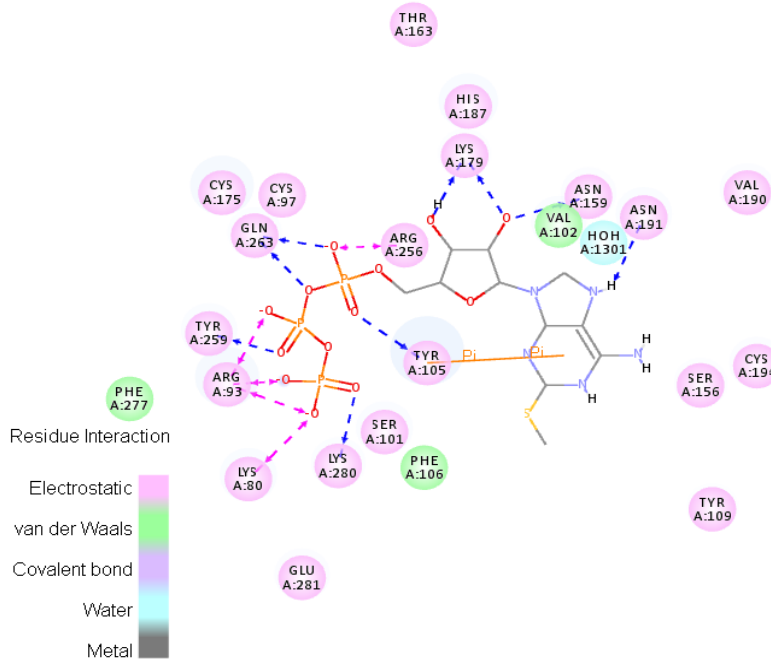
Tavşandan alınan yıkanmış trombosit süspansiyonları kullanılarak, kitosan sitratın trombosit aktivitesi üzerindeki etkisinin test edildiği ve olası mekanizmaların araştırıldığı çalışmada; kitosan sitratla trombositlerin başlangıç (5 dk) ve uzun süreli (30 dk) temasından sonra, kitosan sitrat kaplı mikrotitre plakalara trombosit adezyonunun, çözücü kontrolüne kıyasla, doz bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, kitosan sitrat doza bağlı olarak trombosit agregasyonunu ve Fura-2-AM yüklü trombositlerin hücre içi serbest Ca^{2+} yükselmesini arttırmıştır. Ek olarak, fluoresin izotiyosiyanat (FITC)-etiketli anti-CD41/CD61'in varlığında kitosan sitrat, akış sitometresi kullanılarak tahlil edilen trombosit GPIIb/IIIa kompleksinin ifadesini önemli ölçüde arttırmıştır. Kitosan sitratın trombosit adezyonu ve agregasyonu için etkili bir indükleyici olduğu ve etki mekanizmasının, en azından kısmen, $[Ca^{2+}]_i$ mobilizasyonunun ve trombosit zar yüzeyleri üzerindeki GPIIb/IIIa kompleksinin ifadesinin artması ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Chou ve ark., 2003).

Periyah ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, DD <85% ve MA<40.000 Da olan NOCC ve oligokitosan (OC)'nin trombosit agregasyonda etkili olduğu bilinen trombosit membran reseptörleri GPIIb/IIIa ve P2Y₁₂R'nin ifadesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Söz konusu reseptörler, akış sitometrisi ve western blot teknikleriyle çalışılmıştır. GPIIb/IIIa'nın en yüksek ifadesi pozitif kontrol olarak kullanılan Lyostypt® (Braun Inc., Almanya) (%74,3 ± 7,82), ardından OC (%65,5 ± 7,17) ile gerçekleşmiştir. Lyostypt® ve OC, tek başına kanla karşılaştırıldığında, GPIIb/IIIa ifadesinin sırasıyla %29,2 ve %13,9 oranlarında artmasına neden olmuştur. NOCC düşük seviyelerde GPIIb/IIIa ekspresyonuna neden olmuştur. Western blot analizi, kanla karşılaştırıldığında P2Y₁₂ ifadesini sadece OC'nin pudra formunun arttırdığını (1,12 ± 0,03

kat) ortaya koymuştur. Bu sonuçlar araştırmacılar tarafından, kitosan bazlı hemostatik ajanların, GPIIb/IIIa ve P2Y₁₂ salımını içeren hücre içi sinyal kaskatlarını uyardığı şeklinde yorumlanmıştır. Kitosan türevi biyomalzemelerin varlığında GPIIb/IIIa ve P2Y₁₂ ekspresyonunun önemini vurgulamak için yapılan yoğun çalışmalara rağmen, ilgili mekanik yollar belirsizliğini korumaktadır (Periayah ve ark., 2014).

Çalışmamızda, kitosan ve trombositler arasındaki direkt etkileşimi ayrıntılı olarak inceleyebilmek ve söz konusu etkileşim mekanizmalarını ortaya koyabilmek üzere, trombosit agregasyonunda ve pıhtı stabilizasyonunda rol oynayan trombosit reseptörleriyle oligomerik kitosan arasında doking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Seçilen ilk hedef reseptör, ADP ligandının agonist etkisi sonucu trombosit agregasyonu ve granül salımında temel bir rol oynayarak pıhtı oluşumunu destekleyen P2Y₁₂R'dir.

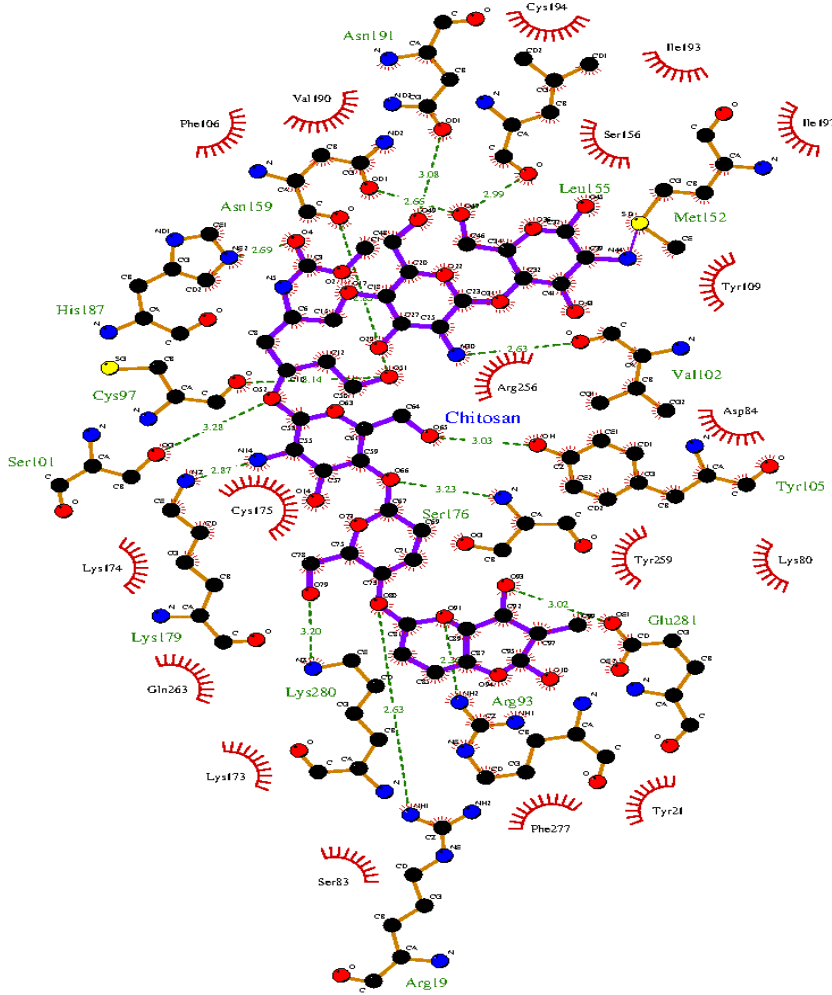
ADP ile P2Y₁₂ reseptörü arasındaki doking enerjisi yaklaşık -11,2 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Oldukça düşük olan söz konusu değer, seçilen aktif yöreye ADP'nin anlamlı bir şekilde bağlanarak, agonist olarak etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. ADP ve P2Y₁₂ reseptörü arasındaki doking sonucu. Etkili amino asitler:

Lys179, Asn159, Asn191, Tyr105, Lys280, Tyr259, Gln263, Arg93, Arg256, Lys80.

ADP ile P2Y₁₂ reseptörü arasındaki doking çalışmasından sonra, aynı reseptör üzerinden kitosanın agonist etkisi incelenilmiştir. Kitosan ile P2Y₁₂ reseptörü arasında doking enerjisi 12 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. Birkaç amino asit ile kitosan etkileşime girmektedir, ancak hesaplanan doking enerjisi çok yüksek olduğundan, etkileşim gözardı edilebilir. Bu sonuç, kitosanın P2Y₁₂ reseptörü ile etkileşime girmesinin ve bu reseptör üzerinden agonist etki yapmasının mümkün olmadığını göstermektedir (Şekil 4.3).

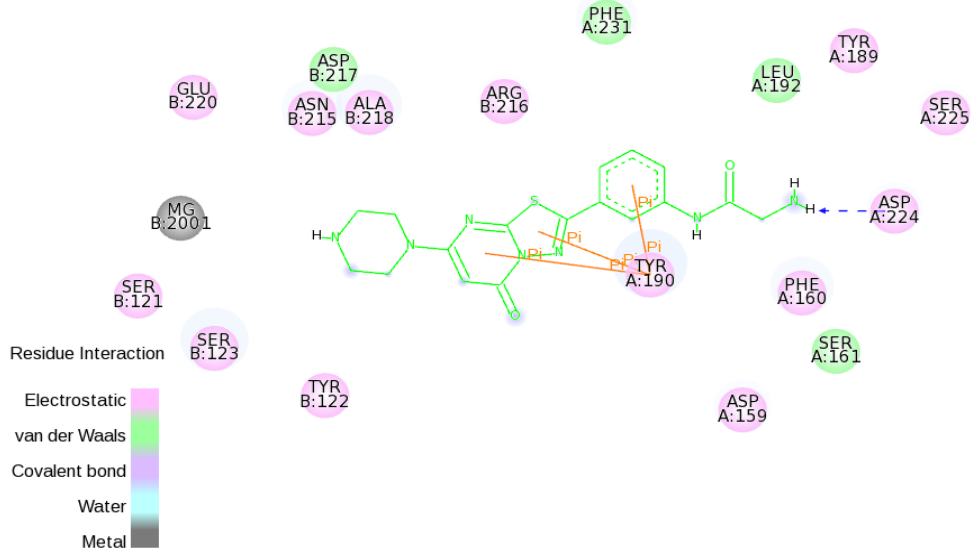


Şekil 4.3. Kitosan ve P2Y₁₂ reseptörü arasındaki doking sonucu. Etkili amino asitler:

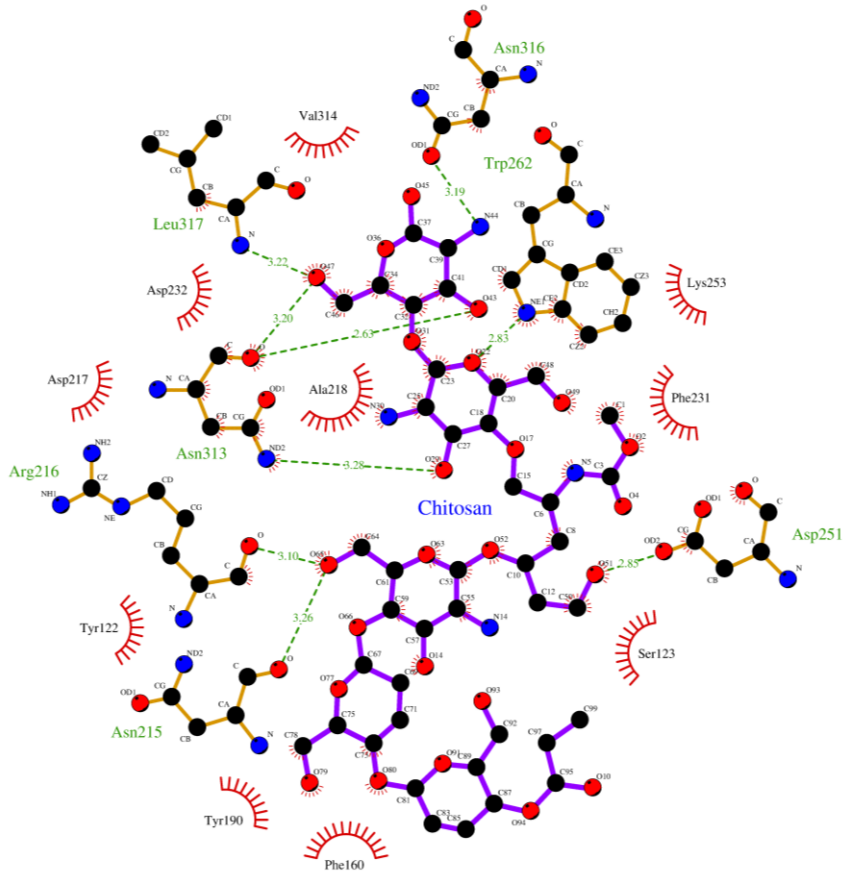
Leu155, Asn159, Asn191, Met152, Val102, Tyr105, Ser176, Glu281, Arg93, Arg19, Lys280, Lys179, Ser101, Csy97, His187.

4.6.1.2. Glikoprotein IIb/IIIa Reseptörü Doking Çalışmaları

ADP bağlanması sonucunda konformasyonel bir değişikliğe uğrayarak vWF için fizyolojik bir reseptör olarak görev yapan ve böylelikle fibrinojen birikmesine yol açmak



Şekil 4.6. RUC2 ve GPIIb-IIIa reseptörü arasındaki doking sonucu. Etkili amino asitler: Tyr190, Asp224.

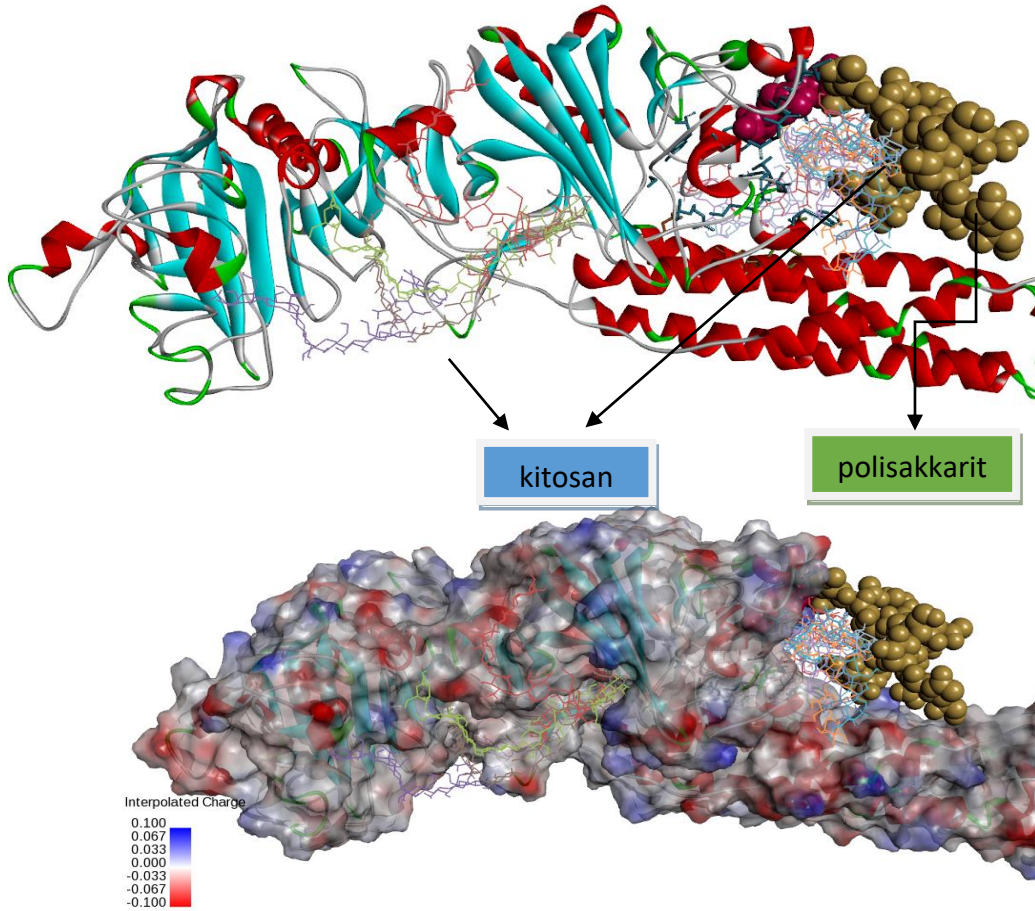


Şekil 4.7. Kitosan ve GPIIb-IIIa reseptörü arasındaki doking sonucu. Etkili amino asitler: Asn316, Trp262, Asp251, Asn215, Arg216, Asn313, Leu317.

Glikoprotein IIb/IIIa ile integrilin, tirofiban ve RUC2 arasındaki doking çalışmalarından sonra, Kitosan ve Glikoprotein IIb/IIIa arasındaki doking çalışması gerçekleştirilmiştir. Buna göre, kitosan molekülünün Glikoprotein IIb/IIIa'ya bağlandığı ve birkaç amino asitle hidrojen bağı yaptığı belirlenmiştir. Kitosan ve glikoprotein arasındaki doking enerjisi yaklaşık olarak -6,9 kcal/mol'dür. Kitosan'da bulunan amino grubu, Asn316 ile hidrojen bağı yapmaktadır. Hidroksil grupları ise, Trp262, Asp251, Asn215, Arg216, Asn313 ve Leu317 ile birleşmektedir (Şekil 4.7). Bu sonuç, kitosanın GPIIb/IIIa integrini aracılığıyla dıştan-içe sinyali tetikleyerek trombosit bağımlı pıhtılaşma sürecini hızlandırabileceğini göstermektedir.

4.6.1.3. Fibrinojen Doking Çalışması

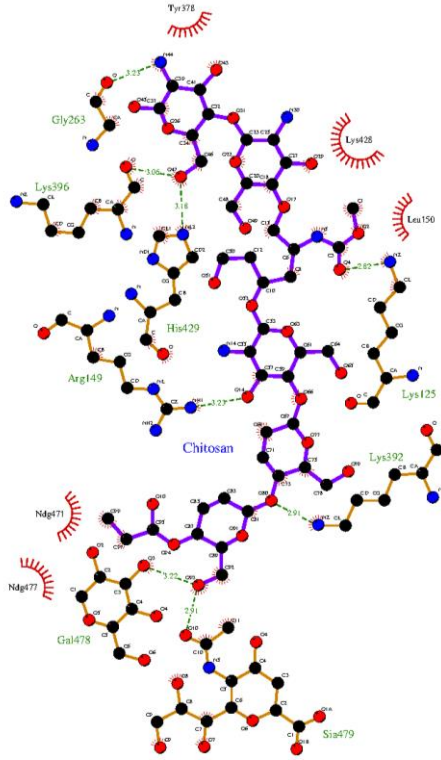
Kitosan ile fibrinojen arasındaki doking çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre kitosan, fibrinojen molekülüne bağlanmaktadır (Şekil 4.8). Doking enerjisi, -7,1 kcal/mol ve -7,6 kcal/mol arasında değişmektedir (Çizelge 4.3). Bağlanmanın en kuvvetli olduğu 1.moddaki etkili amino asitler belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Fibrinojen ve kitosan arasındaki doking.

Çizelge 4.3. Fibrinojen ve kitosan arasındaki doking enerjileri.

Mod	Doking Enerji (kcal/mol)	Önceki doking sonucu RMSD
1	-7,6	0.000
2	-7,3	11.185
3	-7,2	3.175
4	-7,2	35.318
5	-7,2	10.766
6	-7,2	10.227
7	-7,1	3.355
8	-7,1	47.055
9	-7,1	34.541
10	-7,1	33.867



Şekil 4.9. Kitosan ve fibrinojen arasındaki doking sonucu. Etkili aminoasitler: Gly263, Lys396, His429, Arg149, Lys125, Lys392, Arg149. Etkili monosakkaritler: Gal478, Sia479.

Kitosanın hem GPIIb/IIIa hem de fibrinojene bağlanabilmesi ve etkileşimde GPIIb/IIIa molekülünün protein kısmındaki farklı amino asitlerin yer alması, kitosanın vWF'in fonksiyonel analogu olarak işlev görererek trombosit agregasyonunda etkili olabileceğini göstermektedir.

4.6.2. Moleküler Dinamik Çalışmaları

Kitosanın derişimine bağlı olarak birkaç saniye içinde tam kanda pıhtı oluşturduğunun ve söz konusu pıhtının, kontrol tam kan pıhtısının aksine, retrakte olmadığını gözlemlenmesi, farklı bir mekanizmanın devrede olabileceğini düşündürmüştür. Bunun üzerine kitosan, fibrinsiz kan, heparinize kan ve yıkanmış eritrositler ile test edilmiştir. Her durumda, pıhtı hızlı bir şekilde oluşmuştur. Albümin ve globülinde reaksiyon gözlemlenmemiştir. Araştırmacılar, bu deneylerden, kitosanın kanın hücresel elemanlarıyla ya repolimerize olduğu ya da çapraz bağlandığı ve olağan pıhtılaşma faktörlerinin mekanizmaya dahil olmadığı sonucuna varmışlardır (Malette ve ark., 1983).

