Uyarıya Duyarlı Mikrojeller ve Nanopartikül Kompozitler: Antibakteriyel Özellikleri ve Meme Kanseri Tedavisinde *in-vitro* ve *in-vivo* Uygulamaları

Damla Ülker

DOKTORA TEZİ

Polimer Bilim ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Şubat 2018

Stimuli Responsive Microgels and Their Composites with Nanoparticles: Antibacterial Properties and both *in-vitro* and *in-vivo* Applications in Breast Cancer Treatments

Damla Ülker

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Polymer Science and Technology

February 2018

Stimuli Responsive Microgels and Their Composites with Nanoparticles: Antibacterial Properties and both *in-vitro* and *in-vivo* Applications in Breast Cancer Treatments

Damla Ülker

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Polimer Bilim ve Teknolojisi Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Vural Bütün

"Bu Tez TÜBİTAK tarafından
111T972 numaralı 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Burs Programı,
1649B031406108 numaralı 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Burs Programı,
1059B14150171 numaralı 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programları kapsamında
ayrıca, 2016-1101 numaralı ESOGÜ BAP projesi kapsamında desteklenmiştir."

Şubat 2018

ONAY

Polimer Bilim ve Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Damla ÜLKER'in DOKTORA tezi olarak hazırladığı "Uyarıya Duyarlı Mikrojeller ve Nanopartikül Kompozitler: Antibakteriyel Özellikleri ve Meme Kanseri Tedavisinde *in-vitro* ve *in-vivo* Uygulamaları" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman **:** Prof. Dr. Vural Bütün
İkinci Danışman **:-**
Doktora Tez Savunma Jürisi

Üye: Prof. Dr. Vural Bütün

Üye: Prof. Dr. Halil İbrahim Ünal

Üye: Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

Üye: Prof. Dr. Nilüfer Erkasap

Üye: Dr. Ögr. Üyesi Cansel Tuncer

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun …….. tarih ve ……..sayılı kararıyla onaylanmıştır

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Vural BÜTÜN danışmanlığında hazırlamış olduğum "Çevre Duyarlı Mikrojellerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Uygulama Alanları" başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığı-mı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallarına göre sunduğumu beyan ederim.

Tez kapsamında yürütülen tüm deney hayvanı çalışmaları için KOBAY DHL A.Ş. Yerel Etik Kurulu'nun 182/2016 protokol numaralı izni alınmış, 'Deney Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi' ve 'Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi'nde yer alan tüm şartlara uyulmuştur. 26/02/2018

Damla ÜLKER

ÖZET

Tez kapsamında, poli[(2-(*N*-morfolino)etil metakrilat)-*ko*-(glisidil metakrilat)] mikrojelleri, P(MEMA-GMA), poli[etilen glikol]-*b*-poli[(2-(*N*-morfolino)etil metakrilat) PEG-*b*-PMEMA stabilizörü varlığında sentezlenmiştir. PEG-*b*-PMEMA diblok kopolimer stabilizörü atom transfer radikal polimerizasyonu ile hazırlanmıştır. GMA komonomeri MEMA monomerin sulu ortamda emülsiyon polimerizasyonunda çapraz bağlayıcısı olarak davranmıştır. P(MEMA-GMA) mikrojelin sulu ortam davranışları ortamın pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değişimine bağlı olarak incelenmiştir. Bir sonraki aşamada, P(MEMA-GMA) mikrojelin bünyesinde altın nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu AuNPs içeren sistemlerin antibakteriyel etkinlik çalışmaları, gram pozitif ve gram negatif *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Enterococus feacalis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimirium, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Candida albicans, Geotrichum candidum* bakteri ve mayalar kullanılarak incelenmiştir. P(MEMA-GMA) mikrojelin, taşıyıcı ve salım sistemi olarak kullanılması amacı ile DPPC (1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-fosfocolin) lipozom içeren mikrojeller hazırlanmıştır. 5-florourasil (5-FU) ilaç etken maddenin manyetik Fe_3O_4 nanopartikül içeren lipozom-mikrojel sistemden çevresel etkiye duyarlı olarak salım çalışmaları PBS içerisinde *in-vitro* olarak ve CD1 nude fareler ile *in-vivo* olarak yürütülmüştür. CD1 nude farelerde meme kanser dokusu östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) pozitif olan MCF-7 hücre hattı ile oluşturulmuştur. Kontrol ve tedavi gruplarının meme kanser dokularının incelenmesinde, immünohistokimya ve patoloji analizleri EP, PR, insan epidermal büyüme faktörü (Cerb-B2 ya da HER2) ve tümör protein p53 ile yapılmıştır. Ayrıca, 5-FU ilaç ve Fe_3O_4 NP/DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) sistemin kanser dokusuna etkilerini anlamak için ER, PR, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve timidilat sentetaz inhibitörün (TS) mRNA düzeyi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmiştir. Meme kanser doku örnekleri patalojik açıdan incelenmiş ve immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrojel, lipozom, AuNPs, kontrollü ilaç salım sistemleri, *in-vitro* ve *in-vivo* meme kanser tedavisi.

SUMMARY

Within the content of this thesis, poly[(2-(*N*-morpholino)ethyl methacrylate)-co-(glycidyl methacrylate)] microgels, P(MEMA-GMA), were synthesized by using poly[ethylene glycol]-*b*-poly[(2-(*N*-morpholino)ethyl methacrylate) diblock copolymerstabilizer (PEG-*b*-PMEMA). PEG-PMEMA diblock copolymer stabilizer was synthesized by atom transfer radical polymerisation. GMA-comonomer behaved as cross-linker the emulsion polymerization of MEMA in aqueous media. Behaviors of P(MEMA-GMA) microgels in aqueuos media were examined by tuning solution pH, temperature and ionic strength. In next stage, gold nanoparticles were produced within P(MEMA-GMA) microgels. The antibacterial effects of these AuNPs systems were examined by using gram negative and gram positive bacteria and fungus such as *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Enterococus feacalis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimirium, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Candida albicans, Geotrichum candidum.* DPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) liposome-containing P(MEMA-GMA) microgels were also prepared in order to use them as delivery and release system. 5-fluorouracil (5-FU) delivery studies from magnetic Fe_3O_4 nanoparticle covered liposome-microgel system were studied both *in-vivo* and *in-vitro*. Breast cancer tissue in CD1 nude mice was created by using MCF-7 cell line which progesterone receptor (PR) and estrogen receptor (ER) positive. Immunohistochemistry and pathologicy analysis of breast cancer tissues of control and treatment groups performed with PR, EP, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2 or Cerb-B2) and tumor protein p53. Also, in order to determined the effect 5-FU drug and Fe_3O_4 NP/DPPC liposome/P(MEMA-GMA) microgel system on tumor tissue was used to analyse Polymerase Chain Reaction (PCR) was determined with mRNA levels of PR, ER, epidermal growth factor receptor (EGFR) and thymidylate synthase inhibitor (TS). Breast cancer tissue samples have been analyzed pathologicaly and these tissues have been evaluated *via* immunohistochemical staining method.

Keywords: Microgel, liposome, AuNPs, controlled drug delivery system, *in-vitro* and *in-vivo* breast cancer treatment.

TEŞEKKÜR

Bilimsel yardım ve katkılarından dolayı ayrıca 2010 yılından bu yana Polimer Araştırma laboratuvarı çatısı altında araştırmalarımı yapabilme imkânı sağlayan doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Vural BÜTÜN'e,

Öğrenim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen, onurlu bir birey olmanın ve her zaman emekten yana durmanın gereğini öğreten, hissettiren, varlıkları sayesinde yaşamaya devam ettiğim sevgili babam Mehmet ÜLKER'e, annem Tombul ÜLKER'e,

'Gerekirse ceketini satıp beni okutacağına' söz veren kefilim, canım abim Sua ÜLKER ve sevgili yengem Öznur ÜLKER'e ve abim Ufuk ÜLKER'e

Beni her zaman ve her koşulda özveriyle, güvenle destekleyen, dostluğu, içten sevgisi ve fedakarlığıyla yanımda olan, gücümü kaybettiğim anlarda destek olan, tezimin gerçekleşmesinde benimle birlikte tüm sıkıntılara katlanarak büyük sabır gösteren, hayatımda çok önemli bir yere sahip dostum, yoldaşım BETÜL BAKER SEZGİN' e ve HASAN SEZGİN'e,

İyisiyle kötüsüyle nice güzel, yılgın ama umutlu günlerimin geçtiği Polimer Araştırma Laboratuvarının üyesi sevgili hocam Dr. Cansel TUNCER'e ve ismini sayamayacağım kadar çok eski, yeni üyesi ile laboratuvarın araştırmacılarına, başta Dr. Mürsel ARICI ve diğer tüm arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarımda deney hayvanları ile ilgili yaptıkları özverili çalışmalar nedeniyle KOBAY A.Ş. sorumlu veteriner hekim Salih SALAR'a

Emeklerinin vergiye dönüştüğü ve bu sayede TÜBİTAK ve Üniversitemizin Bilimsel Araştırma Komisyonu'ndan burs aldığım herkese,

Doktora tez dönemimde yurtiçi ve yurtdışı maddi destekleri ile, 111T972 numaralı 1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Burs Programı, 1649B031406108 numaralı 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Burs Programı ve 1059B14150171 numaralı 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı kapsamında tezimi destekleyen TÜBİTAK ve 2016-1101 numaralı ESOGÜ BAP projesi kapsamında ESOGÜ Bilimsel Araştırmalar Programı komisyonuna,

Sonsuz ve içten teşekkürlerimi sunarım…

İÇİNDEKİLER

ÖZET vi
SUMMARY vii
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI 8
2.1. Kolloidler 8
2.1.1. Çözücünün kolloid kararlılığına etkisi 10
2.1.2. Stabilizörlerin kolloid kararlılığına etkisi 11
2.1.3. Polimer molekül ağırlığının kolloid kararlılığına etkisi 12
2.2. Kolloidlerin sentez yöntemleri 13
2.2.1. Emülsiyon polimerizasyonu ve sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonu 13
2.2.1.1. Emülsifikasyondan mikrojel sentezi 15
2.2.1.2. Çekirdek-kabuk mikrojellerin sentezi 16
2.2.2. Dispersiyon polimerizasyonu 17
2.2.3. Süspansiyon polimerizasyonu 19
2.2.4. Çökelti polimerizasyonu 19
2.2.5. Partikül sentezinde kullanılan diğer yöntemler 19
2.2.5.1. Düz polimer zincirlerinden mikrojellerin homojen çekirdeklenmesi 19
2.2.5.2. Polimer kompleksleşmesi ile mikrojel oluşumu 20
2.3. Mikrojeller 21
2.3.1. Mikrojel sentez yöntemleri 22
2.3.2. Polimerizasyon reaksiyonunun kinetiği 24
2.3.2.1 Başlatıcıların etkisi 25
2.3.2.2. Çapraz bağlayıcının etkisi 25
2.3.3. Mikrojellerin yapısal özellikleri 26

İÇİNDEKİLER (devam)

2.3.4. Mikrojel emülsiyon kararlılığının tanımı 26
2.3.4.1. Çözücünün mikrojel kararlılığına etkisi 28
2.3.4.2. Polimerik stabilizörlerin mekanik olarak kararlılığa etkisi 28
2.3.4.3. Kullanılan polimerik yüzey aktif maddenin etkisi 29
2.3.5. Mikrojel sentezinde kullanılan stabilizörlerin sınıflandırılması 30
2.3.6. Emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan polimerik sürfaktantlar 31
2.4. Yüzey aktif madde sentezinde kullanılan polimerizasyon teknikleri 32
2.4.1. Basamaklı polimerizasyon (kondensasyon polimerizasyonu) 33
2.4.2. Katılma polimerizasyonu (zincir polimerizasyonu) 33
2.4.3. Canlı polimerizasyon teknikleri 35
2.4.4.1. Grup transfer polimerizasyonu (kovalent canlı polimerizasyon) 36
2.4.4.2. Atom transfer radikal polimerizasyonu 37
2.4.4.3. Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu 37
2.4.5. Mikrojellerin saflaştırılması ve depolanması 38
2.5. Mikrojel ve Lipozomal Sistemlerin Uygulama Alanları 38
2.5.1. Çevre duyarlı mikrojeller 39
2.5.1.1. Sıcaklık duyarlı mikrojel sistemler 39
2.5.1.2. pH duyarlı mikrojel sistemler 40
2.5.1.3. İyonik siddet duyarlı mikrojel sistemler 40
2.5.1.4. Çoklu çevre etkisine duyarlı mikrojel sistemler 41
2.5.2. Şişme davranışının termodinamiği 42
2.5.3. Çapraz bağlayıcı yoğunluğunun şişme davranışı üzerine etkisi 42
2.5.4. Mikrojel bünyesinde metal nanopartikül sentezi ve uygulama alanları 43
2.5.5. Lipozomların hazırlanması 44
2.5.5.1. Yapılarına göre lipozomların sınıflandırılması 44
2.5.5.2. Hazırlanma yöntemlerine göre lipozomların sınıflandırılması 44
2.5.6. Lipozomların kullanım alanları 45
2.5.7. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküller ve kullanım alanları 46
2.5.7.1. Manyetik nanopartikülün yüzeyinin kaplanması 47
2.5.7.2. Manyetik nanopartikülün yüzeye kaplanması 48