Kitosanın asetat tuzun kullanıldığı bir çalışmada benzer sonuçlar alınmıştır. Kitosan asetatın tam kanla temas halinde bir pıhtı oluşturduğu ve WHBCT'yi düşürdüğü gösterilmiştir. Söz konusu pıhtılaşma reaksiyonu, yıkanmış eritrositlerde, heparinize veya fibrinsiz kanda da oluşmuş, ancak albümin, globülin ve beyaz kan hücrelerinde gözlemlenmemiştir (Radhakrishnan ve ark., 1991).

126.000 Da ağırlığında kitosan kullanılarak hazırlanan filmlerin, kan pıhtılaşmasının normal seviyelerini önemli ölçüde etkilemediği, çeşitli türlerin kan numuneleri üzerinde yapılan PT, parsiyel tromboplastin zamanı (PTT), trombin zamanı (TT), APTT, PRT ve protrombin tüketim indeksi (PCI) analizleriyle gösterilmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlar doğrultusunda, kitosanın hemostatik etkisinin normal pıhtılaşma kaskatından bağımsız olduğuna işaret etmişlerdir (Rao ve Sharma, 1997).

Kitosan üzerindeki aminler, asidik pH'da protonlanır ve kitosan zincirlerine pozitif yük kazandırır. Kitosan, katyonik yapısından dolayı hemostatik bir ajan olarak seçilmiştir. Biyolojik hücre yüzeylerinin çoğu anyoniktir ve kitosanın elektrostatik etkileşimler yoluyla bir yara bölgesindeki dokuya güçlü bir şekilde yapıştığı düşünülmektedir (Periayah, Halim ve Hussein, 2012).

MA'ları 200, 500 ve 700 kDa (DD: %80-82) olan kitosanlar kullanılarak sentezlenen kitosan asetatların derişimlerine bağlı olarak, MA'dan ise bağımsız bir şekilde eritrositleri bağladığı gösterilmiştir (Pogorielov ve ark., 2015).

Çeşitli türlerin kanlarından elde edilen eritrosit süspansiyonları kullanılarak, standart immünolojik test protokolünde olumlu sonuç veren en düşük kitosan (MA = 126.000 Da) titresine ulaşmak için hemaglutinasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Kitosan çözeltisi, eritrositlerin elde edildiği türden bağımsız olarak, çok düşük derişimlerde bile hemaglutinasyona neden olmuştur. Araştırmacılar bu sonuçlar doğrultusunda, kitosanın aglutinasyon potansiyelinin, özellikle hücre yüzeyindeki negatif yüklü moleköl rezidüleriyle etkileşime giren polikasyonik özelliklerine bağlanabileceğine işaret etmişlerdir (Rao ve Sharma, 1997).

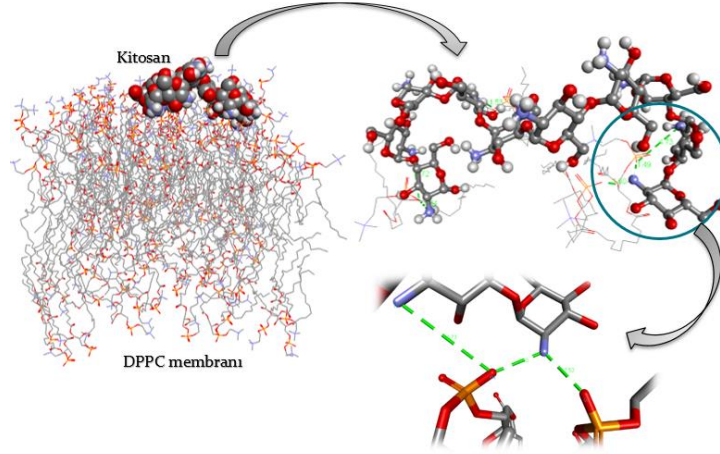
Pıhtılaşma üzerindeki etkilerinin taze tam kan kullanılarak Lee-White metodu ve antikoagüle edilmiş kandan elde edilen PPP kullanılarak PRT'lerin ölçölmesiyle değerlendirildiği çalışmada, kitosanın boş kontrole göre WHBCT'yi anlamlı olarak düşürdüğü, buna karşın PRT üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Böylelikle, kitosanın hemostatik kabiliyeti aslen, normal pıhtılaşma yollarındaki plazma proteinlerinin aktivasyonunun hızlandırılmasına değil, alyuvarların membranlarıyla arasındaki fiziksel etkileşim sonucu hemaglutinasyonunun arttırılmasına atfedilmiştir (Janvikul ve ark., 2006).

Bununla birlikte, kırmızı kan hücresi agregasyonunu aktive etme kabiliyetinin spektrofotometrik ölçümlerle değerlendirildiği *in vitro* çalışmada, kitosanın söz konusu agregasyonu oluşurmada görece etkisiz kaldığı belirlenmiştir (Fischer ve ark., 2004). p-GlcNAc polimerlerinin %70-98 oranında deasetilasyonu, lif yapısında bozulmanın yanında, yüzey pozitif yüklerde yaklaşık iki kat azalma sağlamış ve bu da kırmızı kan hücresi agregasyonunda eşlik eden bir azalmaya neden olmuştur (Thatte ve ark., 2004b).

Çalışmamızda, kitosan, protonlanmış kitosan, dimetil kitosan ve trimetil kitosanın oligomerik formlarıyla eritrositler arasındaki etkileşimin mekanizmasını ortaya koyabilmek üzere 100ns'lik MD simölasyonları kullanılmıştır. Yüklü olmayan kitosan ve türevlerinin aksine, yüklü kitosan ve türevleri ile DPPC membranı arasında iyonik/elektrostatik etkileşim gözlenmiştir. Etkileşim esas olarak, kitosandaki pozitif yüklü azot atomları ile DPPC molekölünün fosfat başındaki negatif yüklü oksijen atomları

arasında gerçekleşmektedir (Şekil 4.10). TMK türevi söz konusu olduğunda, metil karbonlarının kuaternize azot atomunda oluşturduğu sterik engele bağlı olarak, etkileşim sekteye uğramakta ve 3Å mesafesinde tamamen ortadan kalkmaktadır (Ek 4, Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Bileşikler ile DPPC membranı arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimin yüzde değerleri.



Şekil 4.10. Yüklü kitosan ve DPPC membranı arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşim. Etkileşim, kuaternize azot atomu ve fosfat başındaki negatif yüklü oksijen atomu arasında gerçekleşir. Mesafe 3Å.

4.7. İn vitro Etkinlik Tayini

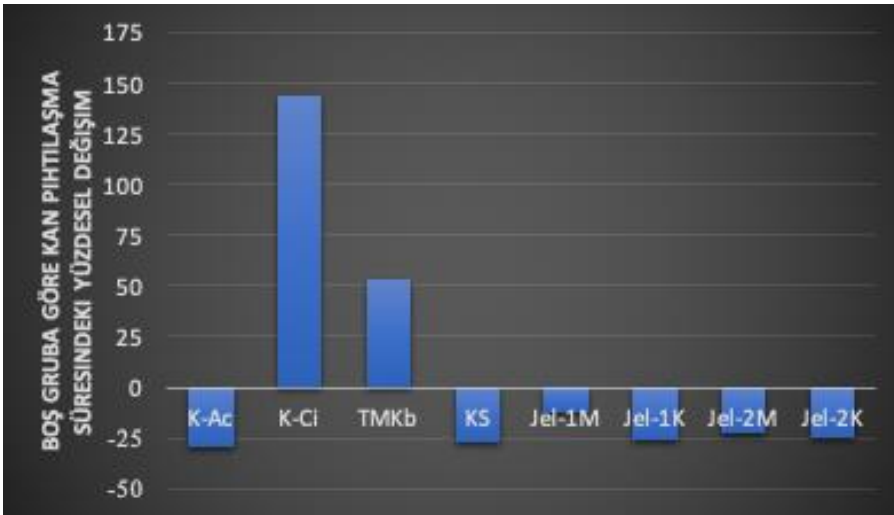
Mekanik işlevleri kesin olarak belirlenememiş olmakla birlikte, kitosan biyomalzemelerinin hemostatik özelliklerinin, moleküler ağırlık, deasetilasyon derecesi, çözünürlük, kitosan derişimi, pozitif yük yoğunluğu, kimyasal yapı modifikasyonu, pH, sıcaklık, inkübasyon süresi, hidrofilik ve hidrofobik özellikler dahil olmak üzere birçok önemli faktöre dayandığı bilinmektedir (Periyah ve ark., 2014). Söz konusu faktörlerdeki farklılara bağlı olarak, kitosanın kan pıhtılaşması üzerindeki etkisine yönelik olarak yapılan çalışmalarda değişken sonuçlar elde edilmiştir.

Kitin, kitosan ve türevlerinin (10mg/ml) PRT üzerine etkilerinin PPP kullanılarak değerlendirildiği çalışmada; PNAC (DD: %56)'nın PRT'yi önemli ölçüde kısalttığı ortaya konulmuştur. Bu materyalin yanısıra, kitinin ve SPONGOSTAN® standartının da PRT'yi önemli ölçüde azaltabilirken, kitosanın anlamlı bir düşüşe neden olmadığı (P<0.05), HTACC'nin ise WHBCT'yi uzattığı ve fibrin oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur. Deneyde gözlemlendiği üzere; amonyum klorür gruplarının pozitif yükleri, alyuvarların

yüzeyindeki negatif yüklerle sıkıca bağlanarak, kan hücrelerinin plazmadan ayrılmasına sebep olmuştur. Araştırmacılar, alyuvarlarla birlikte, muhtemelen pıhtılaşma proteinlerinin negatif yüklerinin de pozitif yüklerle bağlanarak pıhtılaşma kaskadının normal aktivasyonunu inhibe etmiş olabileceğini öne sürmüşlerdir. (Janvikul ve ark., 2006)

Çalışmamızda elde edilen verilerin analizi IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) paket programında yapılmıştır. Pıhtılaşma süreleri ile boş gruba göre pıhtılaşma süresindeki yüzdesel değişimlere ait verilerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro-Wilk testiyle incelenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma, medyan, çeyrekler arası dağılım genişliği, minimum ve maksimum biçiminde verilmiştir. Gruplar arasında pıhtılaşma süreleri ile boş gruba göre pıhtılaşma süresindeki yüzdesel değişimler yönünden farkların önemlilikleri Friedman testi ile incelenmiştir. Friedman test istatistiği sonuçlarının önemli bulunması halinde Dunn-Bonferroni testi kullanılarak farka neden olan grup(lar) tespit edilmiştir. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Boş gruba göre kan pıhtılaşma sürelerinde meydana gelen yüzdesel değişimler yönünden çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0.001$) belirlenmiştir. Söz konusu farka neden olan durumun; boş gruba göre K-Ac, K, Jel-1M, Jel-1K, Jel-2M ve Jel-2K gruplarında WHBCT'nin kısalmışken K-Ci grubunda uzaması olduğu ortaya konulmuştur ($p < 0.05$). Diğer grupların aralarında ise istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir ($p > 0.05$). (Şekil 4.11, Ek 5)



Şekil 4.11. Numunelerin boş gruba göre WHBCT'lerindeki yüzdesel değişim.

K-Ci'nin WHBCT'yi uzatması, deneyde kullanılan sitratlı kanın yanında, söz konusu türevin içerdiği sitratın kalsiyum iyonlarını bağlama kapasitesini arttırmasına atfedilmiştir. Janvikul ve ark. (2006)'nın bildirdiği sonuçlara benzer olarak, TMK türevinin pozitif yükleri kan hücrelerinin ve muhtemelen negatif yüklü pıhtılaşma proteinlerinin plazmadan ayrılmasına sebep olmuştur. Deney sırasında belirgin olarak gözlenen faz ayrımı, TMK türevinin WHBCT değerinin klinik olarak artmasıyla sonuçlanmıştır.

4.8. Antimikrobiyal Etkinlik Tayini

Kitosan, yara bölgesinde enfeksiyonu önleyen antimikrobiyal özellik gösterir (Dutta, Dutta ve Tripathi, 2004; Periyah, Halim ve Hussein, 2012; Paul ve ark., 2014). Kuaterner amonyum kitosanlar, doğal kitosanla karşılaştırıldıklarında, daha geniş pH aralığında, yüksek miktarda su çözünürlüğüne ve antimikrobiyobiyal aktiviteye sahiptirler (Kim ve ark., 1997; Jia, Shen ve Xu, 2001; Kim ve Choi, 2002; Kim ve ark., 2003). Katyonik antibakteriyel maddeler, özellikle harici dezenfeksiyon için yaygın olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 1997). Polikasyonik biyositlerin bakterilere karşı daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Ikeda ve ark., 1986; Takemono, Sunamoto ve Akasi, 1989; Ikeda, Yamaguchi ve Tazuke, 1984).

Kitosanın bakterisidal etkisine yönelik kesin model tam olarak açıklanamamıştır, ancak bazı mekanizmalar öne sürülmüştür. Kan hücreleriyle gösterdiği etkileşime benzer şekilde, kitosanın içerdiği glukozamin merinin düşük pH değerlerinde pozitif olarak yüklenmesi, söz konusu polimerin bakterilerin makromoleküler yapılarıyla etkileşime girebilmesine olanak sağlar. Bu etkileşim, bakteriyel yüzey morfolojisini değiştirebilir, membran geçirgenliğini artırabilir ve hücre içi maddelerin (örneğin, laktat dehidrojenaz, nükleik asitler ve glikoz içeren proteinler) sızmasını teşvik edebilir veya membran geçirgenliğini azaltabilir ve sonuç olarak besin taşınımı sekteye uğratabilir (Prashanth ve Tharanathan, 2007; Munoz-Bonilla ve Fernandez-Garcia, 2012). Ek olarak, protonlanmış NH_3^+ bölgelerini içeren pozitif yüklü kitosanın hücre DNA ile etkileşime girmesinin, transkripsiyonu inhibe ettiği öne sürülmüştür (Prashanth ve Tharanathan, 2007).

Çalışmamızda kullanılan materyallerin antimikrobiyal etkinlikleri EUCAST'ın önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre; TMK en yüksek antimikrobiyal etkinliği gösterirken, K-Ac ve K-Ci eşit eşit düzeyde antimikrobiyal

özelliklere sahiptir. Jel içeriklerinin ise test edilen derişimlerde antimikrobiyal etkinlik göstermediği ortaya konulmuştur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Örneklerin antimikrobiyal etkinlik sonuçları.

Örnekler	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>E.coli</i> ATCC 25923	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Metisilin dirençli <i>S.aureus</i> ATCC 43300
TMKb	>50 µg/mL	25 µg/mL	25 µg/mL	6.25 µg/mL	12.5 µg/mL
K-Ac	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	12.5 µg/mL	12.5 µg/mL
K-Ci	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	12.5 µg/mL	12.5 µg/mL
Jel 1K	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
Jel 2K	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
Jel 1M	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
Jel 2M	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL
Siprofloksasin	-*	0.010 µg/mL	0.5 µg/mL	0.5 µg/mL	-*

* Test edilmemiştir.

Görece düşük MİK değerine sahip olan TMK numunesinin polikatyonik karakteri pH'dan bağımsızdır. Bunun aksine, K-Ci ve K-Ac numunelerinin polikatyonik özellikleri pH'ya bağımlıdır. İnkübasyon sırasında, K-Ac ve K-Ci numunelerinin protonlarını kaybederek polikatyonik özelliklerinin azalmış olabileceği öne sürülmüştür. Bu durum, antimikrobiyal etkinlik testinin yapıldığı Mueller Hinton Broth'un $7,3 \pm 0,1$ (37°C) olan pH değeriyle tutarlıdır. Jel içeriklerinin antimikrobiyal etkinlik göstermemleri, çok düşük miktarda polikatyonik kitosan türevi (ağırlıkça %0,3 kitosan ana zinciri) içermeleriyle tutarlıdır.

Tez çalışması kapsamında değerlendirilen materyallere ait veriler Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Tez çalışması kapsamında değerlendirilen materyallere ait veriler.

	$\overline{DP_w}$	DD	NMe_3^+ / PD	$\overline{\%T_{500}}$ (Çöz.)	Anti mik. etk.	İn-vitro hem. etk.
KH	11.149	79	*	10,8	*	*
KS	6.322	85	*	71,6	*	27,41
K-Ac	*	*	64-67	97,1	+	29,83
K-Ci	*	*	>74	89,1	+	-143,81
TMKb	230	84	79	90,8	++	-52,76**
Jel-1M	*	*	*	*	-	12,1
Jel-1K	*	*	*	*	-	25,69
Jel-2M	*	*	*	*	-	22,36
Jel-2K	*	*	*	*	-	24,39

* Analiz uygun değildir veya yapılmamıştır.

** TMKb türevi için kan pıhtılaşması, viyal ters çevrildiğinde iki fazdan oluşan sıvı akışının tamamen durması olarak tanımlanmıştır.

5. YORUM

Bu tez çalışmasında ilk defa kitosanın polikasyonik özelliği pH bağımlı olmayan türevi TMK'nın *in silico* ve *in vitro*'daki hemostatik özelliği detaylı olarak ortaya konulmuştur. Moleküler modelleme çalışmaları, kitosanın amin ve hidroksil gruplarıyla GPIIb-IIIa trombosit reseptörü arasındaki etkileşimin dıştan içe agonist etkiyi tetikleyebileceğine işaret etmektedir. Söz konusu etkileşimin trimetilasyon sonrasında sekteye uğramış olabileceği öne sürülmüştür. TMK türeviyle GPIIb-IIIa trombosit reseptörü arasındaki etkileşimin doğası ortaya konulmak üzere ek çalışmalar yapılabilir. Çalışmamızda belirlendiği üzere GPIIb-IIIa reseptörüne bağlanmada ağırlıklı olarak kitosanın 3-O ve 6-O grupları etkili olduğundan, O-metilasyonun ve zincir kırılmalarının engellendiği TMK sentez süreçleri sonucunda hemostatik aktivitesi yüksek türevlerin elde edilebileceği öngörülmektedir. Kitosanın ayrıca fibrinojenle etkileşim düzeyinin termodinamik olarak anlamlı bulunması, söz konusu oligomerin/polimerin vWF'nin fonksiyonel analogu olarak işlev gösterebileceğine işaret etmektedir. Bu hipotezi test etmek üzere, kitosan ligandının GPIIb-IIIa ve fibrinojen reseptörleriyle eş zamanlı olarak doking çalışmalarının yapılması planlanmaktadır. MD simülasyonlarıyla açıkça gösterildiği üzere, kitosanın serbest amin grubunun protonlanması, eritrositlerin bağlanması yoluyla pıhtılaşma sürecine katkıda bulunurken, trimetilasyon söz konusu etkileşimi sterik engelleme vasıtasıyla sekteye uğratmaktadır. Trimetilasyon sürecinin ayrıca kitosan ana zinciri üzerinde meydana getirdiği kırılmaların hemostatik etkinliği dolaylı olarak azaltmış olabileceği öne sürülmüştür.

TMKb türevi için kan pıhtılaşması, viyal ters çevrildiğinde iki fazdan oluşan sıvı akışının durması olarak tanımlanmıştır. Alternatif yaklaşım, kan pıhtılaşmasının faz ayrılması noktasında gerçekleştiği yönünde tanımlanmasıdır. Söz konusu yaklaşımın geçerliliği *in vivo* hemostatik etkinlik testinin uygulanması yoluyla test edilebilir. *In vitro* etkinlik testi sırasında, TMK türevinin sabit pozitif yüklerinin etkisiyle, tam kanda oluşturduğu faz ayrımı sonucunda, kan hücrelerinin ve muhtemelen negatif yüklü pıhtılaşma proteinlerinin plazmadan ayrıldığı öne sürülmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda bu hipotez, plazmadaki ve matriste adsorbe edilen proteinlerin SDS-PAGE kullanılarak karşılaştırılması yoluyla test edilecektir. *In vitro* etkinlik testinde K-Ac ve K-Ci türevlerinin TMK'yla aynı etkiyi göstermemesinin ve antimikrobiyal etkinliğinin görece

düşük olmasının nedeninin, söz konusu türevin ilgili pH değerlerinde proteinlerini kaybederek polikatyonik özelliklerinin azalmış olabileceği öne sürülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D.L., Rasheed, R.K. and Tambyrajah, V., *Chemical Communications*, 1 (2003) 70.
- Abhay, S. P., 'Hemostatic wound dressing', US Patent 5836970 A, 1998.
- Aiba, S., *International Journal of Biological Macromolecules*, 14 (1992) 225.
- Alam, H.B., Burriss, D., DaCorta, J.A. et al., *Military Medicine*, 170 (2005) 63.
- Anbergen, U. and Oppermann, W., *Polymer*, 31 (1990) 1854.
- Andrews, R.K. and Berndt, M.C., *Thrombosis Research*, 114 (2004) 447.
- Anitha, A., Sowmya, S., Kumar, P.T.S. et al., *Progress in Polymer Science*, 39 (2014) 1644.
- Ansell, J., Hirsh, J., Hylek, E., Jacobson, A., Crowther, M. and Palareti, G., *Chest*, 133 (2008) 160.
- Aoki, N., Wall, M.J., Demsar, J. et al., *The American Journal of Surgery*, 180 (2000) 540.
- Arcidiaconoand, S. and Kaplan, D., *Biotechnology and Bioengineering*, 39 (1992) 281.
- Armand, R. and Hess, J.R., *Transfusion Medicine Reviews*, 17 (2003) 223.
- Ashby, B., Daniel, J.L and Smith, J.B., *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 4 (1990) 1.
- Atalar, E., Haznedaroglu, I., Aytemir, K., Aksoyek, S., Ovunc, K., Oto, A., et al., *Clinical Cardiology*, 24 (2001) 159.
- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P., *Science*, 212 (1981) 749
- Azuma, K., Ifuku, S., Osaki, T. et al., *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10 (2014) 2891.
- Azuma, K., Nishihara, M., Shimizu, H. et al., *Biomaterials*, 42 (2015) 20.
- Bachtell, N., Goodell, T., Grunkemeier, G., Jin, R.Y. and Gregory, K., *Dialysis and Transplantation*, 35 (2006) 672.
- Bakan, E., Tanıda Laboratuvar, Bakanlar Medya, İstanbul, 2011.
- Barash, P.G., Cullen, B.F., Stoelting, R.K. *Clinical Anesthesia*, 5th edition, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 224-226, 2006.
- Battista, O.A., Erdi, N.Z. and Ferraro, C.F.P., *Journal of Applied Polymer Science*, 11 (1967) 481.
- Bax, W.A., Bruinvels, A.T., van Suylen, R.J., Saxena, P.R., and Hoyer, D., *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 348 (1993) 403.
- Blackbourne, L.H., *Critical Care Medicine*, 36 (2008) 304.
- Blackwell, J., Parker, K.D. and Rudall, K.M., *Journal of Molecular Biology*, 28 (1967) 383.