İÇİNDEKİLER (devam)

2.5.8. Lipozom-mikrojel kompozit sistemler 49
3. MATERYAL VE YÖNTEM 52
3.1. Nano ve Mikro Boyutlu Sistemler 52
3.1.1. Mikrojel sentezinde kullanılan başlatıcının sentezi 52
3.1.2. Mikrojel sentezinde kullanılan stabilizör sentezi 52
3.1.3. Mikrojel sentezi 54
3.2. Mikrojellerin Çoklu Çevre Duyarlılık Çalışmaları 55
3.2.1. pH duyarlılık 55
3.2.2. Sıcaklık duyarlılığı 55
3.2.3. İyonik şiddet duyarlılığı 55
3.3. Mikrojel Bünyesinde Metal Nanopartikül Sentezi 55
3.4. AuNPs Yüklü Mikrojel ile Antibakteriyel ve Antifungal Etkinlik 56
3.5. Mikrojel İçerisinde Fe_3O_4 Manyetik Nanopartikül Sentezi 56
3.6. Lipozom Sentezi 57
3.7. Lipozom-mikrojel Kompozit Sistemlerin Sentezi 58
3.8. İlaç Taşıyıcı Sistemler 58
3.8.1. P(MEMA-GMA) mikrojellerin *in-vitro* ilaç salım sistem olarak kullanımı 58
3.8.2. İlaç etken madde 5-FU yüklü lipozom sentezi ve *in-vitro* salım çalışmaları 59
3.8.3. İlaç etken madde 5-FU yüklü lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezi ve *in-vitro* salım çalışmaları 60
3.8.4. İlaç etken madde 5-FU içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemi ve Fe_3O_4 NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem sentezi 62
3.8.5. Kalibrasyon eğrisi oluşturma 64
3.8.6. XTT çalışması 65
3.8.7. 5-FU içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojelin MCF-7 üzerine etkisi 66
3.9. İn-vivo tümör model oluşturulması 66
3.10. Meme Kanseri Tedavi Protokolü 66
3.11. Karakterizasyon 68
3.11.1. Jel geçirgenlik kromotografisi (GPC) 68

İÇİNDEKİLER (devam)

3.11.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) 68
3.11.3. Dinamik ışık saçılması (DLS) 69
3.11.4. Zetapotansiyel ölçümleri 70
3.11.5. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) 70
3.11.6. Taramalı elektron mikroskop-enerji dağılımlı X-ışınları spektroskopisi (SEM- EDX) 71
3.11.7. Yüksek performans sıvı kromotografisi (HPLC) 71
3.11.8. RT-PCR analizi; RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR metodu ile tayini 72
3.11.9. Patolojik analiz ve immünohistokimyasal boyama doku tespiti 73
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 74
4.1. Mikrojel sentezinde kullanılan blok kopolimerin karakterizasyonu 74
4.2. Mikrojel Sentez Çalışmaları 76
4.2.1. P(MEMA-GMA) mikrojelin çapraz bağlanma mekanizmasının aydınlatılması 76
4.2.2. P(MEMA-GMA) mikrojelin boyut ve boyut dağılım analiz çalışmaları 79
4.3. P(MEMA-GMA) Mikrojelin Çevre Duyarlılık Çalışmaları 81
4.3.1. P(MEMA-GMA) mikrojelin pH duyarlılık çalışmaları 81
4.3.2. P(MEMA-GMA) mikrojelin sıcaklık duyarlılık çalışmaları 82
4.3.3. P(MEMA-GMA) mikrojelin iyonik şiddet duyarlılık çalışmaları 83
4.4. Mikrojel Bünyesinde AuNPs Sentezi 84
4.5. AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemlerin antibakteriyel etkinlik çalışması 87
4.6. Manyetik Fe_3O_4 NP/mikrojel Kompozit Sistemin Sentezlenmesi 90
4.6.1. Fe_3O_4 manyetik NPs içeren P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem karakterizasyonu 91
4.7. Lipozom 95
4.7.1. DPPC lipozomun yapısal karakterizasyonu 95
4.8. Lipozom/Mikrojel Kompozit Sistemlerin Duyarlılık Çalışması 97
4.8.1. Lipozom/mikrojel kompozit sistemlerinin iyon derişimine duyarlılık çalışması 98

İÇİNDEKİLER (devam)

4.8.2. Lipozom/mikrojel kompozit sistemlerin sıcaklık duyarlılık çalışması-DLS çalışması 99
4.9. Toksisite Çalışmaları 100
4.9.1. P(MEMA-GMA) mikrojellerin toksikoloji çalışmaları 100
4.9.2. Fe_3O_4 manyetik NPs içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sisteminin toksikoloji çalışmaları 101
4.10. *İn-vitro* İlaç Salım Çalışmaları 103
4.10.1. P(MEMA-GMA) mikrojelden ilaç salımı 103
4.10.1.1. Sıcaklık değişiminin salım üzerine etkisi 103
4.10.1.2. Salım çözeltisi değişiminin salım üzerine etkisi 104
4.10.2. İlaç etken madde 5-FU yüklü DPPC lipozomun boyut dağılım analiz çalışmaları 106
4.10.3. 5-FU yüklü DPPC lipozom kullanılarak sentezlenen P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin boyut ve boyut dağılım analizi 109
4.10.4. 5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı 111
4.10.5. 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı 112
4.10.5.1. 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı (37 ºC) 113
4.10.5.2. 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı (42 ºC) 114
4.11. Meme Kanseri Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemlerin *In-Vivo* Kullanılması 116
4.11.1. RT-PCR analiz sonuçları 118
4.11.2. Patolojik immünohistokimyasal boyama sonuçları 122
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 126
KAYNAKLAR DİZİNİ 131
ÖZGEÇMİŞ 149

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil **Sayfa**

2.1. Yüklü iki kolloid arası etkileşimler....9
2.2. İki farklı yakınlık derecesine sahip polimer yüzey, a; kısmen birbirine yakın olan iki polimerik yüzey, b; birbirine yakın iki polimer yüzey....10
2.3. Polimer ile parçacık arasındaki bağlanma, a; sterik olarak kararlı bir sistem, b; düşük konsantrasyona sahip polimer veya büyük moleküler ağırlığına sahip sistemler....12
2.4. Emülsiyon polimerizasyonunun temel mekanizması....14
2.5. Öncü jel emülsifikasyonu ile mikrojel oluşum mekanizmaları....16
2.6. Dispersiyon polimerizasyonunun temel mekanizması....18
2.7. Polimerik malzemelerin genel olarak sentez yöntemi....23
2.8. İki farklı başlatıcı derişiminde monomerin zamanla polimerizasyonu, PNIPAM partikül oluşumu....25
2.9. Emülsiyon sistemlerin fiziksel durumları....28
2.10. Emülsiyon kararlılığı için başlıca dört mekanizma....31
2.11. Kopolimer türleri....35
2.12. Çeşitli kopolimerlerin yapıları....36
2.13. a) Lipozom-aljinat manyetik mikrojellerin hazırlanması ve radyo frekans ile kapsüllenmiş bileşiğin difüzyon ile salımı....50
3.1. PEG_{113}-Br makrobaşlatıcı sentez şeması....52
3.2. Genel ATRP mekanizması....53
3.3. PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ sentez şeması....53
3.4. Mikrojel sentezinde kullanılan 2-(N-morfolino)etil metakrilat (MEMA) ve glisidil metakrilat (GMA) monomerlerin kimyasal yapısı....54
3.5. 1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC)....57
3.6. 5-FU ilaç etken maddesine ait kalibrasyon grafiği....65
3.7. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) şematik gösterimi....69
4.1. PEG_{113}-Br ve PEG_{113}-*b*-PMEMA blok kopolimere ait GPC kromatogramı....74

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.2. PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer ^{1}H-NMR spektrumu (D_2O) 75
4.3. a) MEMA, c) Q-MEMA ve c) Q-MEMA+MEMA monomerlerine ait ^{1}H-NMR (D_2O) spektrumu 76
4.4. a) MEMA (D_2O), b) GMA($CDCl_3$) ve c) Q-MEMA/GMA (D_2O) monomerlerine ait ^{1}H-NMR spektrumu 77
4.5. P(MEMA-GMA); GMA komonomeri ile öngörülen otoçapraz bağlanma reaksiyon şeması 78
4.6. P(MEMA-GMA) mikrojelin hidrodinamik yarıçap dağılımı (DLS) 79
4.7. P(MEMA-GMA) mikrojelin hidrodinamik çap dağılımı (Zetasizer- DLS) 80
4.8. P(MEMA-GMA) mikrojelin yapısal karakterizasyonu (TEM 30 kV) 80
4.9. DLS ile P(MEMA-GMA) mikrojelin pH duyarlılık çalışması 81
4.10. Zetasizer ile P(MEMA-GMA) mikrojelin pH duyarlılık çalışması 82
4.11. DLS ile P(MEMA-GMA) mikrojelin sıcaklık duyarlılık çalışması 83
4.12. DLS ile P(MEMA-GMA) mikrojelin Na_2SO_4 ve NaCl duyarlılık çalışması 84
4.13. AuNPs-4 kodlu nanopartikül/P(MEMA-GMA) sentezi 85
4.14. AuNPs-4 numune kodlu AuNPs TEM görüntüsü (200 kV) 86
4.15. AuNPs-5 numune kodlu AuNPs TEM görüntüsü (200 kV) 86
4.16. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin gram pozitif bakteriler üzerine etkisi 88
4.17. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin gram pozitif bakteriler üzerine etkisi 89
4.18. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin mantarlar üzerine etkisi 90
4.19. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin manyetik alana yönlenmesine ait dijital görüntüler 91
4.20. Fe_3O_4 manyetik NP/sP(MEMA-GMA) mikrojel kompozitin TEM görüntüsü 91
4.21. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozitin TEM görüntüsü 92
4.22. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin SEM görüntüsü 92
4.23. a) P(MEMA-GMA) mikrojel b) Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin kalitatif EDX analizi 94

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.24. DPPC lipozoma ait hidrodinamik çap (nm) ölçüm sonuçları (Zetasizer) 95
4.25. DPPC lipozoma ait Zeta potansiyometre ölçüm sonuçları.....96
4.26. DPPC lipozoma ait TEM görüntüleri (100 nm polikarbonat membran).....96
4.27. DPPC lipozoma ait TEM görüntüleri (50 nm polikarbonat membran).....97
4.28. P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel PBS etkisi (zetasizer) 98
4.29. P(MEMA-GMA) mikrojelin MCF-7 hücre hattı üzerine toksisitesi 100
4.30. P(MEMA-GMA) mikrojelin L929 hücre hattı üzerine toksisitesi.....101
4.31. Fe_3O_4 manyetik NPs içeren P(MEMA-GMA) mikrojelin MCF-7 hücre hattı üzerine toksisitesi.....102
4.32. Fe_3O_4 manyetik NPs içeren P(MEMA-GMA) mikrojelin L929 hücre hattı üzerine toksisitesi 102
4.33. P(MEMA-GMA) mikrojelden 37 ºC ve 42 ºC sabit sıcaklıkta 5-FU salımı (PBS)..104
4.34. P(MEMA-GMA) mikrojelden içerisinde PBS ve SF 5-FU salımı (37 ºC).....105
4.35. 5-FU/DPPC lipozoma ait DLS analizi 106
4.36. 5-FU/DPPC lipozoma ait Zetasizer analizi 107
4.37. 5-FU/DPPC lipozomun TEM görüntüleri 107
4.38. 5-FU/DPPC lipozoma ait DLS analizi 108
4.39. 5-FU/DPPC lipozoma ait Zetasizer analizi 108
4.40. 5-FU/DPPC lipozoma ait TEM görüntüleri 109
4.41. 5-FU/DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemi 110
4.42. 5-FU/DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemi (Zetasizer) 110
4.43. DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden farklı sıcaklıklarda PBS içerisinde 5-FU salımı (37 °C ve 42 °C) 112
4.44. (MEMA-GMA) mikrojelden ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojelden PBS içinde ilaç salımı (37 ºC) 114

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.45. P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojelden PBS içinde ilaç salımı (42 ºC) 115
4.46. Tedavi öncesi MCF-7 ile oluşturulan tümör dokusu 117
4.47. İlaç etken madde 5-FU içeren ve içermeyen manyetik Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin CD-1 Farelere enjeksiyonundan sonra uygulanan manyetik alan..... 118
4.48. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem TS reseptör mRNA ifadesi..... 119
4.49. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem PR reseptör mRNA ifadesi 120
4.50. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem EGFR reseptör mRNA ifadesi..... 120
4.51. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ER reseptör mRNA ifadesi..... 121
4.52. p53 gen reseptörü immünohistokimya boyama sonuçları..... 122
4.53. Meme dokusuna komşu tümoral dokular (H&Ex10)..... 123
4.54. Tümör dokuları p53 gen reseptör pozitifliği (p53 x20)..... 124
4.54. Tümör dokuları ER (östrojen)reseptör pozitifliği (ER x10)..... 124
4.55. Tümör dokuları PR (progesteron) reseptör pozitifliği (ER x10) 125
4.57. Tümöral hücrelerde Cerb-B2 reseptör negatifliği (Cerb-B2 x10) 125

ÇİZELGELER DİZİNİ

Cizelge **Sayfa**

2.1. Sudaki hidrofilik yüzey aktif maddelerin miktara bağlı yapısal değişimi 30
3.1. DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezi.....61
3.2. 5-FU içeren DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezi 64
3.3. 5-FU etken maddenin konsantrasyona bağlı HPLC pik alanları 64
4.1. Mikrojel sentez bileşenleri; 50 mg APS, 22 mL H_2O, 65 ºC sıcaklık, PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ stabilizör, 1000 rpm karıştırma hızı 79
4.2. P(MEMA-GMA) mikrojel bünyesinde Au nanopartikül sentezi; %0,1 mikrojel çözeltisi 10 mL H_2O içerisinde kullanılmıştır. 85
4.3. P(MEMA-GMA) mikrojelin kantitatif EDX analizi.....94
4.4. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin EDX alanizi 95
4.5. P(MEMA-GMA) mikrojel, DPPC/P(MEMA-GMA) lipozom mikrojel sistemler.....98
4.6. Mikrojel ve lipozom mikrojel sistemlerin boyutları üzerine sıcaklık etkisi.....99
4.7. Sıcaklık değişimi ile P(MEMA-GMA) mikrojelden 5-FU ilaç etken maddenin salımı (sistem 50 ppm ilaç içermektedir).....103
4.8. Salım ortam değişikliği ile P(MEMA-GMA) mikrojelden 5-FU ilaç etken maddenin salımı 105
4.9. Farklı sıcaklıklarda DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 5-FU ilaç etken maddenin salımı.....111
4.10. 37 ºC sıcaklıkta P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 5-FU ilaç etken maddenin salımı.....113
4.11. 42 ºC sıcaklıkta P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 5-FU ilaç etken maddenin salımı.....115
4.12. Kontrol grubu, serbest 5-FU, DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem, Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojelin patoloji.....115

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
AgNPs	Gümüş nanopartiküller
AOT	Sodyum bis(2-etilheksil) sülfosüksünat
APS	Amonyum persülfat
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyon
AuNPs	Altın nanopartiküller
Bipy	Bipiridin
BİBB	2-2’ bromo-2-metil propionil bromür
Cerb-B2	İnsan epidermal büyüme faktörü
$CHCl_3$	Kloroform
CFT	Kritik topaklanma sıcaklığı
CTAC	Hekzadesiltrimetilamonyum klorit
DBMEA	*N*-metokriloloksietil amonyum bromit
ΔG	Gibbs serbest enerji değişimi
DPPC	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DP_n	Polimerizasyon derecesi
EDX	Enerji dağılımlı x-ışınları spektroskopisi
EGRF	Epidermal büyüme faktör reseptör
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
ER	Östrojen
DLS	Dinamik ışık saçılımı cihazı
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSDMA	2,2’-dimetakriloiloksietil
5-FU	5-florourasil
FBS	Fetal bovine serum
Fe_3O_4 NPs	Demir oksit nanopartükül
FDI	Amerika gıda ve ilaç dairesi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simgeler	Açıklama
GMA	Glisidil metakrilat
GPC	Jel geçirgenlik kromotografisi
GTP	Grup transfer polimerizasyonu
HBL	Hidrofil-lipofil dengesi
^{1}H-NMR	Proton manyetik rezonans spektropisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromotografi
L929	Fibroblast hücre hattı
LCST	Düşük kritik çözelti sıcaklığı
MBA	Metilen-bis-akrilat
MCF-7	Meme kanseri hücre hattı
MEMA	2-(*N*-morfolino)etil metakrilat
Mn	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
M_w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlık
mRNA	Mesajcı Ribo nükleik asit
NIPAM	*N*-izopropilakrilamid
PAA	Poli(akrilik asit)
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PDI	Molekül ağırlık dağılımı
PDEA	Poli[2-(dietilamino)etil metakrilat]
PEG	Poli(etilenglikol)
P(MAA)	Poli(metakrilik asit)
P(MEMA-GMA)	Poli[2-(*N*-morfolino)etil metakrilat-*ko*-glisidil metakrilat]
P(NIPAM)	Poli(*N*-izopripilakril amid)
PR	Progesteron
RAFT	Katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu
RI	Rekraktif indeks

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Simgeler	Açıklama
RT-PCR	Ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu cihazı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
T_c	Camsı geçiş sıcaklığı
TEA	Trietilen amin
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
THF	Tetrahidrofuran
TYMS	Timidilat sentetaz inhibitörü
UV	Ultravitole
VBAC	Vinil-benziltrimetil amonyum klorid
VPTT	Hacim faz geçiş sıcaklığı
XTT	2,3 bis-‘2-metoksi-4nitro-5sulfonil)-2H-tetrazolium-5 karboksanilid tuzu ile yapılan hücre canlılık testi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan malzemeler çağımızın önemli alanlarından biridir. Polimer temelli malzemelerin şekil ve boyut kontrollerinin sağlanabiliyor olması, onların pek çok alanda kullanılabilmesini sağlamaktadır. Polimerlerin kimyasından kaynaklı olarak çevresel etmenlere duyarlı olması yine bu sistemlerin önemli bir avantajıdır. Polimerik malzemeler lineer (doğrusal) polimerler, dentrimer ya da yıldız türü uzun yan zincirli yapıları da kapsayan dallı polimerler, fiziksel ya da kimyasal çapraz bağlı sistemler olarak sentezlenebilirler. Uygun çapraz bağlayıcı varlığında çapraz bağlama ile jel yapılar elde edilir. Kimyasal olarak çapraz bağlı jel yapılı sistemlerden bizlerin ilgisini çeken mikrojeller ve nanojellerdir. Mikrojeller, kolloidal olarak çözeltide çapraz bağlanma derecesi ya da çözücünün doğasına bağlı olarak az ya da çok şişmiş halde bulunabilmektedirler. Ayrıca molekül içi çapraz bağ içeren makromolekül olduklarından, bu maddelerin sentezi sırasında büyüyen çapraz bağlı parçacıkların ebat kontrolünün sağlanması hedeflenen kullanım alanları için gereklidir. Mikrojellerin polimerizasyon süresince ebat kontrollerinin sağlanması, polimerizasyonun sınırlandırılmış bir alanda yapılması ile mümkündür. Bunun için de genellikle emülsiyon ve dispersiyon polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Mikro-nanojellerin boyut kontrollerinin sağlanabiliyor olmaları, boyutlarından ve küresel yapılarından kaynaklı olarak geniş yüzey alanlarına sahip olmaları ve suda sentezlenebiliyor olmaları geniş bir kullanım alanı bulmalarına olanak sağlamaktadır. Bu materyaller biyoteknolojide ilaç taşıyıcı ajan olarak ya da doku implantı çalışmalarında (Spatz, 1996; Murthy, 2003; Cao, 2004; Shan, 2007; Kim, 2009; Saunders, 2009; Housni, 2010; Berkel, 2010; Volden, 2010, 2013), manyetik alan duyarlı materyallerin sentez çalışmalarında (Pich vd., 2004), biyo-sensör teknolojisinde, protein ya da enzim taşınması çalışmalarında (Hendrickson ve Lyon; 2009), su/organik ya da sulu sistemlerin katalizinde (Li vd., 2008; Zhang ve Zhang, 2008), mikro reaktör ve hibrit reaktörün sentez çalışmalarında (Karg ve Hellweg, 2009) ve bunun gibi birçok uygulama alanında kullanılması nedeniyle yoğun ilgi görmektedirler. Özellikle, lateks partikülleri, mikrojeller, çapraz-bağlı miseller, hidrojeller veya diğer farklı polimerik matrislerde metal nanopartiküllerinin immobilize edilmeleri nanoteknolojik sistemlerin gelişmesi ve özellikle yeni mekanik, termal, optik, manyetik ve elektronik özelliklere sahip nanomalzemelerin ortaya çıkması bakımından oldukça önemlidir (Schmid ve Chi, 1992;

Schmid ve Chi 1998; Daniel ve Astruc, 2004; Lu vd., 2006, Jennings ve Strouse, 2007; Thompson, 2007; Wang vd., 2007; Thomas vd., 2008; Chen vd., 2011; Thorne vd., 2011).

Mikrojeller, su içerisinde şişmiş durumda iken dışarıdan gelen etkilere duyarlı olabilir ve şişme-büzülme davranışı sergilerler (Saunders ve Vincent, 1999; Pelton 2000). Bu duyarlılıklar pH etkisine, sıcaklık etkisine, iyonik şiddet etkisine, çözücü etkisine, ışık etkisine ya da manyetik alan etkisine bağlı olabilir (Murray ve Snowden, 1995; Saunders ve Vincent, 1999; Pelton, 2000; Teal vd., 2000; Hendrickson vd., 2010; Romeo vd., 2010; McCann vd., 2014). Çevre değişkenlerinden iki veya daha fazlasına duyarlı olduğu durumda mikrojeller "çoklu duyarlı mikrojeller" olarak adlandırılmaktadır. Çeşitli çevresel faktörlere duyarlılığı tek bir mikrojel bünyesinde toplamak mikrojel sistemine pek çok yeni kullanım alanı sağlayacak olmasından dolayı oldukça önemlidir. Biyomedikal alanlarda kullanımı bunlardan biri olarak not edilebilir (Alarcon vd., 2005).

Bu tez kapsamında, poli[(2-(*N*-morfolino)etil metakrilat)-ko-(gilsidil metakrilat)] mikrojelleri, P(MEMA-GMA), poli[etilen glikol]-*b*-poli[(2-(*N*-morfolino)etil metakrilat) PEG-*b*-PMEMA stabilizörü varlığında, 2-(*N*-morfolino)etil metakrilat monomerinin emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. PEG-*b*-PMEMA stabilizörü atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile sentezlenmiştir. Glisidil metakrilat (GMA) komonomer ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Daha önce literatüre grubumuzca kazandırılmış olan, organik ve sulu ortamda sentezlenebilen, PMEMA mikrojeller (Butun, vd., 2011; Tuncer vd., 2015) ile biyo-uyumlu PEG temelli stabilizörler varlığında sentezlenen P(MEMA-GMA) mikrojeller karşılaştırıldığında, PEG dış kabuklu P(MEMA-GMA) mikrojellerin biyolojik sistemlerde kullanım için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. P(MEMA-GMA) mikrojelin dispersiyon davranışları pH, sıcaklık ve iyonik şiddet değişkenlerine bağlı olarak incelenmiştir. Mikrojel sentezi sırasında kullanılan GMA komonomerinin farklı oranlarda kullanılmasının partikülün çevre duyarlılık üzerine etkileri incelenmiştir. Monomere göre molce %0,5 oranında etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcı içeren PMEMA mikrojel ile yine monomere göre molce %2,5 oranında GMA içeren P(MEMA-GMA) mikrojelin pH ve sıcaklık etkisi kıyaslandığında, P(MEMA-GMA) sistemlerin pH ve sıcaklık değişimine karşı daha fazla şişme-büzülme davranışı gösterdiği ortaya konulmuştur (Tuncer vd., 2015). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, GMA

içeren P(MEMA-GMA) mikrojellerin pH ve sıcaklık değişimine bağlı çalışmalar için daha elverişli olduğu düşünülmüştür.