Blackwell, J., *Biopolymers*, 7 (1969) 281.

Bodnar, M., Hartmann, J. F. and Borbely, J., *Biomacromolecules*, 6 (2005) 2521.

Bodugöz, H., Pekel, N. and Güven, O., *Radiation Physics and Chemistry*, 55 (1999) 667.

Bombeli, T. and Spahn, D.R., *British Journal of Anaesthesia*, 93 (2004) 275.

Bouyer, D., Vachoud, L., Chakrabandhu, Y. and Pochat-Bohatier, C., *Chemical Engineering Journal*, 157 (2010) 605.

Brass, L. F., *Chest*, 124 (2003) 18.

Brandenberg, G., Leibrock, L.G., Shuman, R., Malette, W.G. and Quigley, H., *Neurosurgery*, 15 (1984) 9.

Brunner, E., Ehrlich, H., Schupp, P. et al., *Journal of Structural Biology*, 168 (2009) 539.

Burch, J., Ortiz, V., Richardson, R. et al., *Annals of Surgery*, 215 (1992), 476.

Burkatovskaya, M., Tegos, G.P., Swietlik, E., Demidova, T.N., Castano, A.P. and Hamblin, M. R., *Biomaterials*, 27 (2006) 4157.

Burkatovskaya, M., Castano, A.P., Demidova-Rice, T.N., Tegos, G.P. and Hamblin, M.R., *Wound Repair and Regeneration* 16 (2008) 425.

Burnett, L.R., Richter, J.G., Rahmany, M.B. et al., *Journal of Biomaterials Applications*, 28 (2014) 869.

Cai, J. and Zhang, L., *Macromolecular Bioscience*, 5 (2005) 539.

Capozza, R.C., 'Enzymically decomposable bioerodible pharmaceutical carrier', German Patent 2505305, 1975.

Carey, M.E., *The Journal of Trauma*, 40 (1996) 165.

Carney, D., Martin, J.R., Moore, C. A. et al, *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, 52 (2001) 3.

Castañares, C., Redondo-Horcajo, M., Magán-Marchal, N., ten Dijke, P., Lamas, S. and Rodríguez-Pascual, F., *Journal of Cell Science*, 120 (2007) 1256.

Champion, H.R., Bellamy, R.F., Roberts, C.P. and Leppaniem, A., *Trauma*, 54 (2003) 13.

Chan, M.W., Schwaitzberg, S.D., Demcheva, M. et al, *The Journal of Trauma*, 48 (2000) 454.

Chauhan, G.S., Guleria, L. and Sharma, R., *Cellulose*, 12 (2005) 97.

Chen, C., Li, D., Yano, H. and Abe, K., *Cellulose*, 21 (2014) 3339.

Chou, T. C., Fu, E., Wu, C. J. and Yeh, J.H., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302 (2003) 480.

Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P. et al., *Blood*, 91 (1998) 3527.

Closse, C., Seigneur, M., Renard, M., Pruvost, A., Dumain, P., Belloc, F. et al., *Thrombosis Research*, 85 (1997) 159.

Cole, D.J., Connolly, R.J., Chan, M.W. et al., *Surgery*, 126 (1999) 510.

Cosgriff, N., Moore, E.E., Sauaia, A. et al., *The Journal of Trauma*, 42 (1997) 857.

Coughlin, S.R., *Nature*, 407 (2000) 258.

Csaba, N., Köping-Höggård, M. and Alonso, M.J., *International Journal of Pharmaceutics*, 382 (2009) 205.

Curti, E., de Britto, D. and Campana, S.P., *Macromolecular Bioscience*, 3 (2003) 571.

Dai, T., Tegos, G.P., Burkatovskaya, M., Castano, A.P. and Hamblin, M.R., *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53 (2009) 393.

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M. and Chiellini, E., *Progress in Polymer Science*, 36 (2011) 981.

Davenport, A.P., *Pharmacological Reviews*, 54 (2002) 219.

Davenport, A.P., Hyndman, K.A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D. E., Pollock, J. S. et al, *Pharmacological Reviews*, 68 (2016) 357.

Demitri, C., Del Sole, R., Scalera, F., Sannino, A., Vasapollo, G., Maffezzoli, A., Ambrosio, L. and Nicolais, L., *Journal of Applied Polymer Science*, 110 (2008) 2453.

De Waele, J.J. and Vermassen, F.E., *Acta Chirurgica Belgica*, 102 (2002) 313.

Doolittle, R.F., Spraggon, G. and Everse, S.J., *Current Opinion in Structural Biology*, 8 (1998) 792.

Domard, A., Gey, C., Rinaudo, M. and Terrassin, C., *International Journal of Biological Macromolecules*, 9 (1987) 233.

Domínguez de María, P. and Maugeri, Z. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15 (2011) 220.

Dutta, P.K., Vishwanathan, P., Mimrot, L. and Ravikumar, M.N.V., *Journal of Polymer Materials*, 14 (1997) 531.

Dutta, P.K., Ravikumar, M.N.V. and Dutta, J., *Journal of Macromolecular Science - Polymer Reviews*, 42 (2002) 307.

Dutta, P.K., Khatua, M.K., Dutta, J. and Prasad, R., *International Journal of Chemical Science*, 1 (2003) 93.

Dutta, P.K., Dutta, J. and Tripathi, V.S., *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63 (2004) 20.

Eddy, V.A., Morris, J.A. and Cullinane, D.C., *The Surgical Clinics of North America*, 80 (2000) 845.

Ellis-Behnke, R.G., Liang, Y.X., You, S.W., Tay, D.K.C., Zhang, S.G., So, K.F. et al, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (2006a) 5054.

Ellis-Behnke, R.G., Liang, Y.X, Tay, D.K.C., Kau, P.W.F., Schneider, G.E., Zhang, S. et al., *Nanomedicine*, 2 (2006b) 207.

Falini, G. and Fermani, S., *Tissue Engineering*, 10 (2004) 1.

- Ferrara, A., MacArthur, J.D., Wright, H.K. et al, *The American Journal of Surgery*, 160 (1990) 515.
- Fischer, T.H., Connolly, R., Thatte, H.S. and Schwaitzberg, S.S., *Microscopy Research and Technique*, 63 (2004) 168.
- Fischer, T.H., Thatte, H.S., Nichols, T.C., Bender-Neal, D.E., Bellinger, D.A. and Vournakis, J.N., *Biomaterials*, 26 (2005) 5433.
- Fischer, T.H., Bode, A.P., Demcheva, M. and Vournakis, J.N., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80 (2007) 167.
- Gan, Q., Wang, T., Cochrane, C. and McCarron, P., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces - Journal - Elsevier*, 44 (2005) 65.
- Gardner, K.H. and Blackwell, J., *Biopolymers*, 14 (1975) 1581.
- Gerlach, T., Grayson, J.K., Pichakron, K.O. et al., *The Journal of Trauma*, 69 (2010) 1203.
- Guyton, A.C., Hall, J.E., *Tıbbi Fizyoloji*, (Çev: Çavuşoğlu, H., Çağlayan Yeğen, B., Aydın, Z., Alican, İ.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 463-468, 1996.
- Hall, J.E., in *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology: Enhanced E-Book*, Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 457-459, 2010.
- Hanh, T.T., Huy, H.T. and Hien, N.Q., *Radiation Physics and Chemistry*, 106 (2015) 235.
- Hara, K., Iida, A., Yano, K. and Nishida, T., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38 (2004) 227.
- Hemker, H.C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoort, R., Lecompte, T. and Bequin, S., *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 33 (2003) 4.
- Herrmann, J.B. and Woodward, S.C., *The American Surgeon*, 38 (1972) 26.
- Hiep, N.T., Khon, H.C., Niem, V.V.T., Toi, V.V., Quyen, T.N., Hai, N.D. et al., *International Journal of Polymer Science*, 2016 (2016) 1.
- Hirai, A., Odani, H. and Nakajima, A., *Polymer Bulletin*, 26 (1991) 87.
- Hirano, S. and Nagao, N. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52 (1988) 2111.
- Hirsch, J.A., Reddy, S.A., Capasso, W.E. and Linfante, I., *Techniques in Vascular and Interventional Radiology*, 6 (2003) 92.
- Hirshberg, A. and Mattox, K.L., *Annals of Surgery*, 222 (1995) 3.
- Holme, K.R. and Perlin, A.S., *Carbohydrate Research*, 302 (1997) 173.
- Honary, S., Hoseinzadeh, B. and Shalchian, P., *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (2010) 525.
- Hoven, V., Tangpasuthadol, V., Angkitpaiboon, Y., Vallapa, N. and Kiatkamjornwong, S., *Carbohydrate Polymers*, 68 (2007) 44.
- Hu, X., Du, Y., Tang, Y., Wang, Q., Feng, T., Yang, J. and Kennedy, J.F., *Carbohydrate Polymers*, 70 (2007) 451.

- Hu, B., Pan, C., Sun, Y., Hou, Z., Ye, H., Hu, B. and Zeng, X., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 7451.
- Hu, X., Tang, Y., Wang, Q., Li, Y., Yang, J., Du, Y., and Kennedy, J.F., *Carbohydrate Polymers*, 83 (2011) 1128.
- Hudson, S.M., Smith, C., in *Biopolymers from renewable resources*, Kaplan, D. L. (Ed), Springer-Verlag, New York, 96-118, 1998.
- Ikeda, T., Hirayama, H., Yamaguchi, H. and Tazuke, S., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30 (1986) 132.
- Ikeda, T., Yamaguchi, H. and Tazuke, S., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26 (1984) 139.
- Ikeda, Y., Young, L.H., Vournakis, J.N. et al, *Journal of Surgical Research*, 102 (2002) 215.
- Imoto, T., Johnson, L.N., North, A.T.C., Phillips, D.C., Rupley, J.A., in: *The Enzymes*, Boyer, P.D. (Ed.), Vol. 2., Academic Press, New York, 665–868, 1992.
- Irita, K., *Korean Journal of Anesthesiology*, 60 (2011) 151.
- Janvikul, W., Uppanan, P., Thavornnyutikarn, B., Krewraing, J. and Prateepasen, R., *Journal of Applied Polymer Science*, 102 (2006), 445.
- Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S. et al., *International Journal of Biological Macromolecules*, 40 (2007) 175.
- Jeuniaux, C., *Methods in Enzymology*, 8 (1966) 644.
- Jewelewicz, D.D., Cohn, S.M, Crookes, B.A., Proctor, K.G., *The Journal of Trauma*, 55 (2003) 275.
- Jia, Z.S., Shen, D.F. and Xu, W.L., *Carbohydrate Research*, 333 (2001) 1.
- Johnson, J.W, Gracias, V.H., Schwab, C.W. et al, *The Journal of Trauma*, 51 (2001) 261.
- Johnston, T.D., Chen, Y. and Reed, R.L., *Surgical Forum* 40 (1989) 199.
- Kabra, B.G., Gehrke, S.H. and Spontak, R. J., *Macromolecules*, 31 (1998) 2166.
- Kamari, A., Wan Saime, W.N. and Lai Ken, L., *Journal of Environmental Sciences*, 21 (2009) 296.
- Kamath, S. and Lip, G.Y., *QJM*, 96 (2003) 711.
- Karp, G., in *Cell Biology*, John Wiley & Sons, New Jersey, 323, 2010.
- Karrer, P. and Hofmann, A., *Helvetica Chimica Acta*, 12 (1929) 616.
- Kaya, M., Sargin, I., Aylanc, V. et al., *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 38 (2016) 146.
- Kelly, J.A., Shukaliak, A.M., Cheung, C.C.Y., Shopsowitz, K.E., Hamad, W.Y. and MacLachlan, M.J., *Angewandte Chemie, Int. Ed.*, 52 (2013) 8912.
- Kennedy, C.D., *Biochemical Education*, 18 (1990) 35.

- Kheirabadi, B.S., Acheson, E.M., Deguzman, R., Sondeen, J.L., Ryan, K.L, Delgado, A. et al., *The Journal of Trauma*, 59 (2005) 25.
- Kheirabadi, B.S., Scherer, M.R., Estep, J.S., Dubick, M.A. and Holcomb, J.B., *The Journal of Trauma*, 67 (2009) 450.
- Khoshmohabat, H., Dalfardi, B., Dehghanian, A. et al., *Journal of Surgical Research.*, 200 (2016) 732.
- Khuri, S., Najar, S.F., Healey, N.A., McGarry, T., Khan, B., Thatte, H.S., A blinded study to evaluate poly-N-acetyl glucosamine as a hemostatic agent in patients undergoing cardiac catheterization, *Harvard University Medical School Symposium on Clinical Activity and Mode of Action of Poly-N-Acetyl Glucosamine*, 25 Şubat, Boston, Massachusetts, 2003.
- Kim, C.H., Choi, J.W., Chun, H.J and Choi, K.S., *Polymer Bulletin*, 38 (1997) 387.
- Kim, C.H. and Choi, K.S., *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 8 (2002) 71.
- Kim, J.Y., Lee, J.K., Lee, T.S. and Park, W.H., *International Journal of Biological Macromolecules*, 32 (2003) 23.
- Kim, S., Venkatesan., J., in *Chitin and Chitosan Derivatives*, Kim S. (Ed), CRC Press, Florida, 3-11, 2014.
- Kimura, A., Nagasawa, N. and Taguchi, M., *Radiation Physics and Chemistry*, 103 (2014) 216.
- Kitamura, K., Yasuoka, R., Ohara, M., Shimotsuma, M., Hagiwara, A., Yamane, T., Yamaguchi, T. and Takahashi, T., *Surgery Today*, 25 (1995) 433.
- Klokkevold, P.R., Fukayama, H., Sung, E.C. and Bertolami, C.N., *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57 (1999) 49.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K. and Park, H.J., *International Journal of Food Microbiology*, 144 (2010) 51.
- Kono, H. and Fujita, S., *Carbohydrate Polymers*, 87 (2012) 2582.
- Kono, H. and Zakimi, M., *Journal of Applied Polymer Science*, 128 (2013) 572.
- Kouraklis, G., Spirakos, S. and Glinavou, A., *Surgery Today*, 32 (2002) 195.
- Kulling, D., Vournakis, J.N., Woo, S. et al., *Gastrointestinal Endoscopy*, 49 (1999) 764.
- Kunio, N.R., Riha, G.M., Watson, K.M., Differding, J.A., Schreiber, M.A. and Watters, J.M., *The American Journal of Surgery*, 205 (2013) 505.
- Landes, D.R. and Bough, W.A., *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 15 (1976) 555.
- Langdell, R.D., Wagner, R.H. and Brinkhous, K.M., *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 41 (1953) 7637.
- Larson, M.J., Bowersox, J.C., Lim, R.C. and Hess, J.R., *The Archives of Surgery*, 130 (1995) 420.
- Lasne, D., Jude, B. and Susen, S., *Canadian Journal of Anesthesia*, 53 (2006) 2.

- Ledesma-Osuna, A.I., Ramos-Clamont, G., Guzman-Partida, A.M. et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 12000.
- Lee, K.Y., Wan, S.H. and Park, W.H., *Biomaterials*, 16 (1995) 1211.
- Lee, Y.M., Kim, S.H. and Kim, S.J., *Polymer*, 37 (1996) 5897.
- Lee, S.T., Mi, F.L., Shen, Y.J. and Shyu, S.S., *Polymer*, 42 (2001) 1879.
- Leger, R.J.S., Cooper, R.M., ve Charnley, A.K., *Journal of General Microbiology*, 132 (1986) 1509.
- Lew, W.K and Weaver, F.A., *Biologics* 2 (2008) 593.
- Li, R. and Emsley, J., *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 11 (2013) 605.
- Li, Y., Liao, X., Zhang, X et al., *Nano Research*, 7 (2014) 1457.
- Liang, S.M., Wu, J.J., Tian, H.F., Zhang, L.N. and Xu, J., *ChemSusChem*, 1 (2008) 558.
- Loveland, J.A. and Boffard, K.D., *British Journal of Surgery*, 91 (2004) 1095.
- Lu, X.H., Hu, Z.B. and Gao, J., *Macromolecules*, 33 (2000) 8698.
- Luddington, R.J., *Clinical & Laboratory Haematology*, 27 (2005) 81.
- Macfarlane, R.G., *Nature*, 202 (1964) 498.
- Mackman, N., Tilley, R.E. and Key, N.S., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27 (2007) 1687.
- Malette, W.G., Quigley, H.J, Gaines, R.D., Johnson, N.D. and Rainer, W.G., *The Annals of Thoracic Surgery*, 36 (1983) 55.
- Malmberg, C. and Maryott, A.A., *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 56 (1956) 1.
- Manly, D.A., Boles, J. and Mackman, N., *Annual Review of Physiology*, 73 (2011) 515.
- Mann, K.G., Whelihan, M.F., Butenas, S. and Orfeo, T., *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5 (2007) 2055.
- Marasciulo, F.L., Montagnani, M. and Potenza, M.A., *Current Medicinal Chemistry* 13 (2006) 1655.
- Marguerite, R., Pham, L.D., Claude, G., *International Journal of Biological Macromolecules*, 14 (1992) 122.
- Martini, W., Pusateri, A, Uscilwicz, J. et al., *The Journal of Trauma*, 58 (2005) 1002.
- Masri, M.S., Randall, V.G and Stanley, W.L., in *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, Muzzarelli, R.A.A. and Pariser, E.R. (Eds.), Cambridge, Massachusetts-United States, 11 – 13 April 1977, MIT See Grant Publication, 1977, p. 364.
- Maynard, D.M, Heijnen, H.F., Horne, M.K., White, J.G. and Gahl, W.A., *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5 (2007) 1945.

- McCarthy, S.J., Kenton, W.G, Morgan, J.W., ‘ Tissue Dressing Assemblies, Systems, And Methods Formed From Hydrophillic Polymer Sponge Structures Such As Chitosan’, US Patent 0147656 A1, **2005**.
- McEwan, P.A., Andrews, R.K. and Emsley, J., *Blood*, 114 (**2009**) 4883.
- McManus, J., Hurtado, T., Pusateri, A. et al., *Prehospital Emergency Care*, 11 (**2007**) 67.
- Meybohm, P., Zacharowski, K. and Weber, C.F., *Critical Care*, 17 (**2013**) 218.
- Mohandas, N. and Gallagher, P.G., *Blood*, 112 (**2008**) 3939.
- Monroe, D.M., Hoffman, M., Roberts, H.R., in: *Williams Hematology*, 8th Edition, Kaushansky, K., Lichtman, M., Beutler, E., Kipps, J.T., Seligshon, U. and Prchal, J.T. (Eds), McGraw-Hill Professional Publishing, New York, 614-616, **2010**.
- Munoz-Bonilla, A. and Fernandez-Garcia, *Progress in Polymer Science*, 37 (**2012**) 281.
- Muzzarelli, R.A.A., in *Chitin*, Pergamon Press, Oxford, 57-58, **1977**.
- Muzzarelli, R. A. A., Tanfani, F. and Scarpini, G., *Biotechnology and Bioengineering*, 22 (**1980**) 885.
- Muzzarelli, R. A. A., Tanfani, F., Emanuelli, M. J. and Mariotti, S., *Carbohydr. Res.*, 2 (**1982a**) 145.
- Muzzarelli, R.A.A., Tanfani, F., Emanuelli, M. and Mariotti, S.N., *Carbohyd. Res.*, 107 (**1982b**) 199.
- Muzzarelli, R. A. A. and Tanfani, F., *Carbohydrate Polymers*, 5 (**1985**) 297.
- Muzzarelli, R.A.A. in *Advances in Chitin and Chitosan*, Brine C.J. (Ed), Elsevier, London, 9-15, **1992**.
- Muzzarelli, R.A.A., Morganti, P., Morganti, G. et al., *Carbohydrate Polymers*, 70 (**2007**) 274.
- Muzzarelli, R. A. A., *Topics in Geobiology*, 34 (**2011**) 1.
- Myers, D.D, Hawley, A.E., Farris, D.M., Wroblewski, S.K., Thanaporn, P., Schaub, R.G. et al., *Journal of Vascular Surgery*, 38 (**2003**)1075.
- Nelsestuen, G.L., *Journal of Biological Chemistry*, 251 (**1976**) 5648.
- Ngah, W.S.W. and Fatinathan, S., *Journal of Environmental Management*, 91 (**2010**) 958.
- Nishimura, S.I., Ikeuchi, Y. and Tokura, S., *Carbohydrate Research*, 134 (**1984**) 305.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Numata, F., Tone, Y., Tokura, S. and Azuma, I., *Vaccine*, 3 (**1985**) 379.
- Nishio, Y. and Manley, R.S., *Macromolecules*, 21 (**1988**) 1270.
- Noyan, A., *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*, Meteksan, Ankara, 661-662, **2000**.
- Nylander, S., Mattsson, C., Ramstrom, S. and Lindahl, T.L., *British Journal of Pharmacology*, 142 (**2004**) 1325.