Polimerik partiküllerin nano boyutta (<1000 nm) sentezlenebiliyor olmaları sayesinde pek çok malzemeye ev sahibi olmaları söz konusu olabilmektedir. Özellikle polimerik nanopartiküllerin ev sahipliğinde metal nanopartiküllerin kontrollü boyut dağılımı ile sentezlenebiliyor olmaları kullanım alanlarını genişletmiştir. Ayrıca mikrojeller gözenekli yapıları sayesinde pek çok malzeme için taşıyıcı olabilme özelliğine sahiptir. Mikrojellerin bu özelliğinden faydalanarak bünyelerinde metal-nanopartiküllerin (metal-NPs) sentezi sağlanabilmekte ve mikrojel metalNPs kompozit sistemler geniş bir spektrumda kullanım alanı sağlayabilmektedir. Mikrojel bünyesinde altın nanopartikül sentezi ve sentezlenen altın nanopartikül AuNPs içeren sistemlerde, AuNPs boyut dağılımı, katalizör sistemi etkisi üzerine çalışmalar literatürde mevcuttur (Phadtare vd., 2003; Suzuki ve Kawaguchi, 2005; Yang vd., 2006; Shan ve Tenhu, 2007; Thompson vd., 2007; Christodoulakis vd., 2009; Zhao vd., 2009; Bickford vd., 2010; Volden 2010; Wunder vd., 2010).

P(MEMA-GMA) mikrojelin uygulama alanı çalışmaları çerçevesinde, bu tez kapsamında, P(MEMA-GMA) mikrojelin bünyesinde AuNPs sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen Au nanopartiküllerin boyut dağılımı, literatürdeki *N*-izopropilakrilamid (NIPAM) bazlı mikrojel içerisinde sentezlenen AuNPs ile kıyaslanmıştır (Suzuki ve Kawaguchi, 2005). Elde edilen sonuçlara göre Au nanopartiküllerin mikrojel içerisinde dağılımının oldukça homojen ve 10 nm altında olduğu belirlenmiştir. P(MEMA-GMA) mikrojelin bünyesinde sentezlenen AuNPs sistemlerin antibakteriyel etkinlik çalışmaları, gram pozitif ve gram negatif *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Enterococus feacalis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimirium, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Candida albicans, Geotrichum candidum* bakteri ve mayalar kullanılarak incelenmiştir. Antibakteriyel etkinlik çalışmaları sıklıkla bakterilere karşı kullanılan bir antibiyotik olan amoksisillin (Neu, 1974) ve mantarlara karşı kullanılan ketokonazol (Heeres, 1979) antibiyotik etkinliği ile kıyaslanmıştır. Literatürde yapılan antibakteriyel etkinlik çalışmaları incelendiğinde yapılan çalışmaların bu kadar geniş bir yelpazede yapılmadığı görülmüştür. Yine de *Bacillus* subtilis (Bhankyaraj vd., 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Patil vd., 2017), *Proteus vulgaris*

(Bhankyaraj vd., 2016), *Staphylococcus aureus* (Penders vd., 2017) bakterileri üzerine Au nanopartiküllerin antibakteriyel etkinliği literatürde mevcuttur. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemlerin ve Au nanopartiküllerin antibakteriyel etkinlik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamasa bile bu iki sistemin antibakteriyel etkinlikleri benzer sonuçlar göstermiştir. Bu sistemlerin bakteriler üzerine etkinliğinin, kontrol grubu olan antibiyotikler ile karşılaştırılması daha uygun olacaktır. Sentezlenen AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemler antibiyotiklerden daha etkindir. AuNPs sistemler kullanılarak, antibiyotiklerin bakteri ve mayalar üzerinde sebep olduğu antibiyotik direncin önüne geçilebildiğine dair çalışmalar literatürde mevcuttur (Zharov vd., 2006; Zhao vd., 2010; Xiaoning, 2014). Bu sebeple AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemlerin de antibiyotik direncine karşı kullanılabilecek bir potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Nanotıp alanında yeni gelişmeler ve ihtiyaçlar sonucu kullanılmaya başlanan yeni tip ilaç taşıyıcı, hedefleyici ve kontrollü salım sistemleri son dönemin önde gelen çalışma alanlarındandır. Polimerik sistemler bu alanda en çok başvurulan sistemler olup, özellikle nanojel (< 100 nm) ya da mikrojeller (> 100 nm) üzerinde en çok çalışılan sistemlerdendir. İlaç taşıyıcı ve salım sistemleri olan mikrojeller, sentez sırasında istenilen özelliklere göre tasarlanabilmektedirler. İlaç taşıyıcı ve salım sistemleri polietilen glikol, dış yüzey sayesinde vücudun savunma sistem tarafından zararlı olarak tanımlanmayan biyo-uyumlu sistemler haline getirilebilmektedir (Zhang vd., 2002; Liu vd., 2010). Bu sistemlerin çevre duyarlılıkları (pH, sıcaklık ya da iyonik şiddet gibi) salım sistemleri için aranılan özelliklere cevap verebilirlikleri, uygulama potansiyeli doğurmaktadır. Mikrojellerin bu pozitif etkilerinin yanı sıra, molekül ağırlığı küçük olan ilaç etken maddelerini hızlı bir şekilde salmaları ve uzun süreli kontrollü salım için yeterli olmamaları bu sistemler üzerinde çalışılması gereğini ortaya koymaktadır. Mikrojellerin salım kontrolünü geliştirmek için sentezleri sırasında çapraz bağlayıcı miktarını arttırmak çözüm olarak görünse bile, çapraz bağlayıcının arttırılması mikrojelin çevre duyarlılığını veya çevre koşullarına tepki düzeyini azaltacak olması göz ardı edilmemesi gereken bir husustur. Bu sebeple lipozomlar polimerik sistemler ile birlikte kullanılabilmektedir (Zhang vd., 2008, Saleem vd., 2013). Toksik olmayan ve vücudumuzda bulunan lipitlere benzer yapılar kullanılarak hazırlanan lipozomlar, hidrofilik ve hidrofobik bölgeler içeren yapıları gereği hidrofilik ya da hidrofobik ilaç etken madde taşınması ve salımında kullanılabilmektedirler (Wang vd., 2012; Nimker vd., 2017). Biyo-uyumlu olan lipozomların ilaç taşıyıcı ve salım sistemi

olarak tek başlarına kullanılmaları stabilizasyon problemi sebebiyle sınırlıdır. Stabil kalmaları için fiziksel çapraz bağlayıcı olan kolestrol varlığında hazırlanmaları gerekmektedir (Anderson ve Omri, 2008). Lipozom hazırlanması sırasında kolestrol ilavesi hidrate olmuş lipozomları stabile edebilir, fakat bu süre ilaç taşıyıcı olarak kullanımları için yeterli değildir (Winterhalter, 1993). Lipozomların stabilizasyonu için, lipozomlar arasında çeşitli molekül ağırlıklarına ya da dallanmaya sahip olan, lipozom yüzeyinde sterik bir tabaka oluşturan poli(etilen glikol) ile hazırlanan, PEGilasyon (yüzeyin PEG ile kaplanması) adı verilen bir sistem geliştirilmiştir (Gabizon ve Martin, 1997; Reddy, 2000). Bu yaklaşım ile sentezlenen PEG kaplı lipozomların PEG kaplanmamış lipozomlara kıyasla, hedef bölgede antibakteriyel ilaç konsantrasyonu artırma ve anti-mikrobiyal tedavilerin iyileştirici etkilerini arttırmada daha kullanışlı olduğu ortaya konulmuştur (Cern vd., 2014).

Bu tez çalışması kapsamında, P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin hedefleme için Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller kullanılmıştır. Bu tez çalışmaları ile, literatürde henüz bulunmayan, çoklu çevre şartlarına duyarlı lipozom-mikrojel sistemlerin Fe_3O_4 ile kaplanması, hedefe yönlendirilmesi ve hedefte biriktirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Canlı metabolizmasında önemli yeri olan pH, sıcaklık ya da elektrolit konsantrasyonu değişimi gibi çoklu çevre etkisine duyarlı polimerik malzemeler modifiye edilerek, ilaç etken madde taşıyıcı sistem olan lipozomlar, Fe_3O_4 manyetik nanopartikül kaplı mikrojellerin içine hapsedilmiş ve bu sayede sistemin hedefe yönlendirilmesi ve birikmesi sağlanmıştır. Bu çalışmada, 5-florourasil (5-FU) model ilaç etken madde olarak kullanılmıştır. Model etken madde meme, mide, kolon kanser tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır (Longley vd., 2003). Etken maddenin avantajı katı tümör bölgelerinde hızlı kanser hücresi çoğalmasını engellemesi iken dezavantajı kısa bir süreli yarılanma ömrüne sahip olması ve bu sebeple etkinliğinin kısa sürmesidir. Bu sebeple literatürde 5-FU etken maddesinin taşıyıcı sistemler ile belli bir bölgeye toplanması ve tedavinin istenilen alanda gerçekleşmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Arias vd., 2008; Li vd., 2014; Li vd., 2015). Yapılan çalışmalarda anti kanser ajan olan bu etken maddenin kimyasal yapılar, lipozomlar veya polimerik malzemeler ile modifiye edilmesi hedeflenmiştir. Lipozom hazırlanmasında termal olarak duyarlı olan ve ilaç salım sistemlerinde sık sık kullanılan 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC) kullanılmıştır (Kim vd., 2013; Felice vd., 2014). DPPC lipozom ile kaplı 5-florourasilin pH, sıcaklık ya da iyonik şiddet gibi dış etkilerle şişme-büzülme davranışı sergileyen yeni tip polimerik mikrojel sistemler içerisinde hedefe

yönlendirilmeleri çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda lipozom-mikrojel sistemin istenen bölgeye hedeflenmeleri ve çevresel etkiye duyarlı olar*ak in-vitro* (vücut dışı) ve *in-vivo* (vücut içi) salımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. PEG türevli nano-mikro yapılar kullanılarak hazırlanan *in-vitro* salım sistemleri üzerine çalışmalar literatürde de mevcuttur (Masato vd., 2011; Wanga vd., 2012; Stukel vd., 2014). P(MEMA-GMA) mikrojel, DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel den 5-FU salım çalışmaları fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde 24 saat süreyle Yüksek Performans Sıvı Kromotografisi (HPLC) kullanılarak takip edilmiştir. 5-FU ilaç etken maddesinin DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden salım profilinin, kontrollü ilaç salım sistemlerinden Fickian difüzyon salımına (Ritger ve Peppas,1986) uygun olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemlerinden 5-FU ilaç salım kinetiği üzerine sıcaklık etkisinin varlığı da ortaya konulmuştur.

Tez kapsamında yapılan son çalışma ise 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik nanopartikül kaplı DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemlerin meme kanser bölgesine hedeflenerek tedavide *in-vivo* olarak kullanılması ile ilgilidir. Polimerik sistemlerin ve lipozomların *in-vivo* meme kanseri çalışmalarda kullanıldığı bilinmektedir (Xing vd., 2013; Torchilin, 2014; Eloy vd., 2016). Tüm bu çalışmalarda temel amaç, meme kanser tedavisinde kullanılan ilaç etken maddelerinin vücudun tümüne yayılmasının değil, meme kanser bölgesinde birikerek tedaviyi sağlamalarıdır. Yapılan çalışmada meme kanseri oluşumu MCF-7 hücreleri kullanılarak sağlanmıştır. İlaç etken madde salım çalışmaları için model olarak belirlenen tümör çalışmalarında sıklıkla savunma sistemi baskılanmış tüysüz (nude) fareler kullanılmaktadır. Literatürde mevcut çalışmalarda dişi fare meme dokusuna implant edilen insan meme hücreleri ile oluşturulan tümör dokuya belirli dozlarda uygulanan ilaç etken maddesinin tedavi etkisi incelenmiştir (Li vd., 2015).

Meme kanser dokusu oluşumu için kullanılan MCF-7 hücre hattı östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve insan epidermal büyüme reseptörü (HER2) yani immünolojik olarak ifadesinde ER^+ ve $PR^{+/-}$ ve $HER2^-$ reseptör içeren bir hücre hattıdır (Holliday ve Speirs, 2011). Meme kanser modellerinde bazı durumlarda ER+ PR+ bazı durumlarda ikisinden biri pozitif diğeri negatif ya da bahsi geçen ER, PR, ve HER2 reseptörlerinin tümü de negatif olabilir. İmmünolojik boyama metodu da kullanılan ve patalojik olarak değerlendirilen p53 isimli gen ise bir tümör baskılayıcı gen olup (Vogelstein

vd., 2010), bu genin tümör oluşumunu durdurma görevi vardır. Ayrıca 5-FU metabolizmasının önemli göstergelerinden TYMS (Longley, 2003) ile meme kanseri metabolizmasının önemli göstergelerinden östrojen, progesteron reseptörleri ve EGFR mRNA düzeyinde RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. İlaç etken maddenin etkisi ve Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) sistemlerin dokuya etkisi de RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Yapılan çalışma ile 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) sistemlerin meme kanseri hedefleme ve tedavisi için etkin olduğu sonucuna varılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Mikrojellerin sentez karakterizasyon ve uygulama alanları ile ilgili bu tez kapsamında öncelikle kolloidal sistemlerin genel özellikleri açıklanmıştır. Ardından mikrojel sistemlerin sentez, stabilizasyon ve uygulama alanları ile ilgili literatür özeti verilmiştir.

2.1. Kolloidler

Genel olarak liyofilik (suyu sevmeyen ya da yağımsı sıvıyı seven) kolloidlerin kararlılığı için iki mekanizma söz konusudur. Bunlardan biri elektriksel çift katman arasındaki elektriksel itme, diğeri ise sterik ya da entropi bakımından kararlılıktır. Kolloidler, çözelti içerisindeki parçacıklar kümelenme ya da topaklanma yapmadıkları sürece kararlı parçacık olarak tanımlanırlar (Myers, 1999). Kolloid parçacıklarının bir araya gelmesi için (agregasyon), parçacıkların çarpışması ve bu çarpışma sonucu parçacığın birbiri ile yapışmasını sağlayacak etkileşimlerin oluşması gereklidir. Bu sebep parçacıklar arası etkileşimde dikkate alınması gereken iki temel ölçüt vardır. Bunlar, parçacıkların çarpışma sayısı veya sıklığı ve bu çarpışmaların etkinliği olarak sıralanabilir. İki parçacık yaklaştıkça, parçacıklar arasında itici etkileşimler ve dispersiyon kuvvetlerine dayalı çekici etkileşimleri söz konusu olacak ve dolayısıyla bu etkileşimler doğal olarak kolloidi dengesiz kılacaktır. Parçacıkların kararlılıklarını açıklamak için göz önüne alınan sistemin etkileşim enerjisi Denklem 2.1'de verildiği gibi iki enerjinin toplamı olacaktır.

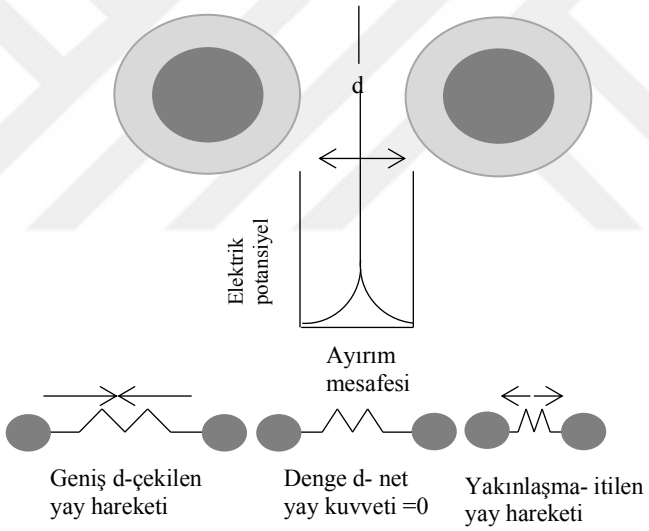
$$\Delta G_{toplam} = \Delta G_{çekici\ güç} + \Delta G_{itici\ güç} \qquad \text{(Denklem 2.1)}$$

Yukarıda tartışılan kararlılık mekanizması, yüzeyinde elektrik yük taşıyan parçacıklar ile ilgilidir. Bu sistemlerde çift katman arasındaki elektriksel etkileşim, kinetik kararlılık etkileşimini sağlar.

Bir diğer kararlılık mekanizması ise parçacığın yüzeyine adsorbe olan ve sterik veya entropik kararlılığı sağlayan liyofilik bir kolloidin varlığında tartışılan bir süreçtir. Genel olarak kullanılan kararlılık ajanının (stabilizör) nispeten yüksek molekül ağırlığı ve çift

kimyasal yapıya sahip olması gibi kimi gereksinimleri vardır. Stabilizörün dispersiyon ortamında düşük çözünürlük göstermesi ve bir kısmının partikülün yüzeyine adsorbe olma eğilimi göstermesi gerekmektedir (Myers, 1999).

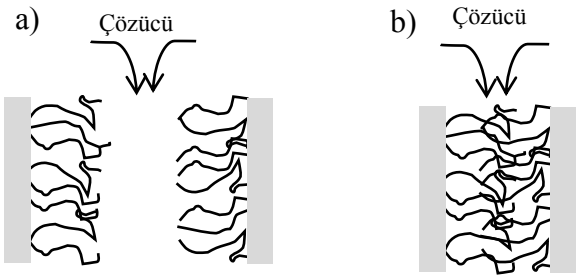
Liyofilik polimer tabakası adsorbe edilmiş iki kolloid parçacığı, Şekil 2.1'de gösterildiği gibi birbirine yakınlaştığında polimer tabakalarının birbirleri içine girmesine sebep olur. Bu etkileşimler, parçacıklar arasında adsorbe edilen polimer türünün derişimindeki artıştan kaynaklanan ozmotik etki ve parçacıkların çarpışmalarından kaynaklanan serbestlik derecesi azalmasının etkileşen polimerin entropik veya hacimsel kısıtlamasına sebep olması olarak özetlenebilir. Her iki durumda da sistem entropisinde bir düşüş meydana gelecek ve ozmotik etki birbirine yakınlaşan parçacıkların entalpisini etkileyecektir.



Şekil 2.1. Yüklü iki kolloid arası etkileşimler

Yukarıda görüldüğü gibi partikül arasında bulunan geniş mesafede yay gerilir ve kolloidler birbirini çeker, van der Waals etkileşim, yakınlaşmada kolloidleri birbirinden uzaklaştıran itme kuvveti, elektrostatik etkileşim oluşur.

Böyle bir sistemde entropi azalmasını engellemek için parçacıklar daha fazla hareket etmeye başlar ve birbirinden uzaklaşır. Bunun sonucunda uzaklaşan parçacıklar arasına çözücü birimleri yerleşir. Parçacıkların yaklaşmasını engelleyen ve kararlılıklarını sağlayan Şekil 2.2 'de gösterildiği gibi bir enerji bariyeri oluşur.



Şekil 2.2. İki farklı yakınlık derecesine sahip polimer yüzey, a) kısmen birbirine yakın olan iki polimerik yüzey, b) birbirine yakın iki polimer yüzey

Yukarıda gösterilen şekilde kısmen birbirine yakın olan yüzeyde, polimer zincirlerinin konsantrasyonu ile ozmotik basınç oluşur ve çözücü molekülleri kolaylıkla yüzeyler arasına yerleşerek parçacıkları birbirinden uzak tutar, b şeklinde ise polimer zincirlerinin penetrasyonu ile entropi düşer.

Elektrik yük bulundurmayan böyle dengelenmiş bir sistemin net enerjisi Denklem 2.2'de verildiği gibi çekici van der Waals etkileşimi ve itici sterik etkinin toplamı olacaktır.

$$\Delta G_{toplam} = \Delta G_{sterik\ etki} + \Delta G_{itici\ güç} \quad \text{(Denklem 2.2)}$$

Kolloidlerin kararlılığında bahsi geçen polimerik koruyucu veya stabilizörün parçacık yüzeyine kuvvetli etkileşimler ile bağlanmış olması önemli bir süreçtir. Stabilizörün kolloid kararlılığına etkisi bir sonraki başlıkta tartışılmıştır.

2.1.1. Çözücünün kolloid kararlılığına etkisi

Yukarıda bahsedilen kararlılık mekanizmasından, stabilizör, kolloid ve çözücü sisteminde, çözücünün önemli bir rol oynadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Çözücünün niteliği stabilizör oluşumunda kullanılan monomer üniteleri için çözücü niteliğini taşırsa, polimer kolloid yüzeyine daha az adsorbe olacak ve bu parçacığın kararlılığını etkileyecektir. Bunun tersine, çözücü polimer zincirini daha az çözen bir çözücü ile değiştirilirse, koruyucu tabakanın kalınlığı, polimerin parçacık yüzeyinde daha fazla birikmesine sebep olacaktır. Bu da topaklanmaya (flokülasyon) karşı kararlılığı azaltacaktır.

Polimer çözeltisinin karmaşık termodinamiğinden dolayı çoğu polimer sıcaklığın bir fonksiyonu olarak çözücüdeki kararlılığı değişir. Uygun bir çözücüde, polimer zincirleri rastgele-sarmal şekilde ve kısmen açık yapıda olacaktır. Sıcaklık değiştikçe çözücü kalitesi bir miktar azalacak ve polimer zincirleri daha karmaşık bir şekilde bir arada bulunacaktır. Polimerin iyi çözündüğü noktadan daha kötü çözündüğü noktaya geçtiği bu sıcaklığa teta noktası (Θ) adı verilir. Kolloid kararlılığı açısından, iyi ya da kötü olarak tanımlanan çözücü özelliği sistem için kritik topaklanma sıcaklığı (CFT) olarak tanımlanır. Bu nokta aynı zamanda çözücü içerisinde karışabilen başka bir çözücünün etkilenmesi ile de elde edilebilir.

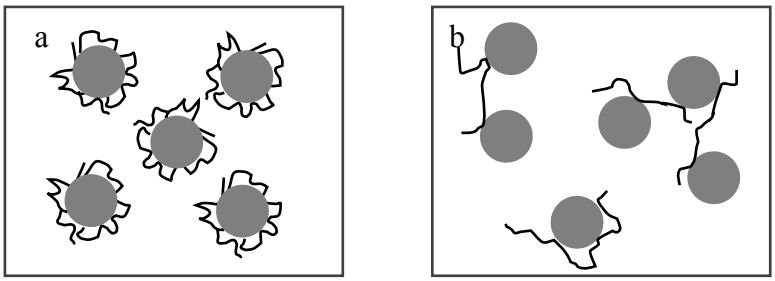
Büyük molekül ağırlığına sahip polimerler sterik olarak kararlı parçacıkla arasında köprü kurarak topaklanmaya sebep olurken, aynı zamanda olumlu etkilere de sebep olabilirler. Örneğin saflaştırma işlemlerinde sisteme büyük molekül ağırlığına sahip bir polimer zinciri ilavesi kirliliklerin bir topaklanmaya sebep olmasına ve böylece saflaştırma işleminin daha kolay yapılmasına sebep olabilir.

2.1.2 Stabilizörlerin kolloid kararlılığına etkisi

Genel olarak liyofilik kolloidlerin kararlılığı için yüksek molekül ağırlıklı malzemeler, kolloidin etrafına daha iyi sarınacağından ve kalın bir koruyucu tabaka oluşturacağından topaklanmaya karşı daha iyi bir koruma sağlayabilir. Kolloid yüzeyine kaplanan stabilizör partikülün yükünü genellikle elimine eder. Partiküller arası itici etkileşim, yüzeyde bulunan sürfaktant tabakaları arası etkileşimler tarafından belirlenir. Apolar bir çözücüde stabilizörün apolar kısımları çözücü ile etkileşir ve kolloid partiküllerini birbirlerinden ayrı tutar. Yüklü stabilizörler, van der Waals etkileşiminin azalmasından dolayı, uzun süreli elektrostatik itme kuvvetinden etkilenecektir. Stabilizörler kolloid stabilizasyonu sağlamasının yanında bazı dezavantajları da yanında getirir. Stabilizör olarak kullanılan polimerlerin zincir uzunluğunun belirlenmesinde kimi kurallara uyulması gerekmektedir. Büyük molekül ağırlığına sahip polimerler kolloid parçacıkları arasında köprü oluşturarak topaklanmaya sebep olabilir.