- Okamoto, Y., Yano, R., Miyatake, K., Tomohiro, I., Shigemasa, Y. and Minami, S., *Carbohydrate Polymers*, 53 (2003) 337.
- Okamura, T., Masui, T., St. John, M.K., Cohen, S.M. and Taylor, R.J., *Hinyokika Kyo*, 41 (1995) 289.
- Olsen, R., Schwartzmiller, I., Weppner, W., Winandy, R., in *Proceedings of the Fourth International Conference on Chitin and Chitosan*, Vol. 4, Trondheim, Norway, 813, 1989.
- Owen, C.A., *A history of blood coagulation*. Rochester, Minnesota, Mayo Foundation, 2001.
- Owens, A.P. and Mackman, N., *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 104 (2010) 432.
- Palta, S., Saroa, R. and Palta, A., *Indian Journal of Anaesthesia*, 58 (2014) 515.
- Pandey, M. and Amin, M.C.I.M., *International Journal of Polymeric Materials*., 62 (2013) 402.
- Pandey, M., Amin, M.C.I.M.N., Ahmad, N. and Abeer, M.M., *International Journal of Polymer Science*., 2013 (2013) 1.
- Papineau, A.M., Hoover, D.G., Knorr, D. and Farkas, D.F., *Food Biotechnology*, 5 (1991) 45.
- Park, K.R. and Nho, Y.C, *Radiation Physics and Chemistry*, 67 (2003) 361.
- Parr, M.J. and Alabdi, T., *Injury*, 35 (2004) 713.
- Paul, W., Deepa, R., Anilkumar, T.V., Sharma, C.P., in *Advances in Drug Discovery and Developments*, Kim, S. (Ed.), CRC Press, Florida, 243-257, 2014.
- Pauls, J.E., Hockin, M.F., Long, G.L. and Mann, K.G., *Biochemistry*, 39 (2000) 5468.
- Pekelharing, C.A., *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 18 (1892) 1133.
- Percot, A., Viton, C. and Domard, A., *Biomacromolecules*, 4 (2003) 12.
- Periyah, M.H., Halim, A.S. and Hussein, A.R., *Regenerative Research*, 1 (2012) 38.
- Periyah, M. H., Halim, A.S., Yaacob, N.S., Zaharil, A., Saad, M., Hussein, A. R. et al., *BioMed Research International*, 2014 (2014) 6.
- Petruš, L., Gray, D.G. and BeMiller, J.N., *Carbohydrate Research*, 268 (1995) 319.
- Phillips, D.R., Teng, W., Arfsten, A., Nannizzi-Alaimo, L., White, M.M., Longhurst, C., Shattil, S.J., Randolph, A., Jakubowski, J.A., Jennings, L.K. and Scarborough, R.M., *Circulation*, 96 (1997) 1488.
- Pietramaggiore, G., Yang, H.J., Scherer, S.S., Kaipainen, A., Chan, R.K., Alperovich, M. et al., *The Journal of Trauma*, 64 (2008) 803.
- Pogorielov, M., Kalinkevich, O., Deineka, V., Garbuzova, V., Solodovnik, A., Kalinkevich, A., et al., *Biomaterials Research*, 19 (2015) 1.
- Prasad, K., Murakami, M.A., Kaneko, Y., Takada, A., Nakamura, Y. and Kadokawa, J., *International Journal of Biological Macromolecules*, 45 (2009) 221.
- Prashanth, K.V.H. and Tharanathan, R.N., *Trends in Food Science and Technology*, 18 (2007) 117.

- Purich, D. L., *Enzyme Kinetics. Catalysis & Control: A Reference of Theory and Best-Practice Methods*, Elsevier, California, 418-419, **2010**.
- Pusateri, A.E., Modrow, H.E. and Harris, R.A., *The Journal of Trauma*, 55 (**2003**) 518.
- Qin, Y., Lu, X., Sun, N. and Rogers, R. D., *Green Chemistry*, 12 (**2010**) 968.
- Raccuia, J.S., Simonian, G., Dardik, M. et al. *The American Journal of Surgery*, 163 (**1992**) 234.
- Rand, M.D., Lock, J.B., van't Veer, C., Gaffney, D.P. and Mann, K.G., *Blood*, 88 (**1996**) 3432.
- Rao, S. B. and Sharma, C. P., *Journal of Biomedical Materials Research*, 34 (**1997**) 21.
- Ravikumar, M. N. V., *Bulletin of Materials Science*, 22 (**1999**) 905.
- Ravikumar, M.N.V., Dutta, P.K. and Nakamura, S., *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62 (**2000**) 55.
- Rao, S.B. and Sharma, C.P., *Journal of Biomedical Materials Research*, 34 (**1997**) 21.
- Reed, R.L., Heimbach, D.M., Counts, R.B. et al., *Annals of Surgery*, 203 (**1986**) 40.
- Reiss, R.F., and Oz, M.C., *Transfusion Medicine Reviews*, 10 (**1996**) 85.
- Rendu, F. and Brohard-Bohn, B., *Platelets*, 12 (**2001**) 261.
- Resnic, F., Blake, G.J., Ohno-Machado, L. et al., *American Journal of Cardiology*, 88 (**2001**) 493.
- Rinaudo, M., Pavlov, G. and Desbrie, J., *International Journal of Biological Macromolecules*, 40 (**1999**) 7029.
- Robinson, D. and Stirling, J.L., *The Biochemical Journal*, 107 (**1968**) 321–327.
- Rodriguez, R., Alvarez-Lorenzo, C. and Concheiro, A., *Journal of Controlled Release*, 86 (2003) 253.
- Rohrer, M.J. and Natale, A.M., *Critical Care Medicine*, 20 (**1992**)1402.
- Rosiak, J.M., *Journal of Controlled Release*, 31 (**1994**) 9.
- Rosiak, J.M. and Ulanski, P., *Radiation Physics and Chemistry*, 55 (**1999**) 139.
- Rotondo, M.F. and Bard MR, *Injury*, 35 (**2004**) 649.
- Rutherford, F. and Austin, P. R., in *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, Muzzarelli, R.A.A. and Pariser, E.R. (Eds.), Cambridge, Massachusetts-United States, 11 – 13 April 1977, MIT See Grant Publication, **1977**, p. 182.
- Rutherford, E.J., Morris, J.A., Reed, G.W., et al., *The Journal of Trauma*, 33 (**1992**) 417.
- Rwei, S.P., Lyu, M.S., Wu, P.S., Tseng, C.H., Huang, H.W., *Cellulose*, 16 (**2009**) 9.
- Sabbatani, L., *Archives Italiennes de Biologie*, 36 (**1901a**) 397.
- Sabbatani L., *Archives Italiennes de Biologie*, 36 (**1901b**) 416.
- Saçak, M., *Polimer Kimyası*, 3. Baskı, Gazi Kitabevi, **2006**.
- Sadler, J.E., *Annual Review of Biochemistry* 67 (**1998**) 395.

- Said, H.M., Abd Alla, S.G.A. and El-Naggar, A.W.M., *Reactive and Functional Polymers*, 61 (2004) 397.
- Salaberria, A. M., Labidi, J. and Fernandes, S.C.M., *European Polymer Journal*, 68 (2015) 503.
- Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemas, Y., Ogawa, R. and Tokura, S., *International Journal of Biological Macromolecules*, 12 (1990) 295.
- Sashiwa, H. and Shigemasa, Y., *Carbohydrate Polymers*, 39 (1999) 127.
- Sauaia, A., Moore, F.A., Moore, E.E. et al., *The Journal of Trauma*, 38 (1995) 185.
- Schwendeman, R. H., *Chemistry 383 lecture notes [PDF belgesi]*, <https://msu.edu/course/cem/383/383sl5a.pdf> (Erişim tarihi: 19 Nisan 2019).
- Schiødt, J., Harrit, N., Christensen, U. and Petersen, L.C., *FEBS Letters*, 306 (1992) 265.
- Schmidt, R.J., Chung, L.Y., Andrews, A.M. et al., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45 (1993) 508.
- Seong, H.S., Whang, H. S. and Ko, S.W.J., *Journal of Applied Polymer Science*, 76 (2000) 2009.
- Sharma, M., Mukesh, C., Mondal, D. and Prasad, K., *RSC Advances*, 3 (2013) 18149.
- Sharp K.W. and Locicero, R.J., *Annals of Surgery*, 215 (1992) 467.
- Shen, X., Shamshina, J.L., Berton, P., Gurau, G., and Rogers, R.D., *Green Chemistry*, 18 (2016) 53.
- Shu, X.Z., Zhu, K.J. and Song, W., *International Journal of Pharmaceutics*, 212 (2001) 19.
- Sieval, A.B., Thanoual, M., Kotzkb, A.F., Verhoefa, J.C., Brussec, J. and Junginger, H.E., *Carbohydrate Polymers*, 36 (1998) 157.
- Silva, S. S., Duarte, A.R.C., Carvalho, A.P., Mano, J.F. and Reis, R.L. *Acta Biomaterialia*, 7 (2011) 1166.
- Somorin, O., Nishi, N., Tokura, S. and Noguchi, J., *Polymer Journal*, 11 (1979) 391.
- Stow, L.R., Jacobs, M.E., Wingo, C.S. and Cain, B.D., *FASEB Journal*, 25 (2011) 16.
- Stryer, L., in *Biochemistry*, WH Freeman & Co, New York, 283–312, 1988.
- Sudharshan, N.R., Hoover, D.G. and Knorr, D., *Food Biotechnology*, 6 (1992) 257.
- Sugamori, T., Iwase, H., Maeda, M. et al., *Journal of Biomedical Materials Research*, 49 (2000) 225.
- Sureshkumar, M.K., Das, D., Mallia, M.B. and Gupta, P.C., *Journal of Hazardous Materials*, 184 (2010) 65.
- Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N.A., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43 (2003) 145.
- Szymańska, E.S. and Winnicka, K., *Marine Drugs*, 13 (2015) 1819.
- Szymonowicz, M., Kucharska, M., Wiśniewska-Wrona, M., Dobrzyński, M., Kołodziejczyk, K., and Rybak, Z., *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 19 (2017) 151.

- Takemono, K., Sunamoto, J., Akasi, M., in *Polym & Medical Care*, Mita, Tokyo, Chapter 4, **1989**.
- Taleb, M.F.A, *Polymer Bulletin*, 61 (**2008**) 341.
- Thanou, M., Florea, B.I., Langemeyer, M.W., Verhoef, J.C. and Junginger, H.E., *Pharmaceutical Research*, 17 (**2000**) 27.
- Thatte, H. S., Zagarins, S., Khuri, S.F. and Fischer, T.H., *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 57 (**2004a**) 13.
- Thatte, H.S., Zagarins, S.E., Amiji, M. and Khuri, S.F., *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 57 (**2004b**) 7.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 8.0, **2018**.
- Thornton, P. and Douglas, J., *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 24 (**2010**) 339.
- Tong, P., Baba, Y., Adachi, Y. and Kawazu, K., *Chemistry Letters*, 9 (**1991**) 1529.
- Tortora, G. J., Derrickson, B., *Principles of Anatomy and Physiology*, John Wiley & Sons, NJ, **2009**.
- Triplett, D.A., *Clinical Chemistry*, 46 (**2000**) 1260.
- Tsioptsias, C. and Panayiotou, C., *Journal of Supercritical Fluids*, 47 (**2008**) 302.
- Valeri, C.R., Cassidy, G., Khuri, S. et al., *Annals of Surgery*, 205 (**1987**) 175.
- Valeri, C.R., Rithy, S., Tilahun, D. and Ragno, G., *Journal of Trauma*, 57 (**2004**) 22.
- Varum, K.M., Holme, H.K., Izume, M., Stokke, B.T. and Smidsrod, O., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1291 (**1996**) 5.
- Verheul, R.J., Amidi, M., van der Wal, S., van Riet, E., Jiskoot, W. and Hennink, W.E., *Biomaterials*, 29 (**2008**) 3642.
- Vournakis, J.N., Finkielsztejn, S., Sergio, F., Pariser E.R., Ernest R. and Helton, M., 'Biocompatible Poly- β -1- \rightarrow 4-N-Acetylglucosamine' US Patent, 5,622,834, **1997**.
- Vournakis, J.N., Demcheva, M., Whitson, A., Guirca, R., Pariser, E.R., *Harvard Symposium on Clinical Activity and Mode of Action of the Hemostatic Agent Poly- N-Acetyl Glucosamine*, Boston, MA, **2003**.
- Vournakis, J. N., Demcheva, M., Whitson, A, Guirca, R. and Pariser, E.R., *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, 57 (**2004**) 2.
- Wach, R. A., Mitomo, and Yoshii, F., *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 261 (**2004**) 113.
- Wang, M., Xu, L., Zhai, M.L.J., Peng, Li, J. Q. and Wei, G.S., *Carbohydrate Polymers*, 74 (**2008**) 498.
- Wang, H., Gurau, G., and Rogers, R.D., *Chemical Society Reviews*, 41 (**2012**) 1519.

- Ward, K.R., Tiba, M.H., Holbert, W.H. et al., *Journal of Trauma, Injury, Infection, and Critical Care*, 63 (2007) 276.
- Watts, D.D, Trask, A. and Soeken, K., *Journal of Trauma*, 44 (1998) 846.
- Wedmore, I., McManus, J.G., Pusateri, A.E. and Holcomb, J.B.A., *Journal of Trauma, Injury, Infection and Critical Care*, 60 (2006) 655–658.
- Weigelt J.A., Lewis, F.R. in *Surgical Critical Care*, WB Saunders, Philadelphia, 199- 205, 1996.
- Wenming, X., Peixin, X. and Qin, L. *Carbohydrate Polymers*, 50 (2002) 35.
- Whang, H.S., Kirsch, W., Zhu, Y.H., Yang, C.Z, and Hudson, S.M., *Journal of Macromolecular Science: Part C: Polymer Reviews*, 45 (2005) 309.
- Whistler, R.L. and Kosik, M., *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 142 (1971) 106.
- Williamson, S.L., Armentrout, R.S., Porter R.S and McCormick, C.L. *Macromolecules*, 31 (1998) 8134.
- Woodman, R.C and Harker L.A., *Blood*, 76 (1990) 1680.
- Wright, J.K., Kalns, J., E., Wolf, A. et al., *Journal of Trauma, Injury, Infection, and Critical Care*, 57(2004) 224.
- Wysokowski, M., Petrenko, I., Stelling, A.L. et al *Polymers*, 7 (2015) 235.
- Xie, H., Zhang, S. and Li, S., *Green Chemistry*, 8 (2006) 630.
- Yamazaki, S., Takegawa, A., Kaneko, Y., Kadokawa, J., Yamagata, M. and Ishikawa, M., *Electrochemistry Communications*, 11 (2009) 68.
- Yıldız, C. ve Özgürtaş, T., *TOTBİD Dergisi*, 16 (2017) 247.
- Yilmaz, E. ve Bengisu, M., *Carbohydrate Polymers*, 54 (2003), 479.
- Yoshimura, T., Matsuo, K. and Fujioka, R., *Journal of Applied Polymer Science*, 99 (2006) 3251.
- Yoshimura, T., Uchikoshi, I., Yoshiura, Y. and Fujioka, R., *Carbohydrate Polymers*, 61(2005) 322.
- Youngken, H.W., *Lloydia*, 32 (1969) 407.
- Yuan, J., Jameson, C.J., ve Murad, S., *Molecular Simulation*; 35 (2009) 953.
- Zhai, M., Ha, H., Yoshii, F., Makuuchi, K., *Radiation Physics and Chemistry*, 57 (2000) 459.
- Zhang, L., Ruan, D. and Gao, S., *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 40 (2002) 1521.
- Zhang, Y.P., Shao, H., Wu, C.X. and Hu, X.C., *Macromolecular Bioscience*, 1 (2001) 141.
- Zhao, L., Mitomo, H. and Yoshii, F., *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23 (2008) 319.
- Zhao, L., H. Mitomo, N. Nagasawa, F. Yoshii and T. Kume, *Carbohydrate Polymers*, 51 (2003) 169.

Zhao, S.H., Wu, X.T., Guo, W.C., Du, Y.M, Yu, L. and Tang, J., International Journal of Pharmaceutics, 393 (2010) 268.

Zhishen, J., Dongfen, S. and Weiliang, X., Carbohydrate Research, 333 (2001) 1

Zhou, J., Chang, C., Zhang, R. and Zhang, L., Macromolecular Bioscience, 7 (2007) 804.

Zhu, J., Luo, B.H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N. and Springer, T.A., Molecular Cell, 32 (2008) 849.

EKLER

Ek 1. Hesaplamalar

A. DP Değerlerinin Hesaplanması

KH

Kalibrasyon eğrisinin çiziminde pullulan standartları kullanıldığı için $m = \sim 180$(1)

Eşitlik 1’de M_w (Ek 3) ve (1) değerleri yerlerine konularak KH fraksiyonlarının DP_w değerleri hesaplanmıştır:

$$DP_{w1} = M_{w1} / M_o = \sim 11 \dots\dots\dots(2)$$

$$DP_{w2} = M_{w2} / M_o = \sim 129 \dots\dots\dots(3)$$

$$DP_{w3} = M_{w3} / M_o = \sim 17.447 \dots\dots\dots(4)$$

Eşitlik 2’de (2), (3) ve (4) yerlerine konularak KH’nin $\overline{DP_w}$ değeri hesaplanmıştır:

$$\overline{DP_w} = \sum_{i=1}^f \frac{DP_{wi} \times A_i}{A_T} = (11 \times 1.679,6 / 6.758,5) + (129 \times 766,15 / 6.758,5) + (17447 \times 4.312,5 / 6.758,5) = 2,73368351 + 14,6235629 + 11.131,3848 = \sim 11.149$$

KS

Eşitlik 1’de M_w (Ek 3) ve (1) değerleri yerlerine konularak KS fraksiyonlarının DP_w değerleri hesaplanmıştır:

$$DP_{w1} = M_{w1} / M_o = \sim 61 \dots\dots\dots(5)$$

$$DP_{w2} = M_{w2} / M_o = \sim 15.123 \dots\dots\dots(6)$$

Eşitlik 2’de (5) ve (6) yerlerine konularak KS’nin $\overline{DP_w}$ değeri hesaplanmıştır:

$$\overline{DP_w} = \sum_{i=1}^f \frac{DP_{wi} \times A_i}{A_T} = (61 \times 6.018,9 / 10.301,2) + (15.123 \times 4.282,3 / 10.301,2) = 35,6417602 + 6.286,76493 = \sim 6.322 \dots\dots\dots(7)$$

TMKa

Eşitlik 1’de M_w (Ek 3) ve (1) değerleri yerlerine konularak TMKa fraksiyonlarının DP_w değerleri hesaplanmıştır:

$$DP_{W1} = Mw_1 / Mo = \sim 136 \dots \dots \dots (8)$$

$$DP_{W2} = Mw_2 / Mo = \sim 8.052 \dots \dots \dots (9)$$

Eşitlik 2’de (8) ve (9) yerlerine konularak TMKa’nın \overline{DPw} değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} \overline{DPw} &= \sum_{i=1}^f \frac{DPw_i \times A_i}{A_T} = (136 \times 2051,7 / 2.096,8) + (8.052 \times 45,1 / 2.096,8) = \\ &= 133,074781 + 173,190195 = \sim 306 \dots \dots \dots (10) \end{aligned}$$

TMKb

Eşitlik 1’de Mw (Ek 3) ve (1) değerleri yerlerine konularak TMKb fraksiyonlarının DPw değerleri hesaplanmıştır:

$$DP_{W1} = Mw_1 / Mo = \sim 17 \dots \dots \dots (11)$$

$$DP_{W2} = Mw_2 / Mo = \sim 1.088 \dots \dots \dots (12)$$

$$DP_{W3} = Mw_3 / Mo = \sim 7.745 \dots \dots \dots (13)$$

Eşitlik 2’de (11), (12) ve (13) yerlerine konularak TMKb’nin \overline{DPw} değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} \overline{DPw} &= \sum_{i=1}^f \frac{DPw_i \times A_i}{A_T} = (17 \times 1.130,4 / 1.305,7) + (1.088 \times 161,62 / 1.305,7) + (7.745 \times \\ &13,653 / 1305,7) = 14,7176227 + 134,673018 + 80,9852838 = \\ &\sim 230 \dots \dots \dots (14) \end{aligned}$$

TMK

Eşitlik 2’de (10) ve (14) yerlerine konularak TMK’nin \overline{DPw} değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} \overline{DPw} &= \sum_{i=1}^f \frac{DPw_i \times A_i}{A_T} = (306 \times 2096,8 / 3.402,4) + (230 \times 1305,7 / 3.402,4) \\ &= 188,578885 + 88,2644604 = \sim 277 \end{aligned}$$