Parçacık yüzeyine birden fazla bağlanma noktasına sahip uzun bir polimer zinciri kolloid dispersiyonuna eklenirse, polimerin olası bağlanma noktasının iki farklı parçacığı birbirine bağlama ihtimali ortaya çıkar. Bu durum özellikle polimer kıyasla daha yoğun

kolloid dispersiyonu içeren sistemlerde daha fazla gözlenebilir. Konu ile ilgili görsel Şekil 2.3'de verilmiştir.



Şekil 2.3. Polimer ile parçacık arasındaki bağlanma, a) sterik olarak kararlı bir sistem, b) düşük konsantrasyona sahip polimer veya büyük moleküler ağırlığına sahip sistemler

Şekil 2.3-b'de gösterilen sistemlerde polimer molekülünün parçacık ile etkileşimi nedeniyle polimer moleküller arasında köprü topaklanması oluşur. Böylece, iki veya daha fazla parçacığın bağlanmasına sebep olabilir.

Büyük molekül ağırlığına sahip polimerler sterik olarak kararlı parçacıklar arasında köprü kurarak topaklanmaya sebep olurken, aynı zamanda olumlu etkilere de sebep olabilirler. Örneğin saflaştırma işlemlerinde sisteme büyük molekül ağırlığına sahip bir polimer zinciri ilavesi kirliliklerin bir topaklanmaya sebep olabilir.

2.1.3 Polimer molekül ağırlığının kolloid kararlılığına etkisi

Genel olarak liyofilik kolloidlerlerin kararlılığı için yüksek molekül ağırlıklı malzemeler, kolloidin etrafına daha iyi sarınacağından ve dolayısıyla daha kalın bir koruyucu tabaka oluşturacağından topaklanmaya karşı daha iyi bir koruma sağlayabilir. Fakat çoğu fiziksel sistemde olduğu gibi, polimer zincir uzunluğunun belirlenmesinde de kimi noktalara dikkat etmek gerekmektedir. Büyük molekül ağırlığına sahip polimerler kolloid parçacıkları arasında köprü oluşturarak topaklanmaya sebep olabilir.

2.2. Kolloidlerin sentez yöntemleri

Kolloidlerin hazırlanmasında heterojen polimerizasyon türlerinden olan ve çekirdek oluşumu mekanizması üzerinden ilerleyen emülsiyon, dispersiyon, süspansiyon ve direk monomer damlacığının polimere dönüşümü mekanizması ile ilerleyen çökelme polimerizasyonu gibi farklı sistemler kullanılabilir.

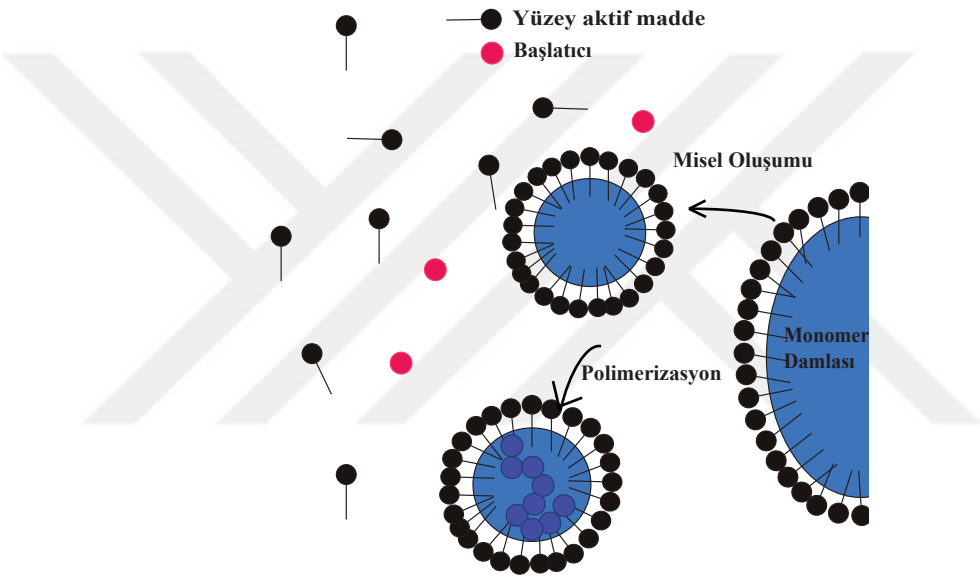
Heterojen polimerizasyon yöntemlerinden emülsiyon, dispersiyon, süspansiyon ve çökelti polimerizasyonunu terimsel olarak ayırmak için dört temel noktaya dikkat edilmelidir.

1. Polimerizasyon karışımının başlangıç durumu
2. Polimerizasyon kinetiği
3. Partikül oluşum mekanizması
4. Sonuçta oluşan polimer partikülünün şekil ve boyutu

2.2.1. Emülsiyon polimerizasyonu ve sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu mikrojel sentezinde kullanılan başlıca yöntemlerden biridir (Loxley ve Vincent, 1997; Saunders ve Vincent, 1999; Panayitou vd., 2007). Heterojen serbest radikal polimerizasyon olan emülsiyon polimerizasyonu, su içerisinde kısmen hidrofobik monomerin emülsifikasyonunu (su içinde yağ) içerir. Yüzey aktif madde, monomer, suda çözünen serbest radikal/başlatıcı ve su başlıca tepkime bileşenleridir. Monomer başlangıçta süspansiyon halinde büyük bir monomer damlası iken, polimerizasyonun sonunda, 100 nm çapında yüzey aktif madde ile stabilize edilmiş lateks partiküller halini alır. Genel olarak emülsiyon polimerizasyonunda etilen, bütadien, stiren, akrilonitril, akrilat ester, metakrilat esterler, vinil asetat ve vinil klorid gibi monomerler kullanılır. Polimerizasyon sulu faz ve büyüyen lateks partikül içinde gerçekleşir. Polimer ürünü ve su arasında çok zayıf bir uyum olduğu için, partikül çekirdek polimerizasyonu ilerledikçe boyutta büyüme olur ve büyüme arttıkça aşırı büyük bir yağ-su ara yüzey böylesi oluşur. Bu nedenle, partikülün yüzeyine fiziksel olarak adsorbe olabilecek ya da kimyasal olarak birleşebilecek iyonik sürfaktantlar, iyonik olmayan sürfaktantlar ya da hidroksietil selüloz, polivinil alkol, polivinil pirolidone gibi koruyucu kolloidler, koagülasyondan lateks

partiküllerinin etkileşimini önlemek için kullanılır. Emülsiyon polimerizasyonunda kullanılacak yüzey aktif madde sürfaktant konsantrasyonu, kritik misel konsantrasyonunun (CMC) üzerinde tutulmalıdır (Chern, 2006). Örneğin polistiren lateksleri hazırlanırken, stiren monomeri, potasyum persülfat başlatıcı ve su kullanılır. Tepkime azot ortamında 60 °C sıcaklıkta yürütülürse; persülfat stiren, polimerizasyonunu başlatan sülfat radikallerine dönüşür. Sülfat grubu ile başlayan stiren zincirleri, su ve polistiren arasında elektrostatik bir bariyer oluşturur ve böylece stabilizasyon sağlanmış ve topaklanma önlenmiş olur. Emülsiyon polimerizasyonu ile ilgili temel mekanizma Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Emülsiyon polimerizasyonunun temel mekanizması

Sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonunda ise, partiküllerin stabilizasyonunu sağlayan partikül boyut dağılımı, ara yüzeylerin elektrostatik ve yapısal mekanik özellikleridir. Polimer-monomer partikül oluşum mekanizması ile ilgili kesin bir mekanizma olmasa da heterojen faz polimerizasyonunun başlangıcında su içinde bulunan başlatıcının ve monomerin karışımı sırasında birkaç art arda süreç vardır. Emülsiyon oluşturma sırasında birbiri ile karışmayan iki sıvı arasında çok büyük miktarda ara yüz oluşur. Ara yüz oluşumu sırasında yapılan işten açığa çıkan enerji potansiyel enerji olarak sistemde kalırsa, bu durumda sistem termodinamik olarak kararlı olmayacağından, enerjiyi azaltmak için sistem ara yüzeyleri azaltmaya çalışır. Termodinamik emülsiyon sisteminin kararlılığını etkileyen önemli bir faktördür. Fakat partiküllerin kinetik de kısa vadede sistemin kararlılığını etkiler. Kararlı bir emülsiyon oluşturabilmek için kinetik önemli bir

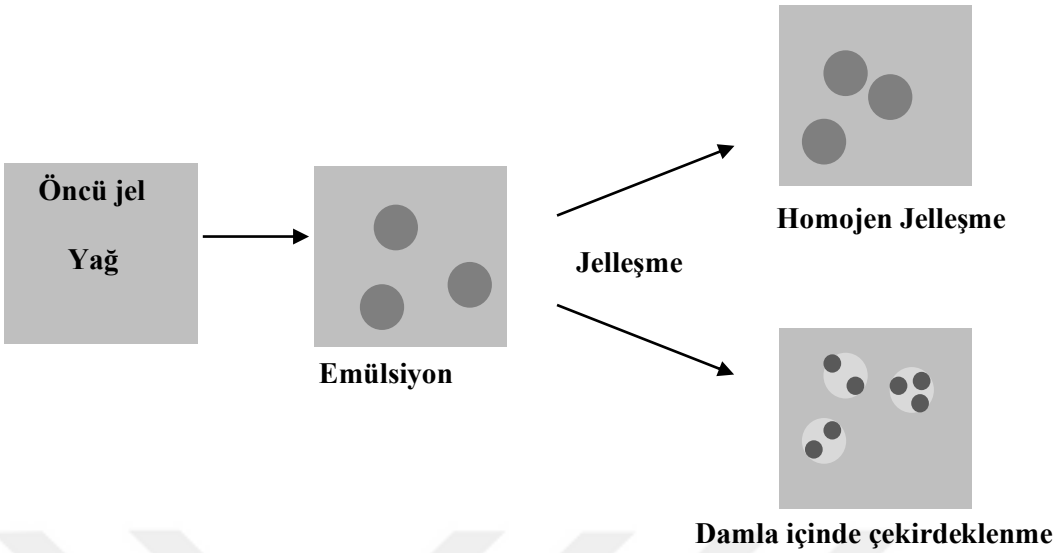
faktördür. Bu sebepten dolayı, emülsiyon kararlığında fazlar arasında ara yüzey gerilimini düşürmenin önemli bir etken olduğunu göz ardı etmeden, her zaman en önemli gereklilik olmadığını da bilmek gereklidir.

Sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonunda genel olarak akrilik asit ve metakrilik asit monomerler kullanılır. Stiren monomerinin suda çözünebilen 4-vinilpridin komonomer eşliğinde suda polimerizasyonu, sürfaktant olmadan emülsiyonu sağlanmıştır (Wang ve Pan, 1999). Stiren polimerizasyonun başlangıcından hemen önce 4-vinilpridin polimerizasyonu başlatılmış böylece stabilizasyon sağlanmıştır. Yine sürfaktant içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile stiren, bütil akrilat ve *N, N'*-dimetil, *N*-bütil, *N*-metakriloloksietil amonyum bromit (DBMEA) polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Katyonik başlatıcı olarak azobis(izobütiramit hidroklorit) ve monomerin çözünürlüğünü arttırmak amacıyla metanol kullanılabilmektedir (Zhang vd., 2003).

2.2.1.1. <u>Emülsifikasyondan mikrojel sentezi</u>

Bu yöntemde, su içerisinde bir öncü jel çözeltisi (yağ) ya da tuzlu su fazında yağ içinde su emülsiyonu oluşturur. Öncü jel monomer ya da polimer çözeltisi olabilir. İkinci jelleşme basamağında, emülsiyon damlalarının her biri kimyasal bir reaksiyon geçirir. Bu polimerizasyon türü "ters emülsiyon polimerizasyonu" ya da "miniemülsiyon polimerizasyonu" olarak adlandırılır (Landfester vd., 2000). Miniemülsiyon polimerizasyonunda sürekli faz içerisinde çok düşük çözünürlük gösteren bir çözünen madde sayesinde Ostwald olgunlaşması önlenmiş olur. Ostwald olgunlaşması, su içinde yağ emülsiyonlarında sıklıkla meydana gelmektedir. Bu sistemlerde yağ moleküllerinin sulu faz içerisinde difüze olması ve büyük yağ damlalarına katılarak stabilizasyonu engellemesi önemli bir konudur. Su içerisinde yağ emülsiyonunda, çözünen madde uzun zincirli hidrofobik bir alkan iken, yağ içinde su emülsiyonunda bu işlevi tuzlar sağlar.

Jelleşme sırasında oluşabilecek iki durum Şekil 2.5'de verildiği gibidir. Homojen jelleşme durumda, polimerizasyon çözeltisi ya da çapraz bağlanma reaksiyonu özellikle damlacığın dışında meydana gelir. İkinci olasılıkta ise polimerizasyon sırasında öncü jel emülsiyon damlacıklarının içerisinde çekirdeklenmeye sebep olur.



Şekil 2.5. Öncü jel emülsifikasyonu ile mikrojel oluşum mekanizmaları

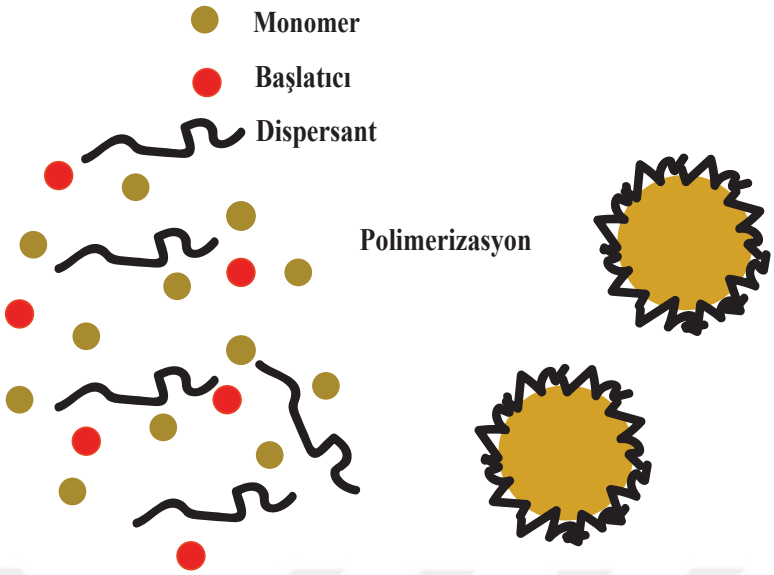
2.2.1.2. Çekirdek-kabuk mikrojellerin sentezi

Çekirdek-kabuk lateks partiküller, on yıllardır emülsiyon polimerizasyonu aracılığıyla elde edilebilmektedir. Çekirdeğin geleneksel emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilmesinin ardından ikinci bir aşama olarak çekirdek yüzeyi bir kabuk ile kaplanır. Çekirdek-kabuk partikülleri hazırlamak için pek çok yöntem vardır. Birinci basamakta homojen dağılımlı çekirdek elde etmek ve bu çekirdeğin topaklaşmasını önlemek oldukça önemlidir. İkinci aşamada ise polimer zincirleri oluşturulan çekirdek yüzeyine birikmelidir. Bu sistemde ortaya çıkan birinci sorun çekirdekleri birbiri ile etkileşimleri sonucu büyük çekirdek-kabuk latekslerin oluşmasıdır. Diğer bir sorun ise, elde edilen kabuğun çekirdekten daha hidrofobik bir kabuk ile çekirdek-kabuk lateks oluşturulmasıdır. Burada ara yüz enerjisini en aza indirecek, termodinamik açıdan güçlü bir itici güç oluşur. Kararlı yapıda olamayan çekirdek-kabuk latekslerin kararlılığını arttırmak için çapraz bağlayıcıya ya da camsı geçiş sıcaklığı T_g üzerinde çalışmak gerekmektedir. Çekirdek-kabuk yapılı mikrojellere son yıllarda ilgi oldukça artmıştır.

2.2.2. Dispersiyon polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu, mikron boyutunda partikül sentez yöntemleri için kullanılan polimerizasyon tekniklerinden biridir. Dispersiyon polimerizasyonunu, tepkime ortamında uygun polimerik stabilizör varlığında monomerin polimerizasyonu için kullanılan bir polimerizasyon tekniği olarak tanımlanabilir (Kawaguchi ve İto, 2005). Tepkime ortamı, olarak seçilecek çözücünün monomer ve sterik stabilizör için iyi bir çözücü olurken, oluşacak polimerik partikülü çözmemesi gerekmektedir. Uygun koşullar altında polimerizasyon sonucu oluşan, genelde 0,1-15 μm boyutunda partiküller monodispers dağılım gösterirler. Polimerleşebilen makromonomerler, reaktif olarak adlandırılabilirler. Bu sistemlerde stabilizör olarak bir polimer veya makromonomer kullanılabilir. Dispersant olarak kullanılan blok kopolimerlerin, bir bloğun çökelti polimerinin yüzeyi için afiniteye (uygunluk) sahip olması ya da polimerizasyon sırasında stabiliteyi sağlayabilecek çözünür bir bloğa sahip olması gerekmektedir. Bu çözünür dispersant polimer bir kıl tabakası oluşturarak polimerizasyon sırasında stabiliteyi sağlar.

Dispersiyon polimerizasyonu ilk kez 1975 yılında organik hidrokarbon ortamında gerçekleştirilmiştir (Barrett, 1975). Yapılan çalışmada akrilik ve vinilik monomerleri yağda çözünen polimer stabilizör ile hidrokarbon içerisinde polimerleştirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda polar çözücüler içerisinde dispersiyon polimerizasyonu yapılarak yöntem geliştirilmiştir (Almog vd., 1982). Genel olarak dispersiyon polimerizasyonunun mekanizması Şekil 2.6'da gösterildiği gibidir.



Şekil 2.6. Dispersiyon polimerizasyonunun temel mekanizması

Dispersiyon polimerizasyonunda en sık kullanılan monomerler stiren ve metakrilat bazlı monomerlerdir. Tepkime ortamı olarak ise yoğunlukla polar çözeltiler, genelde alkoller kullanılır.

Dispersiyon polimerizasyonunun ilgi çekici bir özelliği de canlı polimerizasyon gerçekleştirilebiliyor olmasıdır. Bu sayede kontrollü bir polimerizasyon sağlanarak dar molekül ağırlık dağılımına sahip partiküllerin sentezlenebilmektedir (Kawaguchi ve İto, 2005). Canlı dispersiyon polimerizasyonu kullanılarak stiren ya da α-metilstiren monomerilerinin anyonik polimerizasyonu farklı stabilizörler kullanılarak hidrokarbon tepkime ortamında gerçekleştirilmiştir (Kim vd.,1996; Awan vd., 1996).

Dispersiyon kopolimerizasyon yöntemi kullanılarak çekirdek-kabuk partikül sentezleri de başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Örnek olarak stiren ve vinil-benziltrimetil amonyum klorid (VBAC) monomerlerinin çekirdek-kabuk partikülleri verilebilir. Bahsi geçen bu çalışmada aromatik poli(amik asit) stabilizörü varlığında, etanol-su ortamında başarılı bir sentezlenmiştir (Watanabe, 2006).

2.2.3. Süspansiyon polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonunda, başlatıcı monomer içerisinde dağılır ve bu iki bileşen polimerizasyon ortamında çözünür değildir. Monomer fazın hacim oranı genelde polimerizasyon ortamının 0,1-0,5 olacak şekilde ayarlanır, fakat bu durum bazen daha büyük oranlara çıkabilir (Arshady, 1992). Terimsel olarak polimer partikülleri üretiminde süspansiyon polimerizasyonu emülsiyon polimerizasyonu yerine de kullanılmaktadır, fakat emülsiyon polimerizasyonunda üretilen lateks ya da kolloid partikül boyutu 1 μm boyutundan küçükken süspansiyon polimerizasyonunda partikül 1 μm boyutundan çok daha büyüktür. Süspansiyon polimerizasyonunda üretilen lateks ya da kolloidin partikül boyutunun üst limiti yaklaşık 1-2 mm ile sınırlandırılabilir. Çökelti polimerizasyonu kullanılarak sentezlenen partiküller ise makroskopik olarak görülebilecek büyüklüktedir.

2.2.4. Çökelti polimerizasyonu

Çökelti polimerizasyonunda başlangıç aşamasında tepkime karışımı dispersiyon polimerizasyonu ile aynıdır, yani karışım homojen vaziyettedir. Fakat çökelti polimerizasyonunda başlangıçta partiküller tepkime ortamında şişmiş vaziyette değildir ve polimerizasyon gerçekten çökelti polimerizasyonu olarak ilerler. Bu koşullar altında başlatıcı ve polimerizasyon büyük oranda homojen ortamdadır. Bu da sürekli çekirdeklenmeye ve dolayısıyla daha büyük partiküllerin oluşmasına yol açar. Bu sebep, çökelti polimerizasyonu düzensiz şekil ve boyutta polimer partiküllerinin oluşmasına sebep olur.

2.2.5. Partikül sentezinde kullanılan diğer yöntemler

2.2.5.1. <u>Düz polimer zincirlerinden mikrojellerin homojen çekirdeklenmesi</u>

Bu yöntemde düz polimer zincirlerinin hacim faz geçiş sıcaklığı (VPTT) noktası üzerinde ısıtılması ile elde edilen kolloidlerden bahsetmek mümkündür. Polimer zincirlerinden mikrojel elde edilmesine dair birkaç çalışma mevcuttur (Brasch ve Burchard,1996). Burada –OH gibi fonksiyonel gruplar üzerinden yapıya katılabilecek aldehit gibi bir grup kullanarak polimer zincirlerinin birbirine bağlanmasını sağlanmaktadır.

Bir başka yaklaşımda ise düz polimer zincirlerinin NaCl gibi bir elektrolit varlığında polimer zincirlerinin elektrostatik etkileşimle partikül oluşturulmuştur (Chan, 1999). Bir diğer yaklaşımda ise diblok kopolimerleri kullanılarak misel oluşturması ve ardından çapraz başlayıcı ilavesi ile mikrojel sentezlenmesi söz konusudur. Bu yöntem ile oldukça küçük çaplı mikrojellerin sentezi mümkündür. Örneğin Delaittre ve çalışma arkadaşlarının hazırladığı mikrojelde, poli akrilik asit-*b*-dietilakrilamit yaşayan radikalik polimerizasyonu sırasında ortama az miktarda çapraz bağlayıcı ilave edilmiş ve nanojeller sentezlenmiştir (Delaittre, 2007). Radikalik polimerizasyon ile hazırlanan sistemlerde, reaksiyon ortamı oksijenden arındırılmalıdır. Oksijen polimerizasyona katılarak polimerizasyonu yavaşlatabilir ya da sonlandırabilir. Bu sebeple reaksiyon sırasında azot gazı gibi inert bir gaz ile oksijen uzaklaştırılmalıdır.

2.2.5.2. Polimer kompleksleşmesi ile mikrojel oluşumu

Bu yöntem daha önce açıklanan mikrojel sentez yöntemlerinden tamamen farklı bir yöntemdir. Polielektrolit kompleksler, karşıt yüklü polielektrolitlerin seyreltilmiş karışımlarından oluşur. Polikatyonlar ve polianyonlar arasında güçlü bir elektrostatik etkileşim meydana gelir (Raymond ve Sadek, 1949). Bu sayede polimer ağı güçlü bir stabiliteye sahip olur. Kolloidal olarak stabil mikrojeller elde edebilmek için, elektrostatik olarak stabil olan yüklü mikrojeli oluşturan bileşenlerden birinin fazla olması gerekmektedir. Polielektrolit kompleks oluşumu sırasında polianyon aşırı kullanılırsa anyonik mikrojeller, polikatyon fazla kullanılırsa katyonik mikrojeller elde edilir.