B. KH ve KS’nin DD’lerinin Hesaplanması

Eşitlik 3’te, [CH3] ve [H2-H6] değerleri (Ek 2A) yerlerine konularak KS ve KH’nin % Asetilasyon dereceleri hesaplanabilir. Eşitlik 4’te, % Asetilasyon derecelerinin söz konusu değerleri yerlerine konularak %DD değerleri belirlenmiştir:

$$\% \text{ Asetilasyon}_{(KS)} = \left(\frac{0,46}{6} \times 2 \right) \times 100 = \sim 15 \Rightarrow \% \text{ DD}_{(KS)} = 100 - 15 = 85 \dots \dots \dots (15)$$

$$\% \text{ Asetilasyon}_{(KH)} = \left(\frac{0,62}{6} \times 2 \right) \times 100 = \sim 21 \Rightarrow \% \text{ DD}_{(KH)} = 100 - 21 = 79$$

C. Protonlanmış Kitosanların PD'lerinin pH Verisi Kullanılarak Hesaplanması

K-Ac

(15) kullanılarak KS'nin monomerinin ortalama mol kütlesi aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$M_{\text{glukozamin}}: 179,17$$

$$M_{\text{N-asetil glukozamin}}: 221,21$$

$$\text{KS} \Rightarrow \%15 \text{ asetile, } M_{\text{monomer}} = (179,17 \times 85) + (221,21 \times 15) / 100 = \sim 185,476 \text{ g/mol} \dots \dots \dots (16)$$

Kitosan polimeri kondensasyon reaksiyonuyla oluştuğu için, (7) ve (16) kullanılarak KS merinin ortalama mol kütlesi aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$M_{\text{mer}} = 185,476 - 18 \times [(\overline{DPw}-1)/\overline{DPw}] \\ = \sim 185,476 - 17,997 = \sim 167,5 \text{ g/mol} \dots \dots \dots (17)$$

(17) kullanılarak sentezin içerdiği KS'nin C_P değeri hesaplanmıştır:

$$m_{\text{KS}} = 0,25 \text{ g}$$

$$1 \text{ mol KS meri} \quad 167,5 \text{ g ise}$$

$$x \text{ mol KS meri} \quad 0,25 \text{ g 'dır.}$$

$$x = \sim 0,00149254 \text{ mol}$$

$$C_P = n/V \rightarrow$$

$$C_P = 0,00149254 / 0,05 = \sim 0,02985075 \text{ monomol/L} \dots \dots \dots (18)$$

Sentez 1'de başlangıçta kullanılan Ac-H'nin C_A değeri aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$1 \text{ ml Ac-H} \quad 1,05 \text{ g}$$

$$0,262 \text{ ml Ac-H} \quad x$$

$$x = 0,2751 \text{ g}$$

$$1 \text{ mol Ac-H} \quad 60,05 \text{ g}$$

$$y \text{ mol Ac-H} \quad 0,2751 \text{ g}$$

$$y = 0,00458118 \text{ mol}$$

$$C_A = n/V = 0,00458118 / 0,05 = 0,09162365 \text{ M} \dots \dots \dots (19)$$

Çözeltideki serbest [H₃O⁺] miktarı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

Çözeltinin pH₁ = 4,13 (25,9 °C) olarak ölçülmüştür.

$$-\log [\text{H}_3\text{O}^+] = 4,13 \rightarrow \log [\text{H}_3\text{O}^+] = -4,13 \rightarrow [\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-4,13} = 7,413 \times 10^{-5} \text{ M} \dots \dots \dots (20)$$

İdeal çözelti (I = 0) varsayımı altında, Eşitlik 5 'te K değeri ve (20) yerine konularak α'' değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} K &= [\text{H}_3\text{O}^+](\alpha'' | 1 - \alpha'') \rightarrow \\ 1,76 \times 10^{-5} &= 7,413 \times 10^{-5} (\alpha'' | 1 - \alpha'') \rightarrow \\ (\alpha'' | 1 - \alpha'') &= 0,23742075 \\ \alpha'' &= 0,23742075 (1 - \alpha'') \\ \alpha'' &= 0,23742075 - 0,23742075\alpha'' \\ 1,23742075\alpha'' &= 0,23742075 \\ \alpha'' &= 0,19186744 \dots \dots \dots (21) \end{aligned}$$

Eşitlik 6 'da (18), (19), (20) ve (21) yerlerine konularak α değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} \alpha &= (\alpha'' C_A - [\text{H}_3\text{O}^+]) / C_P \\ \alpha &= (0,19186744 \times 0,09162365 - 7,413 \times 10^{-5}) / 0,02985075 \\ \alpha &= 0,58643301 \dots \dots \dots (22) \end{aligned}$$

Eşitlik 7 'de (20) ve (22) yerlerine konularak KS 'nin K_a ve pK_a değerleri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} K_a &= [\text{H}_3\text{O}^+](1-\alpha)/\alpha \\ K_a &= 7,413 \times 10^{-5} (1-0,58643301)/ 0,58643301 = \sim 5,2 \cdot 10^{-5} \rightarrow \\ pK_a &= -\log K_a = \sim 4,28 \end{aligned}$$

İyonik kuvvetin etkisi doğrultusunda yapılan düzeltme:

K-Ac çözeltisinin iyonik kuvvetinin alabileceği en düşük değer (I_{\min}) 'i hesaplamakta kullanılmak üzere, iyonik kuvvetin sadece çözeltideki serbest Ac⁻ anyonlar tarafından belirlendiği varsayımı altında, Eşitlik 18 'den aşağıdaki bağıntı elde edilmiştir:

$$I_{\min} = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2 = \frac{1}{2} [(c_A \cdot \alpha'' \cdot (-1)^2] = c_A \cdot \alpha'' / 2 \dots \dots \dots (23)$$

Eşitlik 6 'da (18), (20) ve (22) yerlerine konularak, (23)'dan I_{\min} değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} \alpha &= (\alpha'' C_A - [\text{H}_3\text{O}^+]) / C_P \\ \alpha_{\min} &= \sim 0,59 \rightarrow 0,59 = (\alpha'' C_A - 7,413 \times 10^{-5}) / 0,02985075 \rightarrow \\ \alpha'' C_A &= 0,01768607 \rightarrow I_{\min} = 0,01768607 / 2 = 0,00884304 \dots \dots \dots (24) \end{aligned}$$

Eşitlik 14’de, Sıcaklığın Celcius cinsinden değeri ($t = 25,9 \text{ }^\circ\text{C}$) yerine konularak ε değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}\varepsilon &= 87,740 - 0.40008t + 9,398(10^{-4})t^2 - 1,410(10^{-6})t^3 \\ \varepsilon &= 87,740 - 0.40008(25,9) + 9,398(10^{-4})(25,9)^2 - 1,410(10^{-6})(25,9)^3 \\ \varepsilon &= 87,740 - 10,362072 + 0,63042724 - 0,02449731 = \sim 77,984 \dots \dots \dots (25)\end{aligned}$$

Eşitlik 13’de, (25) ve sıcaklığın Kelvin cinsinden değeri $T = 299,05 \text{ }^\circ\text{K}$ yerlerine konularak A sabitinin değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}A &= 1,824 \cdot 10^6 \times (\varepsilon T)^{-3/2} \\ A &= 1,824 \cdot 10^6 \times (77,984 \times 299,05)^{-3/2} = 0,51215572 \dots \dots \dots (26)\end{aligned}$$

Eşitlik 17’de, (24) ve (26) yerlerine konularak $f_{A(-1)}$ değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}\log f_{A(-1)} &= -A \cdot \sqrt{I_{min}} / 1 + \sqrt{I_{min}} \\ &= -0,51215572 \cdot \sqrt{0,00884304} / 1 + \sqrt{0,00884304} \\ &= -0,51215572 (0,09403742) / 1,09403742 \\ &= -0,04402208 \rightarrow f_{A(-1)} = 0,90360353 \dots \dots \dots (27)\end{aligned}$$

Eşitlik 16’da, $K_{A(TERM)}$ ve (27) değerleri yerlerine konularak $K_{A(KAR)}$ sabitinin değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}K_{A(KAR)} &= K_{A(TERM)} / f_{A(-1)} \rightarrow \\ K_{A(KAR)} &= 1,76 \cdot 10^{-5} / 0,90360353 = \sim 1,95 \cdot 10^{-5} \dots \dots \dots (28)\end{aligned}$$

Eşitlik 5’de, (20) ve (28) yerlerine konularak α'' değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}K_{A(KAR)} &= a_{H^+}(\alpha'' | 1 - \alpha'') \rightarrow \\ 1,95 \cdot 10^{-5} &= 7,413 \cdot 10^{-5} (\alpha'' | 1 - \alpha'') \rightarrow \\ (\alpha'' | 1 - \alpha'') &= 0,2630514 \\ \alpha'' &= 0,2630514 (1 - \alpha'') \\ \alpha'' &= 0,2630514 - 0,2630514 \alpha'' \\ 1,2630514 \alpha'' &= 0,2630514 \\ \alpha'' &= 0,20826658 \dots \dots \dots (29)\end{aligned}$$

Eşitlik 6’da, (18), (19), (20) ve (29) yerlerine konularak α_{min} değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}\alpha_{min} &= (\alpha'' C_A - [H_3O^+]) / C_P \\ \alpha_{min} &= (0,20826658 \times 0,09156363 - 7,413 \times 10^{-5}) / 0,02985075 \\ \alpha_{min} &= 0,63634964 \dots \dots \dots (30)\end{aligned}$$

Eşitlik 7’de, (20) ve (30) yerlerine konularak KS ‘nin K_a ve pK_a değerleri hesaplanmıştır:

$$K_a = [H_3O^+](1-\alpha_{\min})/\alpha_{\min}$$

$$K_a = 7,413 \times 10^{-5} (1-0,63634964)/0,63634964 = \sim 4,2 \cdot 10^{-5} \rightarrow$$

$$pKa = -\log Ka = \sim 4,37$$

K-Ac çözeltisinin iyonik kuvvetinin alabileceği en yüksek değer (I_{maks}) 'i hesaplamakta kullanılmak üzere, kitosana verilen protonların da Ac^- anyonlarıyla birlikte serbest iyon olarak davrandıkları varsayımı altında, Eşitlik 15 'den aşağıdaki bağıntı elde edilmiştir:

$$I_{maks} = \frac{1}{2} \sum ci \cdot zi^2 = \frac{1}{2} [(c_A \cdot \alpha'' \cdot (-1)^2 + c_A \cdot \alpha'' \cdot (-1)^2] = c_A \cdot \alpha'' \dots\dots\dots(31)$$

Eşitlik 6 'da (18) ve (20) yerlerine konularak, (31)'den I_{maks} değeri hesaplanmıştır:

$$\alpha = (\alpha'' C_A - [H_3O^+]) / C_P$$

Kullanılan kitosanın DD'si 0,85 olduğundan;

$$\alpha_{maks} = 0,85 \rightarrow 0,85 = (\alpha'' C_A - 7,413 \times 10^{-5}) / 0,02985075 \rightarrow$$

$$\alpha'' C_A = I_{maks} = 0,02544727 \dots\dots\dots(32)$$

Eşitlik 17'de, (26) ve (32) yerine konularak $f_{A(-1)}$ değeri hesaplanmıştır:

$$\log f_{A(-1)} = -A \cdot \frac{\sqrt{I_{maks}}}{1 + \sqrt{I_{maks}}}$$

$$= -0,51215572 \cdot \frac{\sqrt{0,02544727}}{1 + \sqrt{0,02544727}}$$

$$= -0,0817001 / 1,159522 = -0,07046016 \rightarrow f_{A(-1)} = 0,85023669 \dots\dots\dots(33)$$

Eşitlik 16'da, $K_{A(TERM)}$ ve (33) değerleri yerlerine konularak $K_{A(KAR)}$ sabitinin değeri hesaplanmıştır:

$$K_{A(KAR)} = K_{A(TERM)} / f_{A(-1)} \rightarrow$$

$$K_{A(KAR)} = 1,76 \cdot 10^{-5} / 0,85023669 = \sim 2,07 \cdot 10^{-5} \dots\dots\dots(34)$$

Eşitlik 5'de, (20) ve (34) yerlerine konularak α'' değeri hesaplanmıştır:

$$K_{A(KAR)} = a_{H^+}(\alpha'' | 1 - \alpha'') \rightarrow$$

$$2,07 \cdot 10^{-5} = 7,413 \cdot 10^{-5} (\alpha'' | 1 - \alpha'') \rightarrow$$

$$(\alpha'' | 1 - \alpha'') = 0,27923917$$

$$\alpha'' = 0,27923917 (1 - \alpha'')$$

$$\alpha'' = 0,27923917 - 0,27923917 \alpha''$$

$$1,27923917 \alpha'' = 0,27923917$$

$$\alpha'' = 0,21828535 \dots\dots\dots(35)$$

Eşitlik 6 'da, (18), (19), (20) ve (35) yerlerine konularak α_{maks} değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} \alpha_{maks} &= (\alpha' C_A - [H_3O^+]) / C_P \\ \alpha_{maks} &= (0,21828535 \times 0,09156363 - 7,413 \times 10^{-5}) / 0,02985075 \\ \alpha_{maks} &= 0,66708103 \dots \dots \dots (36) \end{aligned}$$

Eşitlik 7’de, (20) ve (36) yerlerine konularak KS ‘nin K_a ve pK_a değerleri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} K_a &= [H_3O^+](1 - \alpha_{maks}) / \alpha_{maks} \\ K_a &= 7,413 \times 10^{-5} (1 - 0,66708103) / 0,66708103 = \sim 3,7 \cdot 10^{-5} \rightarrow \\ pK_a &= -\log K_a = \sim 4,43 \end{aligned}$$

K-Ci

Başlangıçta kullanılan H_3Ci ‘nin C_A değeri aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} m_{H_3Ci} &= 254,9 \text{ mg} \\ n &= m/m_a = 0,2549 / 192,12 = 0,00132677 \text{ mol} \\ C_A &= n/V = 0,00132677 / 0,05 = 0,0265355 \text{ M} \dots \dots \dots (37) \end{aligned}$$

Çözeltideki serbest $[H_3O^+]$ miktarı aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

Çözeltinin $pH_1 = 3,7$ ($25^\circ C$) olarak ölçülmüştür.

$$-\log [H_3O^+] = 3,7 \rightarrow \log [H_3O^+] = -3,7 \rightarrow [H_3O^+] = 10^{-3,7} = 0,00019953 \text{ M} \dots \dots \dots (38)$$

İdeal çözelti ($I = 0$) varsayımı altında; Eşitlik 18, Eşitlik 19, Eşitlik 20 ve $K_{A(TERM)}$ değerleri kullanılarak, sitrik asit ve sitrat iyonlarının dengedeki oranları arasındaki bağıntılar kurulmuştur:

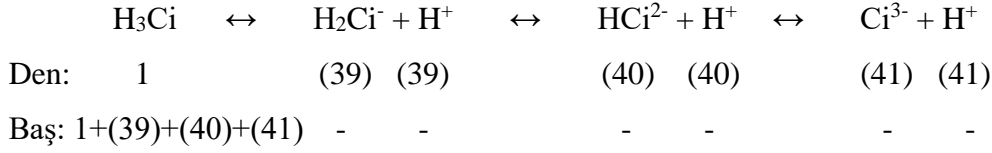
$$\begin{aligned} K_{A(TERM,1)} &= [H_2Ci^-] [H_3O^+] / [H_3Ci] \rightarrow \\ [H_2Ci^-] / [H_3Ci] &= K_{A(TERM,1)} / [H_3O^+] \\ [H_2Ci^-] / [H_3Ci] &= 7,4131 \cdot 10^{-4} / 1,9953 \cdot 10^{-4} = \sim 3,71528091 \dots \dots \dots (39) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} pK_{A(TERM,12)} &= 3,13 + 4,76 = 7,89 \\ pK_{A(TERM,12)} &= -\log K_{A(TERM,12)} = 7,89 \\ \log K_{A(TERM,12)} &= -7,89 \\ K_{A(TERM,12)} &= 10^{-7,89} = \sim 1,29 \cdot 10^{-8} \\ K_{A(TERM,12)} &= [HCi^{2-}] [H_3O^+]^2 / [H_3Ci] \rightarrow \\ [HCi^{2-}] / [H_3Ci] &= K_{A(TERM,12)} / [H_3O^+]^2 \\ [HCi^{2-}] / [H_3Ci] &= 1,29 \cdot 10^{-8} / (1,9953 \cdot 10^{-4})^2 \\ [HCi^{2-}] / [H_3Ci] &= 1,29 \cdot 10^{-8} / 3,98 \cdot 10^{-8} = \sim 0,32402111 \dots \dots \dots (40) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} pK_{A(TERM,123)} &= 3,13 + 4,76 + 6,4 = 14,29 \\ pK_{A(TERM,123)} &= -\log K_{A(TERM,123)} = 14,29 \\ \log K_{A(TERM,123)} &= -14,29 \\ K_{A(TERM,123)} &= 10^{-14,29} = \sim 5,12861 \cdot 10^{-15} \\ K_{A(TERM,123)} &= [Ci^{3-}] [H_3O^+]^3 / [H_3Ci] \rightarrow \\ [Ci^{3-}] / [H_3Ci] &= K_{A(TERM,123)} / [H_3O^+]^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
[\text{Ci}^{3-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= 5,12861 \cdot 10^{-15} / (1,9953 \cdot 10^{-4})^3 \\
[\text{Ci}^{3-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= 5,12861 \cdot 10^{-15} / 7943,73244 \cdot 10^{-15} \\
[\text{Ci}^{3-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= \sim 0,000645562 \dots \dots \dots (41)
\end{aligned}$$

Sitrik asitin ayrışması sonucu çözeltiliye verilen $[\text{H}_3\text{O}^+]$ miktarı (37), (39), (40) ve (41)'den aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:



$$\begin{aligned}
(39)+(40)+(41) &= \sim 3,71528091 + 0,32402111 + 0,000645562 = 4,03994758 \text{ M} \\
1+(39)+(40)+(41) &= 5,03994758 \text{ M}
\end{aligned}$$

5,03994758 M H_3Ci 4,03994758 M H_3O^+ verirse
0,0265355 M H_3Ci x M H_3O^+ verir

$$x = 0,02127047 \text{ M } [\text{H}_3\text{O}^+] \text{ verir} \dots \dots \dots (42)$$

KS'nin aldığı $[\text{H}^+]$ miktarı (38) ve (42) kullanılarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:
0,02127047 - 0,00019953 = 0,02107094 M H^+ kitosana verilir.....(43)

α değeri (18) ve (43) kullanılarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:
 $\alpha = 0,02107094 / 0,02985075 = 0,7058764 \dots \dots \dots (44)$

Eşitlik 7'de, (38) ve (44) yerlerine konularak KS'nin K_a ve pK_a değerleri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}
K_a &= [\text{H}_3\text{O}^+](1 - \alpha) / \alpha \\
K_a &= 0,00019953(1 - 0,7058764) / 0,7058764 = \sim 8,3 \cdot 10^{-5} \rightarrow \\
pK_a &= -\log K_a = \sim 4,08
\end{aligned}$$

Çözeltideki sitrat iyonlarının miktarı (37), (39), (40) ve (41) kullanılarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

5,03994764 M H_3Ci 3,71528091 M H_2Ci^- verirse
0,0265355 M H_3Ci x

$$x = 0,01956108 \text{ M } \text{H}_2\text{Ci}^- \dots \dots \dots (45)$$

$$\begin{array}{ll} 5,03994764 \text{ M H}_3\text{Ci} & 0,32402111 \text{ M HCl}^{2-} \text{ verirse} \\ 0,0265355 \text{ M H}_3\text{Ci} & y \end{array}$$

$$y = 0,00170598 \text{ M HCl}^{2-} \dots\dots\dots(46)$$

$$\begin{array}{ll} 5,03994764 \text{ M H}_3\text{Ci} & 0,000645562 \text{ M Cl}^{3-} \\ 0,0265355 \text{ M H}_3\text{Ci} & z \end{array}$$

$$z = 0,0000034 \text{ M Cl}^{3-} \dots\dots\dots(47)$$

İyonik kuvvetin etkisi doğrultusunda yapılan düzeltme:

İyonik kuvvetin sadece çözeltideki serbest sitrat anyonları tarafından belirlendiği varsayımı altında, Eşitlik 15 'te (45), (46) ve (47) yerlerine konularak, K-Ci çözeltisinin iyonik kuvvetinin alabileceği en düşük değer (I_{\min}) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} I_{\min} &= \frac{1}{2} \sum ci \cdot zi^2 = \frac{1}{2} [(0,01956108 \times 1) + (0,00170598 \times 4) + (0,0000034 \times 9)] \\ &= \frac{1}{2} [(0,01956108) + (0,00682392) + (0,00003059)] \\ &= 0,0132078 \dots\dots\dots(48) \end{aligned}$$

Eşitlik 14'te sıcaklığın Celcius cinsinden değeri $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ yerine konularak ϵ değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} \epsilon &= 87,740 - 0,40008t + 9,398(10^{-4})t^2 - 1,410(10^{-6})t^3 \\ \epsilon &= 87,740 - 0,40008(25) + 9,398(10^{-4})(25)^2 - 1,410(10^{-6})(25)^3 \\ &= 87,740 - 10,002 + 0,587375 - 0,02203125 = \sim 78,303 \dots\dots\dots(49) \end{aligned}$$

Eşitlik 13'te, (49) ve sıcaklığın Kelvin cinsinden değeri $T = 298,15 \text{ }^\circ\text{K}$, yerlerine konularak A sabitinin değeri hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} A &= 1,824 \cdot 10^6 \times (\epsilon T)^{-3/2} \\ &= 1,824 \cdot 10^6 \times (78,303 \times 298,15)^{-3/2} = 0,51133103 \dots\dots\dots(50) \end{aligned}$$

Eşitlik 19'da, (48) ve (50) yerlerine konularak Sitrik asitin n. ayrışması için $pK_{A(KAR),n}$ değerleri hesaplanmıştır:

$$pK_{A(KAR),n} = pK_{A(TERM),n} - A \cdot \sqrt{I} (2n-1) / (1 + \sqrt{I})$$

$$\begin{aligned} pK_{A(KAR),1} &= pK_{A(TERM),1} - 0,51133103 \cdot \sqrt{0,0132078} / (1 + \sqrt{0,0132078}) \\ &= 3,13 - 0,05690532 / 1,11492519 = \sim 3,08 \rightarrow \\ -\log K_{A(KAR),1} &= 3,08 \rightarrow \log K_{A(KAR),1} = -3,08 \rightarrow K_{A(KAR),1} = 8,3376 \times 10^{-4} \dots\dots\dots(51) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} pK_{A(KAR),2} &= pK_{A(TERM),2} - A \cdot \sqrt{I} (2(2)-1) / (1 + \sqrt{I}) \\ &= 4,76 - 0,51133103 \sqrt{0,0132078} (3) / 1 + \sqrt{0,0132078} \end{aligned}$$

$$= 4,76 - (0,51133103) (0,11492519) (3) / 1,11492519 = \sim 4,6$$

$$\begin{aligned} pK_{A(KAR),12} &= pK_{A(KAR),1} + pK_{A(KAR),2} = 3,08 + 4,6 = 7,68 \rightarrow \\ -\log K_{A(KAR),12} &= 7,68 \rightarrow \log K_{A(KAR),12} = -7,68 \rightarrow K_{A(KAR),12} = \sim 2,0803 \times 10^{-8} \dots\dots\dots(52) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} pK_{A(KAR),3} &= pK_{A(TERM),3} - A \cdot \sqrt{I} (2(3)-1) / (1 + \sqrt{I}) \\ &= 6,4 - 0,51133103 \sqrt{0,0132078} (5) / 1 + \sqrt{0,0132078} \\ &= 6,4 - (0,51133103) (0,11492519) (5) / 1,11492519 = \sim 6,14 \\ pK_{A(KAR),123} &= pK_{A(KAR),1} + pK_{A(KAR),2} + pK_{A(KAR),3} = 3,08 + 4,6 + 6,14 = 13,82 \\ -\log K_{A(KAR),123} &= 13,82 \rightarrow \log K_{A(KAR),123} = -13,82 \rightarrow K_{A(KAR),123} = \sim 1,5136 \times 10^{-14} \dots\dots\dots(53) \end{aligned}$$

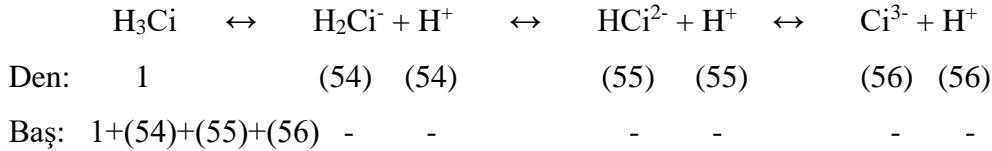
Eşitlik 20, Eşitlik 21 ve Eşitlik 22'de; (38), (51), (52) ve (53) yerlerine konularak sitrik asit ve sitrat iyonlarının dengedeki oranları hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} K_{A(KAR),1} &= [H_2Ci^-] a_{H^+} / [H_3Ci] \rightarrow \\ [H_2Ci^-] / [H_3Ci] &= K_{A(KAR),1} / a_{H^+} \\ [H_2Ci^-] / [H_3Ci] &= 8,3376 \times 10^{-4} / 1,9953 \cdot 10^{-4} = \sim 4,17861976 \dots\dots\dots(54) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} K_{A(KAR),12} &= [HCi^{2-}] a_{H^+}^2 / [H_3Ci] \rightarrow \\ [HCi^{2-}] / [H_3Ci] &= K_{A(KAR),12} / a_{H^+}^2 \\ [HCi^{2-}] / [H_3Ci] &= 2,0803 \times 10^{-8} / (1,9953 \cdot 10^{-4})^2 \\ [HCi^{2-}] / [H_3Ci] &= 2,0803 \cdot 10^{-8} / 3,9812 \cdot 10^{-8} = \sim 0,5225309 \dots\dots\dots(55) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} K_{A(KAR),123} &= [Ci^{3-}] a_{H^+}^3 / [H_3Ci] \rightarrow \\ [Ci^{3-}] / [H_3Ci] &= K_{A(KAR),123} / a_{H^+}^3 \\ [Ci^{3-}] / [H_3Ci] &= 1,5136 \times 10^{-14} / (1,9953 \cdot 10^{-4})^3 \\ [Ci^{3-}] / [H_3Ci] &= 1,5136 \times 10^{-14} / 794,3732 \cdot 10^{-14} \\ [Ci^{3-}] / [H_3Ci] &= \sim 0,0019054 \dots\dots\dots(56) \end{aligned}$$

Sitrik asitin ayrışması sonucu çözeltiliye verilen $[H_3O^+]$ miktarı (37), (54), (55) ve (56)'dan aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:



$$\begin{aligned} (54)+(55)+(56) &= 4,17861976 + 0,5225309 + 0,0019054 = 4,70305606 \\ 1+(54)+(55)+(56) &= 5,70305606 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 5,70305606 \text{ M } H_3Ci & & 4,70305606 \text{ M } H^+ \text{ verirse} \\ 0,0265355 \text{ M } H_3Ci & & x \end{aligned}$$

$$x = 0,02188264 \text{ M} \dots\dots\dots(57)$$

KS'nin aldığı $[H^+]$ miktarı (31) ve (50)'den aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$0,02188264 - 0,00019953 = 0,02168734 \text{ M H}^+ \text{ KS'ye verilmiştir.....(58)}$$

α_{min} değeri (11) ve (51) kullanılarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\alpha_{min} = 0,02168734 / 0,02985075 = 0,7265258.....(59)$$

KS'ye verilen protonların da sitrat anyonlarıyla birlikte serbest iyon olarak davrandıkları varsayımı altında, Eşitlik 15'te (42), (45), (46) ve (47) yerlerine konularak, K-Ci çözeltisinin iyonik kuvvetinin yaklaşık olarak alabileceği en yüksek değer (I_{maks^-}) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned} I_{maks^-} &= \frac{1}{2} \sum ci. zi^2 = \frac{1}{2} [(0,01956108 \times 1) + (0,00170598 \times 4) + (0,0000034 \times 9) + \\ &\quad (0,02127047 \times 1)] \\ &= \frac{1}{2} [(0,01956108) + (0,00682392) + (0,00003059) + \\ &\quad (0,02127047)] \\ &= 0,02384304.....(60) \end{aligned}$$

Eşitlik 19'da, (50) ve (60) yerlerine konularak Sitrik asitin n. ayrışması için $pK_{A(KAR),n}$ değerleri hesaplanmıştır:

$$pK_{A(KAR),n} = pK_{A(TERM),n} - A \cdot \sqrt{I_{maks^-}} (2n-1) / (1 + \sqrt{I})$$

$$\begin{aligned} pK_{A(KAR),1} &= pK_{A(TERM),1} - 0,51133103 \cdot \sqrt{0,02384304} / (1 + \sqrt{0,02384304}) \\ &= 3,13 - 0,0789556 / 1,15441192 = \sim 3,06 \rightarrow \end{aligned}$$

$$-\log K_{A(KAR),1} = 3,06 \rightarrow \log K_{A(KAR),1} = -3,06 \rightarrow K_{A(KAR),1} = 8,6775 \times 10^{-4}.....(61)$$

$$\begin{aligned} pK_{A(KAR),2} &= pK_{A(TERM),2} - A \cdot \sqrt{I_{maks^-}} (2(2)-1) / (1 + \sqrt{I_{maks^-}}) \\ &= 4,76 - 0,51133103 \sqrt{0,02384304} (3) / 1 + \sqrt{0,02384304} \\ &= 4,76 - 0,23686681 / 1,15441192 = \sim 4,55 \end{aligned}$$

$$pK_{A(KAR),12} = pK_{A(KAR),1} + pK_{A(KAR),2} = 3,06 + 4,55 = 7,61 \rightarrow$$

$$-\log K_{A(KAR),12} = 7,61 \rightarrow \log K_{A(KAR),12} = -7,61 \rightarrow K_{A(KAR),12} = \sim 2,428 \times 10^{-8}.....(62)$$

$$\begin{aligned} pK_{A(KAR),3} &= pK_{A(TERM),3} - A \cdot \sqrt{I_{maks^-}} (2(3)-1) / (1 + \sqrt{I_{maks^-}}) \\ &= 6,4 - 0,51133103 \sqrt{0,02384304} (5) / 1 + \sqrt{0,02384304} \\ &= 6,4 - 0,39477802 / 1,15441192 = \sim 6,06 \end{aligned}$$

$$pK_{A(KAR),123} = pK_{A(KAR),1} + pK_{A(KAR),2} + pK_{A(KAR),3} = 3,06 + 4,55 + 6,06 = 13,67$$

$$-\log K_{A(KAR),123} = 13,67 \rightarrow \log K_{A(KAR),123} = -13,67 \rightarrow K_{A(KAR),123} = \sim 2,138 \times 10^{-14}.....(63)$$

Eşitlik 20, Eşitlik 21 ve Eşitlik 22'de; (38), (61), (62) ve (63) yerlerine konularak sitrik asit ve sitrat iyonlarının dengedeki oranları hesaplanmıştır:

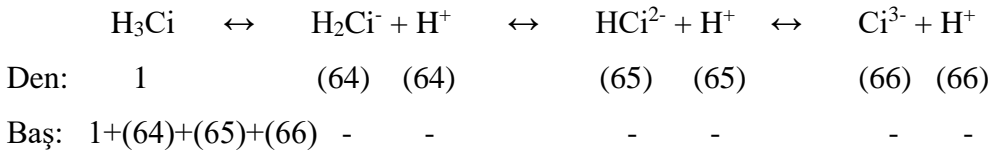
$$\begin{aligned} K_{A(KAR),1} &= [H_2Ci^-] a_{H^+} / [H_3Ci] \rightarrow \\ [H_2Ci^-] / [H_3Ci] &= K_{A(KAR),1} / a_{H^+} \end{aligned}$$

$$[\text{H}_2\text{Ci}^-] / [\text{H}_3\text{Ci}] = 8,6775 \times 10^{-4} / 1,9953 \cdot 10^{-4} = \sim 4,34897008 \dots (64)$$

$$\begin{aligned} K_{A(\text{KAR}),12} &= [\text{HCi}^{2-}] a_{\text{H}^+}^2 / [\text{H}_3\text{Ci}] \rightarrow \\ [\text{HCi}^{2-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= K_{A(\text{KAR}),12} / a_{\text{H}^+}^2 \\ [\text{HCi}^{2-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= 2,428 \times 10^{-8} / (1,9953 \cdot 10^{-4})^2 \\ [\text{HCi}^{2-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= 2,428 \times 10^{-8} / 3,9812 \cdot 10^{-8} = \sim 0,60986637 \dots (65) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} K_{A(\text{KAR}),123} &= [\text{Ci}^{3-}] a_{\text{H}^+}^3 / [\text{H}_3\text{Ci}] \rightarrow \\ [\text{Ci}^{3-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= K_{A(\text{KAR}),123} / a_{\text{H}^+}^3 \\ [\text{Ci}^{3-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= 2,138 \times 10^{-14} / (1,9953 \cdot 10^{-4})^3 \\ [\text{Ci}^{3-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= 2,138 \times 10^{-14} / 794,3732 \cdot 10^{-14} \\ [\text{Ci}^{3-}] / [\text{H}_3\text{Ci}] &= \sim 0,00269143 \dots (66) \end{aligned}$$

Sitrik asitin ayrışması sonucu çözültüye verilen $[\text{H}_3\text{O}^+]$ miktarı (37), (64), (65) ve (66)'dan aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:



$$\begin{aligned} (64)+(65)+(66) &= 4,34897008 + 0,60986637 + 0,00269143 = 4,96152788 \\ 1+(64)+(65)+(66) &= 5,96152788 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 5,96152788 \text{ M H}_3\text{Ci} & \quad 4,96152788 \text{ M H}^+ \text{ verirse} \\ 0,0265355 \text{ M H}_3\text{Ci} & \quad x \end{aligned}$$

$$x = 0,02208438 \text{ M} \dots (67)$$

KS'nin aldığı $[\text{H}^+]$ miktarı (38) ve (67)'dan aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$0,02208438 - 0,00019953 = 0,02188485 \text{ M H}^+ \text{ KS'ye verilmiştir} \dots (68)$$

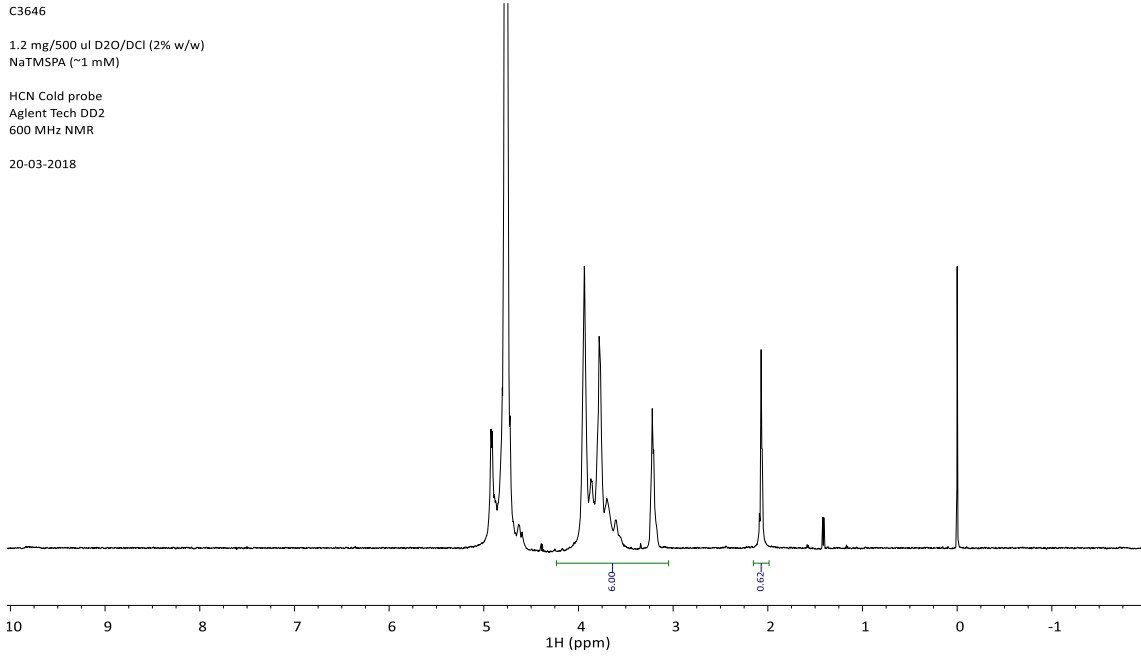
α_{maks} değeri (18) ve (68) kullanılarak aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\alpha_{\text{maks}} = 0,02188485 / 0,02985075 = 0,733142383 \dots (69)$$

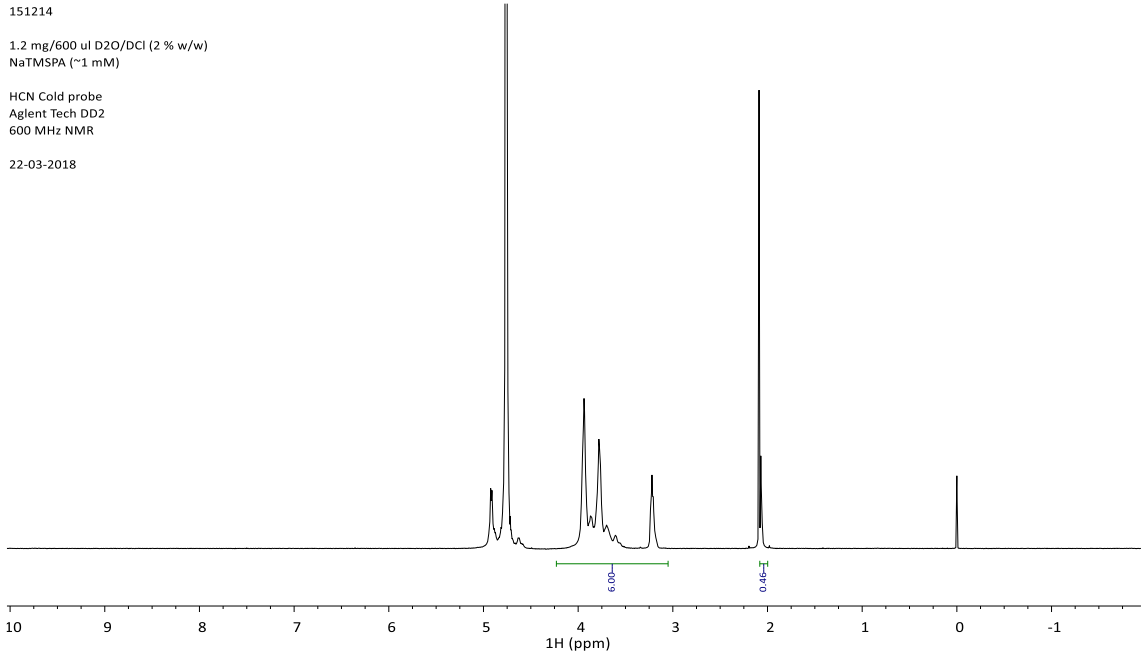
D. TMKb'nin Asetilasyon ve Trimetilasyon Derecelerinin Hesaplanması

Eşitlik 23'te, $[\text{CH}_3]$ ve $[\text{H}]$ değerleri (Ek 2C) yerlerine konularak TMKb'nin % Asetilasyon derecesi hesaplanabilir. Eşitlik 3'te, % Asetilasyon derecesinin söz konusu değeri yerine konularak %DD değerleri belirlenmiştir:

$$\begin{aligned} \% \text{ Asetilasyon}_{(\text{TMK})} &= \left(\frac{[\text{CH}_3]}{[\text{H}]} \times \frac{1}{3} \right) \times 100 = \left(\frac{0,47}{3} \right) \times 100 = \sim 16 \Rightarrow \% \text{ DD}_{(\text{TMK})} = 100 - 16 = \\ &84 \dots (70) \end{aligned}$$

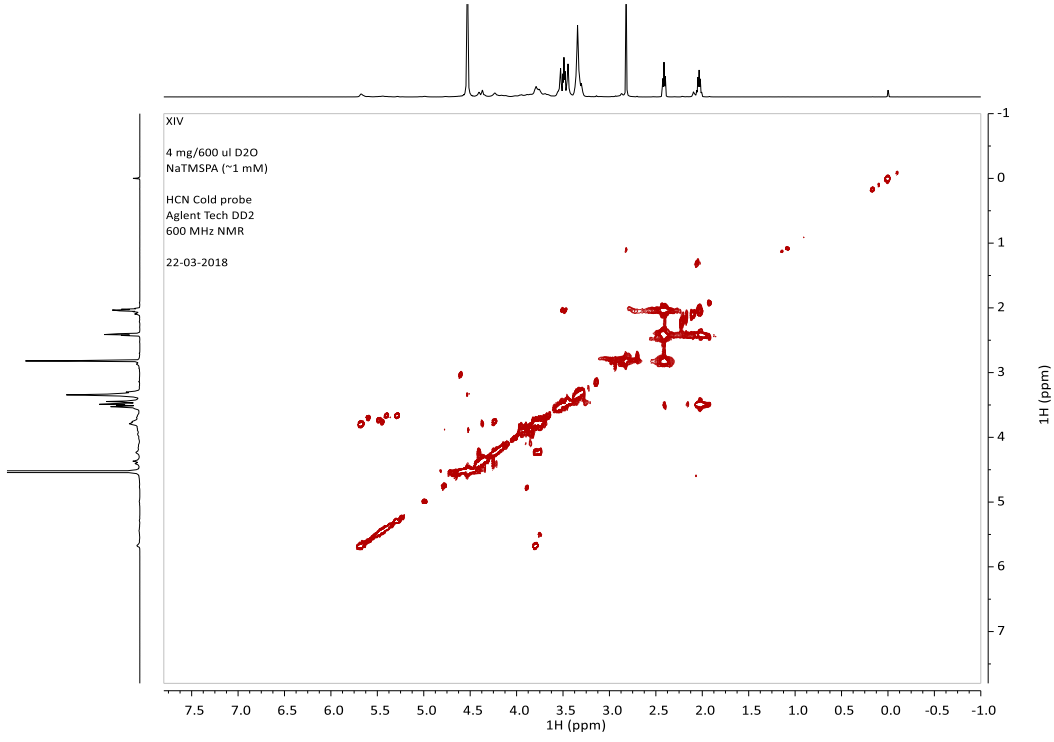


Şekil 1. KH'nin D₂O / DCI (%2 w/w) ve 47 ° C'deki 1H NMR spektrumu.

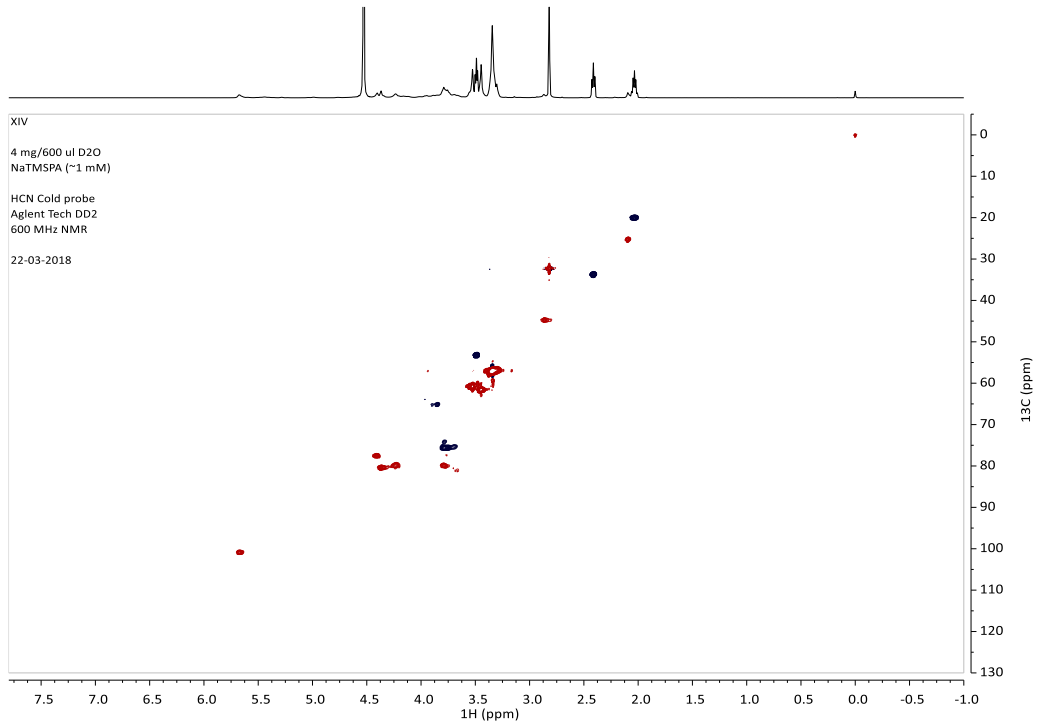


Şekil 2. KS'nin D₂O / DCI (%2 w/w) ve 47 ° C'deki 1H NMR spektrumu.

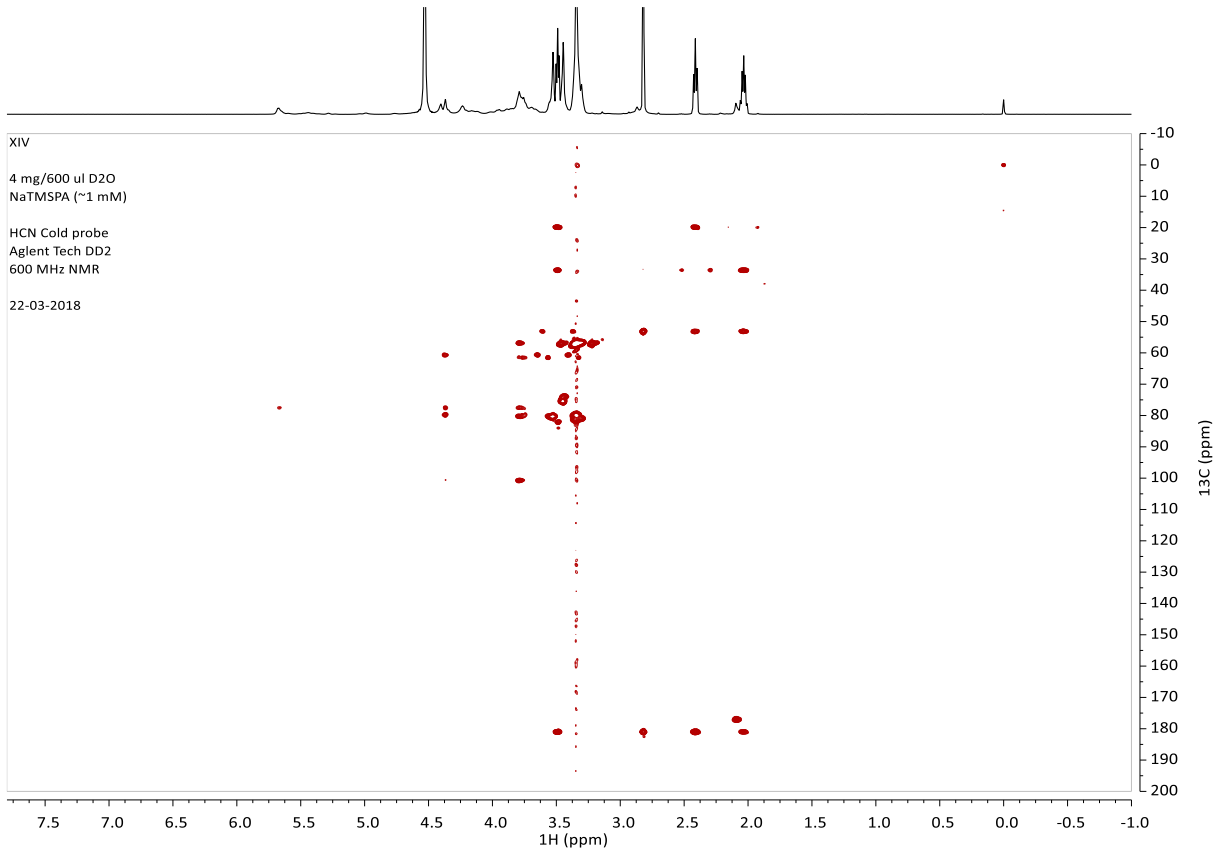
B. TMK'nın 2D COSY, 1H-13C HSQC ve 1H-13C HMBC Spektrumları



Şekil 3. TMK'nın D2O ve 47° C'deki COSY NMR spektrumu.

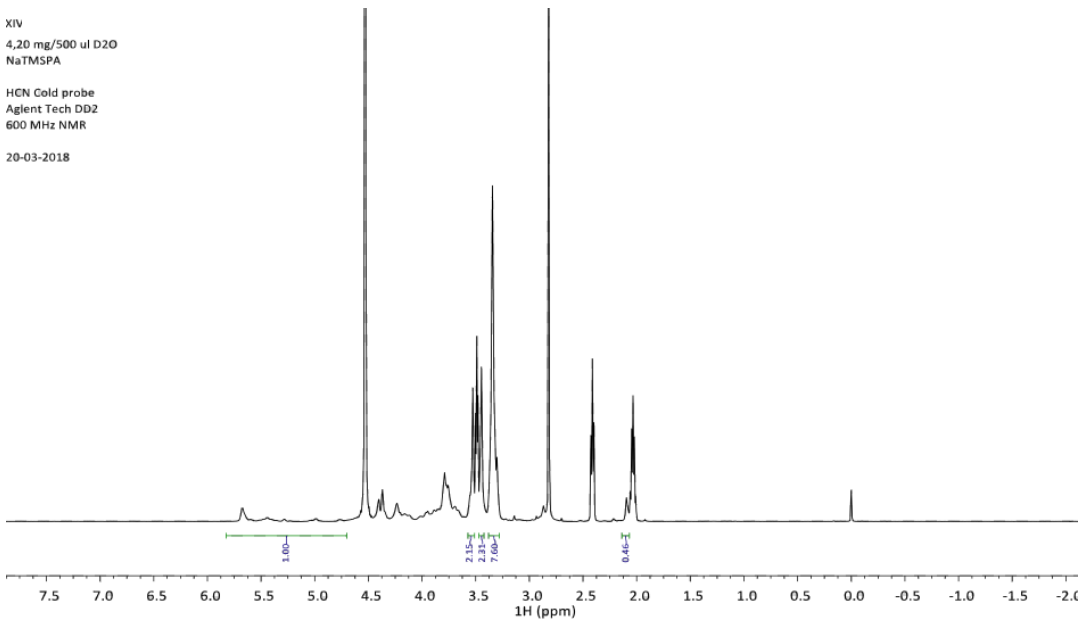


Şekil 4. TMK'nın D2O ve 47° C'deki ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektrumu.

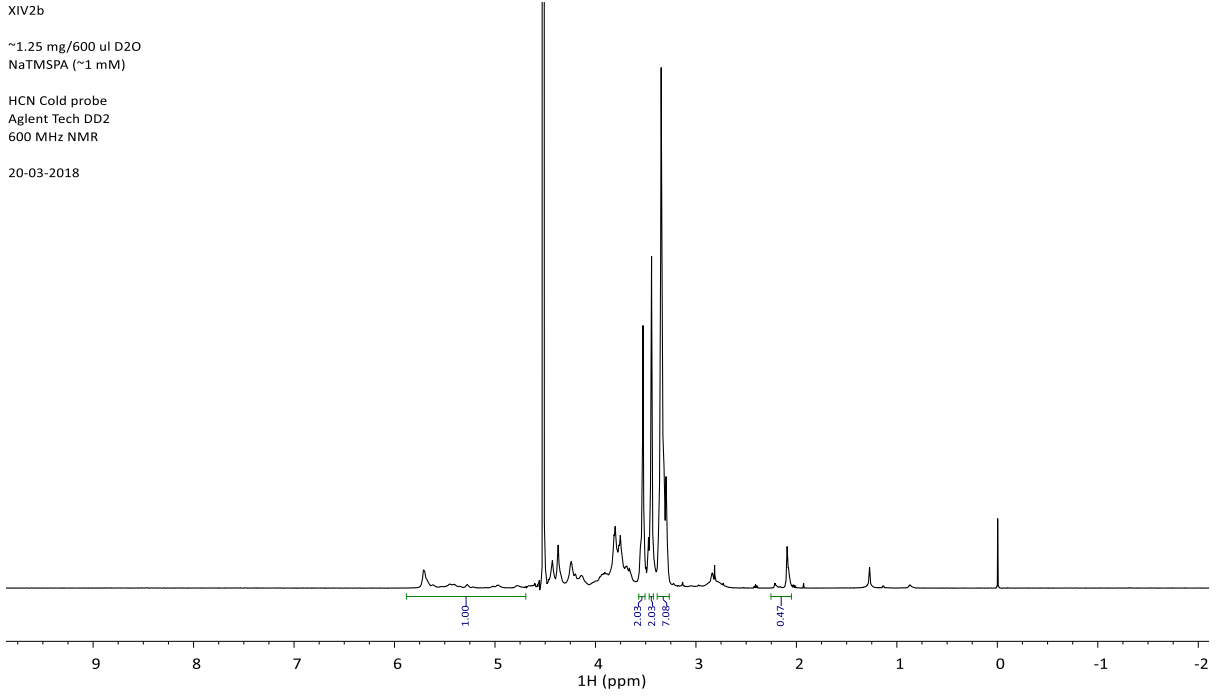


Şekil 5. TMK'nın D2O ve 47° C'deki ^1H - ^{13}C HMBC NMR spektrumu.

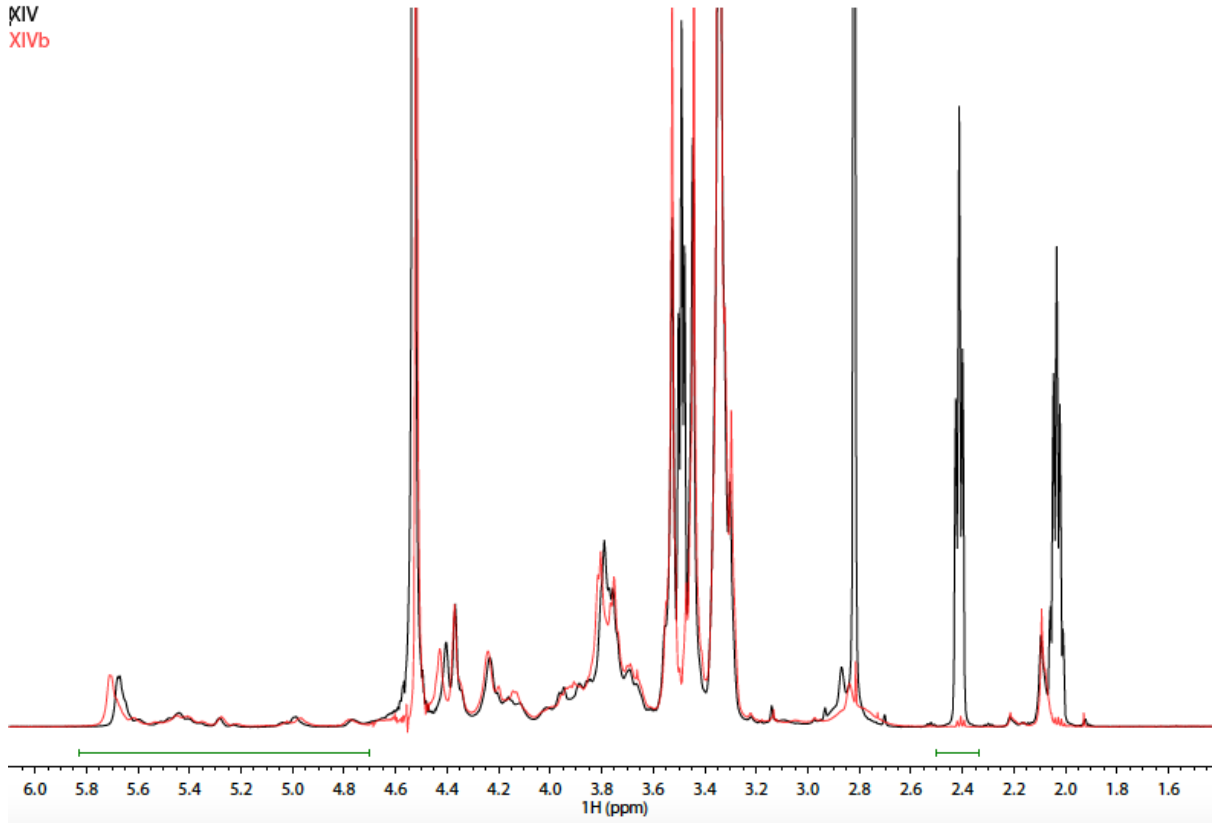
C. TMK ve TMKb Numunelerinin ^1H NMR Spektrumları



Şekil 6. TMK'nın D₂O ve 47 ° C'deki ^1H NMR spektrumu.

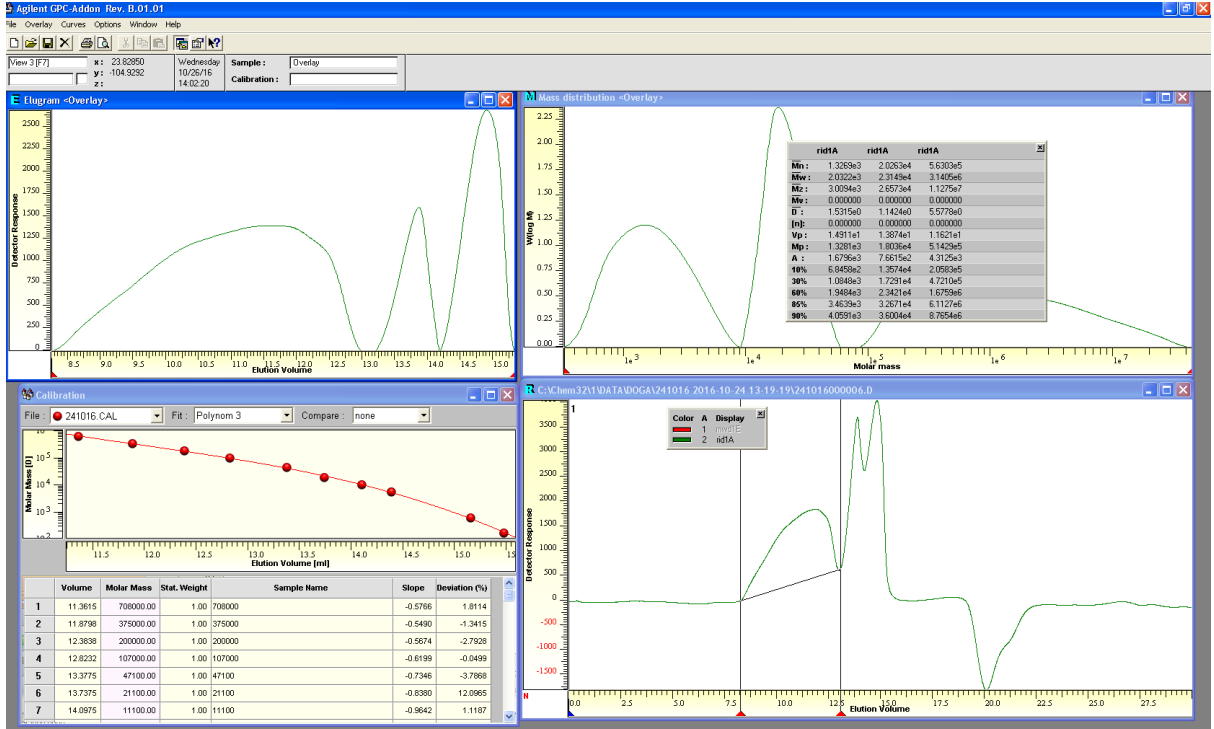


Şekil 7. TMKb'nin D₂O ve 47 ° C'deki 1H NMR spektrumu.

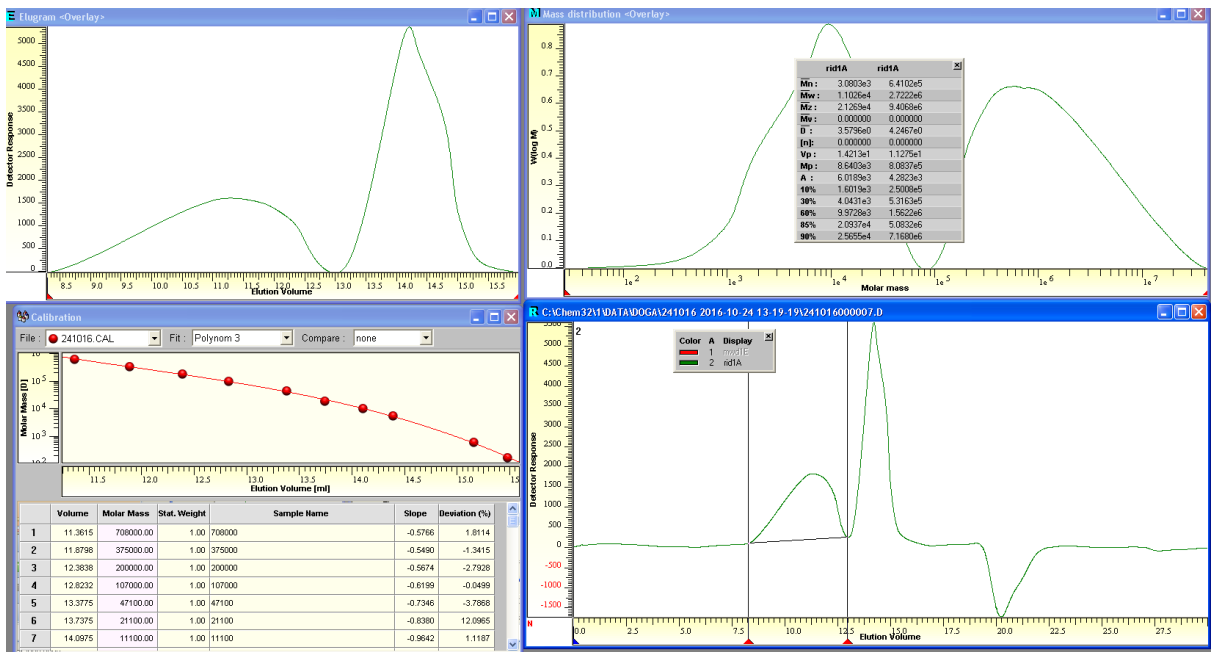


Şekil 8. TMK ve TMKb'nin D₂O ve 47 ° C'deki 1H NMR spektrumları. Spektrumlar anomeric protonların integraline normalize edilmiştir.

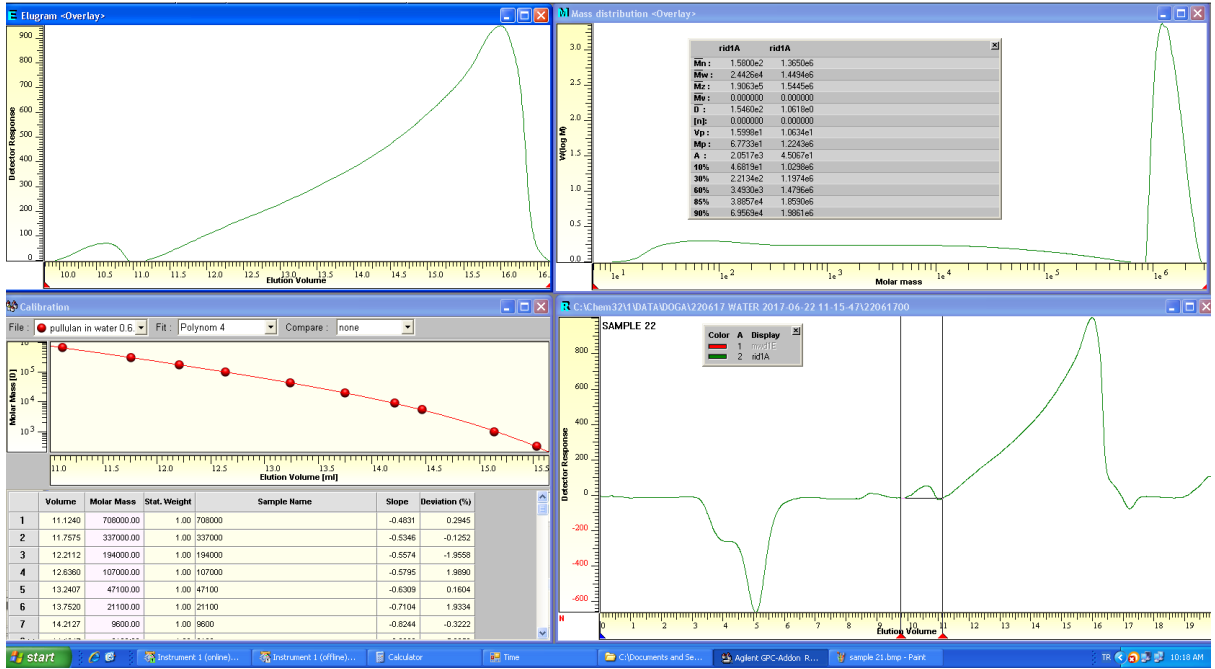
Ek 3. Molekül Ağırlıkları



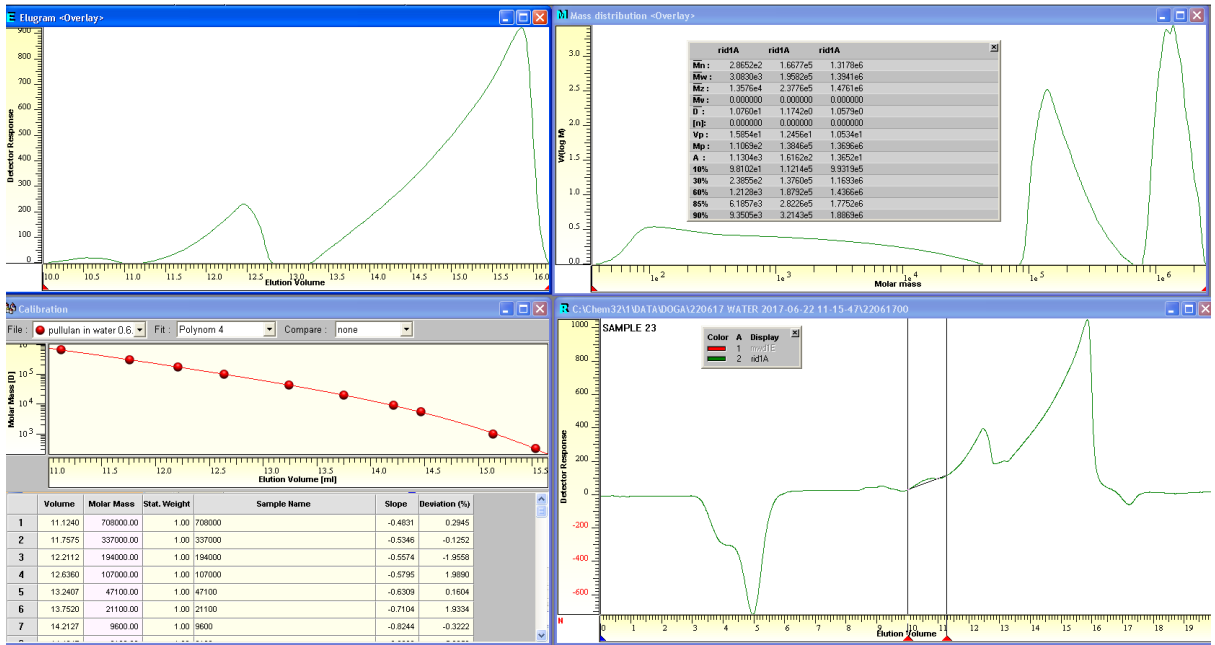
Şekil 1. KH'nin BDK analizinin sonucu.



Şekil 2. KS'nin BDK analizinin sonucu.

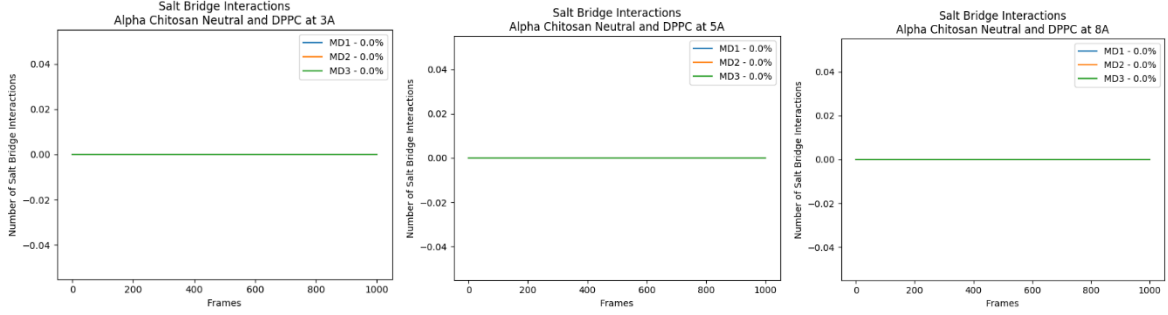


Şekil 3. TMKa'nın BDK analizinin sonucu.

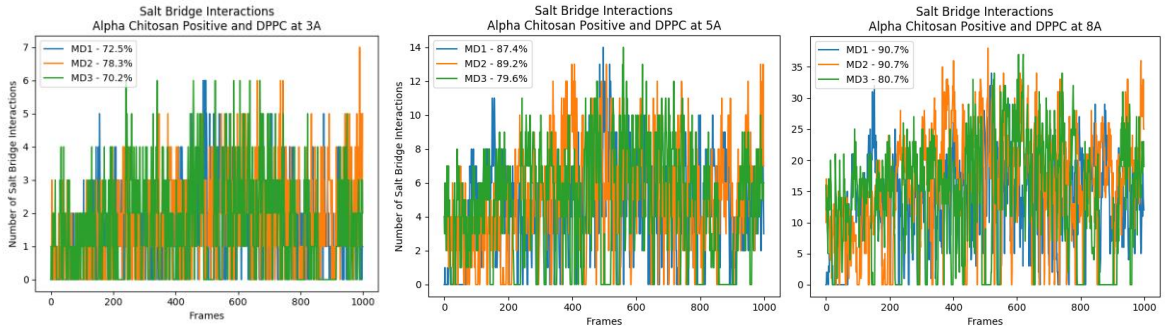


Şekil 4. TMKb'nin BDK analizinin sonucu.

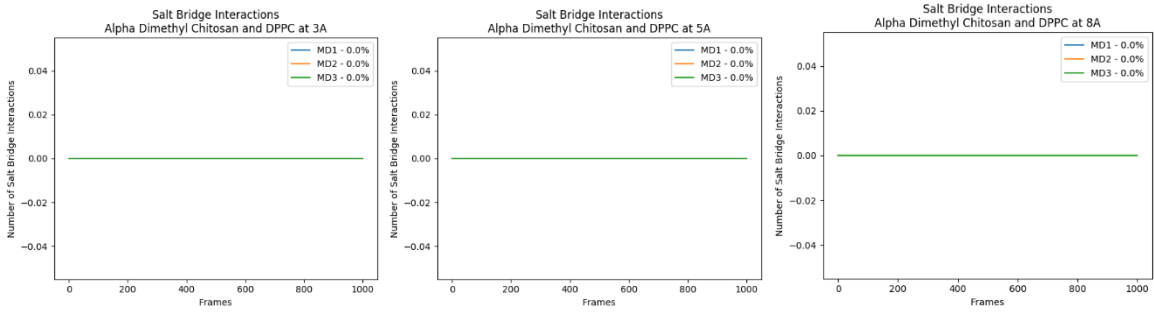
Ek 4. Bileşikler ve DPPC Arasındaki İyonik/Elektrostatik Etkileşimlerin Grafiksels Olarak Gösterimi



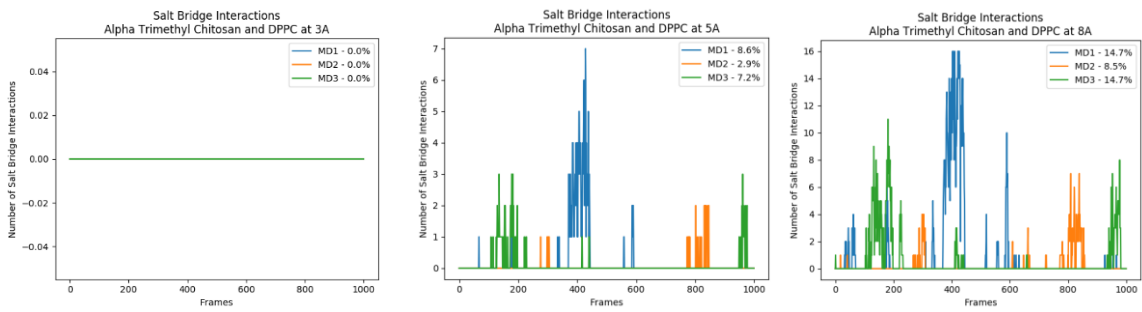
Şekil 1. Nötr alfa kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.



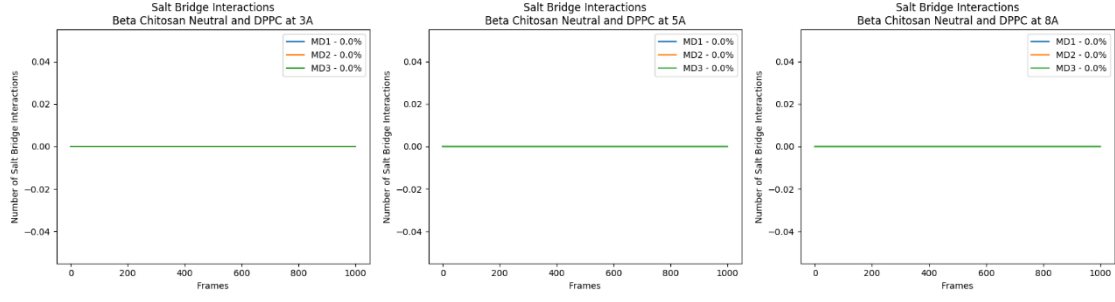
Şekil 2. Pozitif yüklü alfa kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.



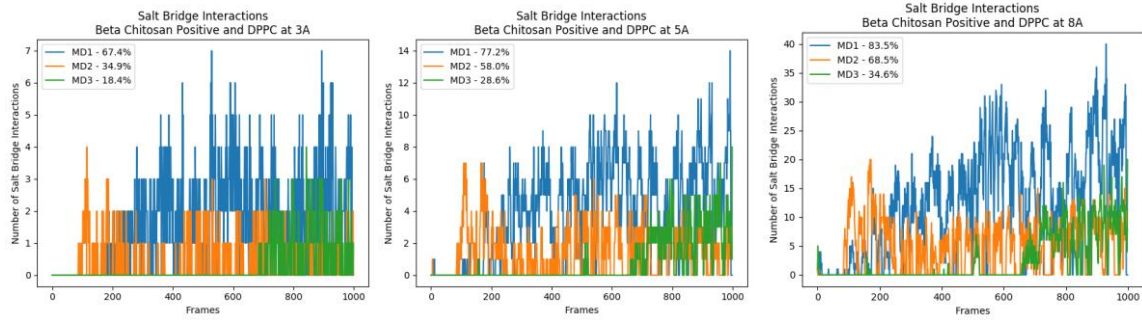
Şekil 3. Alfa dimetil kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.



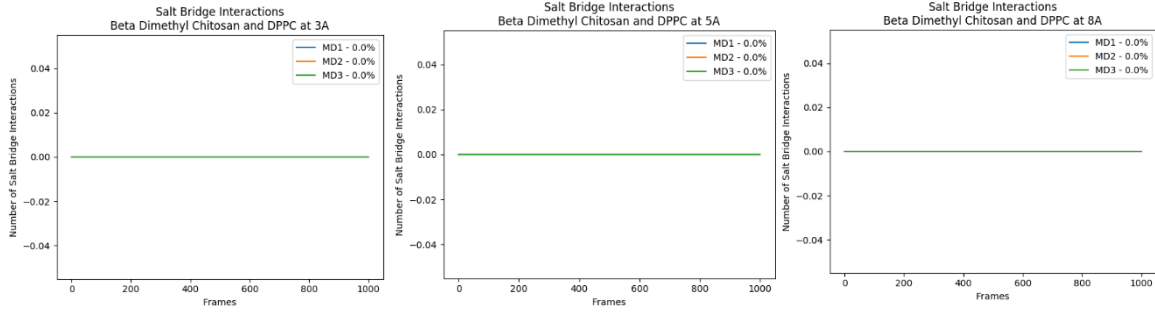
Şekil 4. Alfa trimetil kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.



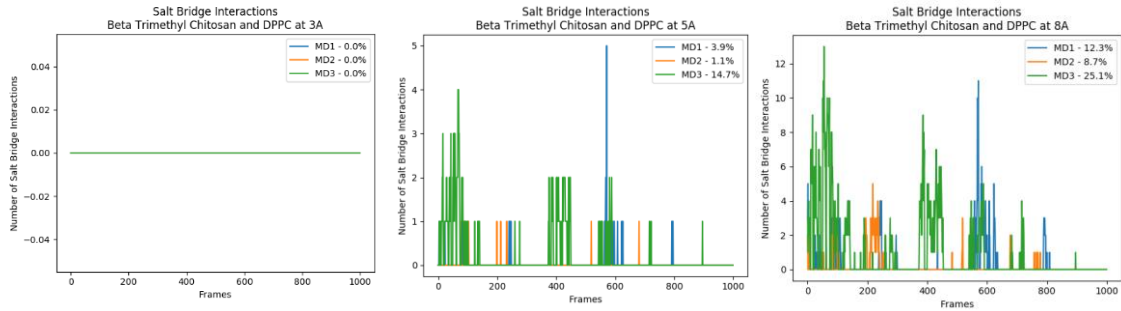
Şekil 5. Nötr beta kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.



Şekil 6. Pozitif yüklü beta kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.

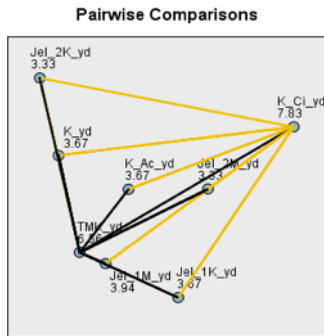


Şekil 7. Beta dimetil kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.



Şekil 8. Beta trimetil kitosan ve DPPC arasındaki iyonik/elektrostatik etkileşimler.

Ek 5. İstatistiksel Analiz






Each node shows the sample average rank.

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Jel_2M_yd-Jel_2K_yd	.000	1.155	.000	1.000	1.000
Jel_2M_yd-K_Ac_yd	.333	1.155	.289	.773	1.000
Jel_2M_yd-K_yd	.333	1.155	.289	.773	1.000
Jel_2M_yd-Jel_1K_yd	.333	1.155	.289	.773	1.000
Jel_2M_yd-Jel_1M_yd	.611	1.155	.529	.597	1.000
Jel_2M_yd-TMK_yd	3.222	1.155	2.791	.005	.147
Jel_2M_yd-K_Ci_yd	4.500	1.155	3.897	.000	.003
Jel_2K_yd-K_Ac_yd	.333	1.155	.289	.773	1.000
Jel_2K_yd-K_yd	.333	1.155	.289	.773	1.000
Jel_2K_yd-Jel_1K_yd	.333	1.155	.289	.773	1.000
Jel_2K_yd-Jel_1M_yd	.611	1.155	.529	.597	1.000
Jel_2K_yd-TMK_yd	3.222	1.155	2.791	.005	.147
Jel_2K_yd-K_Ci_yd	4.500	1.155	3.897	.000	.003
K_Ac_yd-K_yd	.000	1.155	.000	1.000	1.000
K_Ac_yd-Jel_1K_yd	.000	1.155	.000	1.000	1.000
K_Ac_yd-Jel_1M_yd	-.278	1.155	-.241	.810	1.000
K_Ac_yd-TMK_yd	-2.889	1.155	-2.502	.012	.346
K_Ac_yd-K_Ci_yd	-4.167	1.155	-3.608	.000	.009
K_yd-Jel_1K_yd	.000	1.155	.000	1.000	1.000
K_yd-Jel_1M_yd	-.278	1.155	-.241	.810	1.000
K_yd-TMK_yd	2.889	1.155	2.502	.012	.346
K_yd-K_Ci_yd	4.167	1.155	3.608	.000	.009
Jel_1K_yd-Jel_1M_yd	.278	1.155	.241	.810	1.000
Jel_1K_yd-TMK_yd	2.889	1.155	2.502	.012	.346
Jel_1K_yd-K_Ci_yd	4.167	1.155	3.608	.000	.009
Jel_1M_yd-TMK_yd	2.611	1.155	2.261	.024	.665
Jel_1M_yd-K_Ci_yd	3.889	1.155	3.368	.001	.021
TMK_yd-K_Ci_yd	1.278	1.155	1.107	.268	1.000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is .05. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

Ek 6. *In vitro* Kan Deneyi Etik Kurul Belgesi

**BAŞKENT** 25.
ÜNİVERSİTESİ *Yılı*
1993
Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu


TS-EN-ISO 9001
KALİTE SİSTEM BELGESİ

* B E K A 3 N R L Z *

Sayı : 94603339-604.01.02/ 1248 10/01/2019
Konu : Proje Onayı

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALINA

Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalında görev yapmakta olan Doç. Dr. Fatma Burcu Belen Apak tarafından yürütülecek olan KA18/421 nolu "Sağlıklı gönüllü tam kan örneklerinde Kitosan Hemostatik Materyal türevlerinin hemostaz üzerine etkisinin tam kan pıhtılaşma süresi (WHBCT) Lee-White yöntemi ile değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09/01/2019 tarih ve 19/10 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Kurul Başkanı


Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Institutional Review Board and Ethics Committee (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır

Taşkent Caddesi (Eski 1. Cadde) 77. Sokak (Eski 16. Sokak) No:11 06490 Bahçelievler / Ankara	Bilgi İçin: Lülifer TAŞBİLEK
Birim Telefon No: 0 312 212 90 65	Faks No: 0 312 221 37 59
E-Posta: arastirma@baskent.edu.tr	Unvan: Sekreter
	Telefon No: 2129065-2228

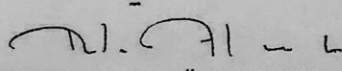


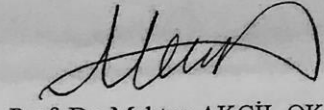


BAŞKENT 25.
ÜNİVERSİTESİ Yılı

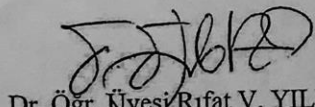
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARI		
PROJE NO	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
KA18/421	19/10	09/01/2019

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı / Çocuk Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalında görev yapmakta olan Doç. Dr. Fatma Burcu Belen tarafından yürütülecek olan KA18/421 nolu "Sağlıklı gönüllü tam kan örneklerinde Kitosan Hemostatik Materyal türevlerinin hemostaz üzerine etkisinin tam kan pıhtılaşma süresi (WHBCT) Lee-White yöntemi ile değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna karar verildi.

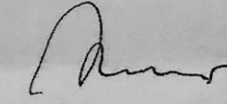

Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ

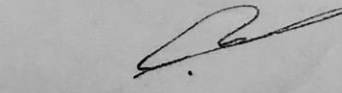

Prof. Dr. Mehtap AKÇİL OK

Katılmadı.
Prof. Dr. H. Seyra ERBEK


Dr. Öğr. Üyesi Rifat V. YILDIRIM

Katılmadı.
Prof. Dr. A. Füsün ÖNER EYÜBOĞLU


Prof. Dr. Neslihan ARHUN


Doç. Dr. Taner SEZER





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 12/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: **Kitosan Türevlerini İçeren Hidrojellerin ve Çözeltilerin Hemostatik Özelliklerinin Değerlendirilmesi - Assessment of Hemostatic Characteristics of Hydrogels and Solutions Containing Chitosan Deriatives**

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 89 sayfalık kısmına ilişkin, 12/07/2019 tarihinde ~~sağım~~/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

12/07/2019

Adı Soyadı: Sıtkı Doğa ELÇİ
Öğrenci No: N10142597
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Biyoloji
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

İmza

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

İmza

Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Sıtkı Doğa Elçi
Doğum Yeri ve Yılı : Ankara/1979
Medeni Hali : Bekar
E-posta : doga.elci@lumilabs.com.tr
Adresi : Birlik Mah. 450. Cad. 445. Sk. Vadi 2000 Sit. A-9 Çankaya,
Ankara.

Eğitim

Lise : 1994-1997 Özel Arı Fen Lisesi
Lisans : 1997-2002 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2002-2005 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji ABD
Doktora : 2010-2019 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Mol. Biyoloji ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce : IELTS: Dinleme: 7.0, Okuma: 7.0, Yazma: 7.0,
Konuşma: 7.5

İş Deneyimi

1. Mayıs 2009 – Haziran 2010 Metis Biyoteknoloji ve Dış Tic. Ltd. Şti. Ar-Ge Sorumlusu
2. Kasım 2013 – Polikinetik Medikal Tıbb. Cih. Paz. İma. San. ve Tic. Ltd. Şti. Genel

Müdür

Deneyim Alanları

Primer tasarımı, PCR, rekombinant DNA teknolojisi, klonlama, DNA dizializi, prob tasarımı, qPCR teknikleri, polimer kimyası.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçeleri

Bu tez çalışması,

1. 2130294 no.'lu ve 99.604 TL bütçeli TÜBİTAK-TEYDEB projesi ve
2. 20177028 no.'lu ve 16.218,14 TL bütçeli CERIC/ERIC projesi tarafından desteklenmiştir.