Doğalında iyonik olan bu mikrojeller polielektrolit zincirlerin çapraz bağlanması ile elde edilirler (Benitez vd., 2015). Polielektrolitler de asit baz çiftleri gibi zayıf ya da güçlü olabilir. Poli(diallildimetilamonyum klorid) güçlü katyon, poli(sodyum stiren sülfonat) güçlü anyon özellik gösteren polielektrolitlerdir. Güçlü polielektrolitler reaksiyon sırasında moleküller arasında ekstra çapraz bağlanmaya sebep olduklarından dolayı mikrojel sentezinde kullanımları sınırlıdır. Polielektrolit mikrojeller kimi çevresel koşul değişimlerinde hacimsel faz geçişi gösterebilirler (Rumyantsev vd., 2014). Mikrojele iyonik özellik kazandıran polielektrolit zincirler sentetik ya da doğal homopolimer veya kopolimer olabilirler. Literatürde en sık karılaşan katyonik özelliğine sahip sentetik polielektrolitere örnekler poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAM) (Romeo vd., 2010), poli[2-(dietilamino)etil

metakrilat] (PDEA) (Amalvy vd., 2004), poli[2-(N-morfolino)etil metakrilat] P(MEMA) (Butun vd., 2011) şeklinde sıralanabilir. Yine bir diğer iyonik polielektrolit türü olan anyonik polimerlerin kullanımı ile de anyonik özelliğe sahip mikrojellerin sentezi söz konusu olabilmektedir. Anyonik polielektrolitlere örnek olarak, poli(akrilik asit) (PAA) (Iglesias vd., 2003), poly(metakrilik asit) (PMAA) (Wong vd., 2009) gibi asit içerikli polielektrolitler verilebilir. Polielektrolitler ile sentezlenen mikrojellerde, mikrojelin toplam yükünü belirleyen en önemli parametre sistemi oluşturan polielektrolitlerin güçlü asit, güçlü baz, zayıf asit, zayıf baz yapısıdır. Genel olarak zayıf polielektrolitler poli(L-lisin)/poli(L-glutamik asit)/ poli(allilamin hidroklorid) şeklinde sıralanabilir. Zayıf polielektrolit içeren sistemler polikatyon sonlu ise doğal mikrojellerden daha az şişme gösterirken daha fazla sıcaklık duyarlılığı sergiler, polianyon sonlu mikrojeller ise doğal mikrojellerden daha fazla şişme gösterirken daha az sıcaklık duyarlı sistemlerin oluşmasına sebep olur (Costa vd., 2012).

2.3. Mikrojeller

Bir mikrojel, jel partiküllerinin kolloidal dispersiyonu olarak da tanımlanabilir. Bu tanımlamanın üç genel özelliği vardır.

1) Mikrojel partikül boyutu 10-1000 nm arasında değişen kolloidlerin bir türüdür.
2) Mikrojeller bir çözücü içinde dağıtılabilirlerdir.
3) Mikrojeller çözücü aracılığıyla şişebilirlerdir.

Mikrojeller, kolloidal çözeltilerde çapraz bağlanma derecesine, iyonik/non-iyonik ya da hidrofilik/hidrofobik doğalarına bağlı az ya da çok şişmiş halde bulunabilmektedirler. Ayrıca molekül içi çapraz bağ içeren makromoleküller olduklarından, bu maddelerin sentezi sırasında büyüyen çapraz bağlı parçacıkların boyut kontrolünün sağlanması gerekmektedir. Bu sistemlerin büyüklük ve şeklini etkileyen başlıca etkenleri reaksiyon süresi, sıcaklık, basınç, sistem bileşenleri ve çevre moleküllerin doğası şeklinde sıralanabilir. Moleküllerin sterik özelliklerini etkileyen bu değişkenler sayesinde oluşacak sistemin şekilsel özelliklerini tahmin etmek mümkün hale gelmiştir.

Yukarıda bahsi geçen üç temel kriter, sürfaktant (yüzey aktif madde), stabilizörler, emülsifiyerler ve polimerik miseller için de geçerli tanımlardır, fakat bu türler mikrojel olarak adlandırılamaz. Mikrojeller dengeli bir yapıya sahipken, sürfaktantlar ve miseller bulundukları ortamda birbirleri arasında hızlı bir şekilde yer değiştirirler ve bu nedenle sınırlı bir yaşam süresine sahiptirler. Diğer bir istisnai durum ise, uzun hidrofobik bloklar içeren blok kopolimer misellerin sudaki davranışlarıdır. Bu miseller hidrofobik bloklar sayesinde uzun süreli yaşam ömrüne sahip olabilirler, fakat hidrofobik çekirdeğin su ile şişmesi sınırlıdır. Bu sebeple miseller mikrojellerden çok lateks yapılara daha benzerdir. Bu sebeplerden dolayı mikrojellerin tanımlanmasında dördüncü bir özelliğe gerek duyulur.

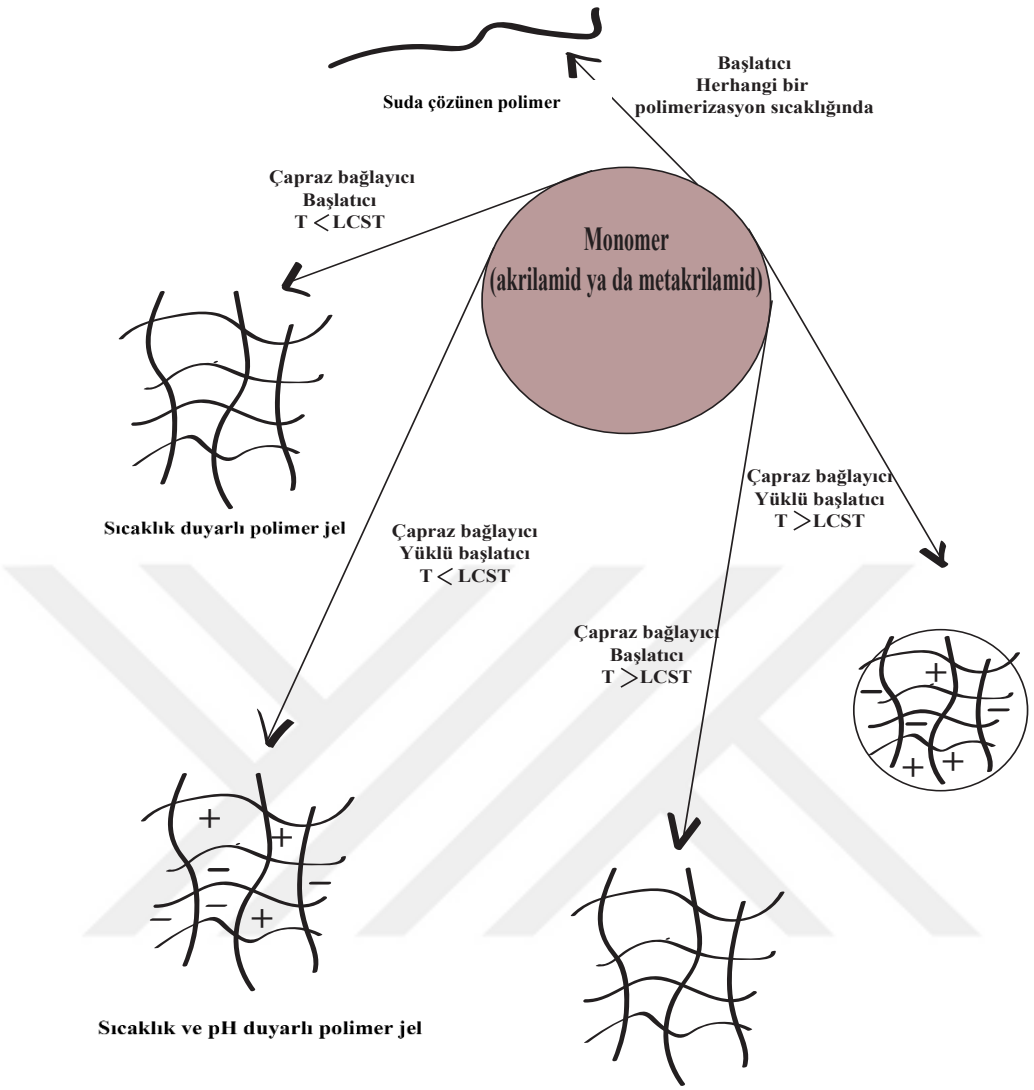
4) Mikrojeller stabil yapılardır. Polimer ağları kovalent ve güçlü fiziksel etkileri sayesinde stabil kalır. Öte yandan, herhangi bir kolloidal dispersiyon gibi mikrojel partikülleri agrege (topaklanma) olabilir. Agregasyon ile ilgili ayrıntılı bilgi aşağıda verilmiştir.

2.3.1. Mikrojel sentez yöntemleri

Mikrojel sentezinde genel amaç, kontrollü partikül boyut dağılımının, kolloidin stabilizasyonu ve yüklü gruplar, çapraz bağlayıcı gibi özel fonksiyonel grupların dağılımının sağlanmasıdır.

Mikrojel hazırlanmasında başlıca üç yöntemden söz etmek mümkündür:

1) Monomer kullanılarak mikrojel sentezi: Bu yöntem en sık kullanılan yöntemdir. Anyonik, katyonik ya da iyonik olmayan tek fonksiyonlu monomerler kullanılan monomer türleridir. Bu sistemlerde çapraz bağlayıcı olarak iki fonksiyonlu grup içeren monomerler kullanılabilmektedir. Radikal polimerizasyonu ile sentezlenen sistemlerin içeriğine göre oluşacak olan polimerizasyon genel olarak aşağıdaki Şekil 2.7'de verilmiştir.
2) Polimer kullanılarak mikrojel sentezi: Sulu polimer çözeltilerinin kimyasal olarak çapraz bağlanması ya da yağ içinde emülsiyon oluşturulması ile elde edilebilirler.
3) Mikrojeller kullanılarak mikrojel oluşturulması: Bir mikrojelin mekanik olarak öğütülmesi sayesinde mikrojel oluşturulmasını içermektedir.



Şekil 2.7. Polimerik malzemelerin genel olarak sentez yöntemi

Mikrojellerin partikül üretim yöntemine göre homojen çekirdeklenme, emülsifikasyon ya da kompleksleşme şeklinde sıralanabilir. Homojen çekirdeklenme mikrojel oluşturma yönteminde çapraz bağlayıcı içeren monomer çözeltisi bir reaktör içerisinde polimerleştirilir. Mikrojel partiküllerinin birleşmesini önlemek için genel kural polimerizasyondan sonra oluşan yapının çözücü içerisinde çözünmeden kalmasıdır. Eğer oluşan polimer çözücü içerisinde çözünürse bu oluşan yapı mikrojel oluşturur.

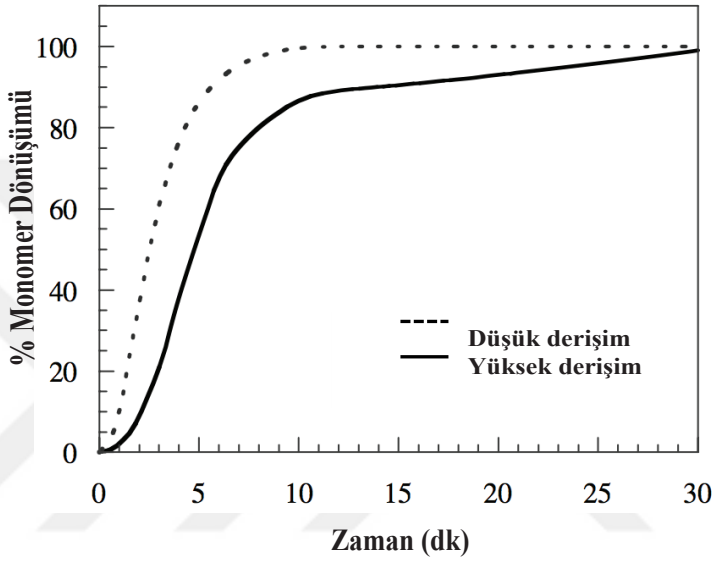
2.3.2. Polimerizasyon reaksiyonunun kinetiği

Bir polimerizasyon reaksiyonunda partikülün oluşumu çekirdeklenme oluşumu, büyüme dönemi ve oluşan kolloidin stabilizasyonu sırasındaki durumlardan önemli derecede etkilenir. Herhangi bir polimerizasyon tepkimesinin oluşumu için, başlatıcının bozunması ve tepkimenin başlaması için sistemin enerjiye ihtiyacı vardır. Radikal dispersiyon polimerizasyonu için genel olarak akrilamid ya da metakrilamid türevi monomerler kullanılabilir. Partikül oluşum tepkimelerinde yüksek aktiviteye sahip bileşenler kullanıldığından polimerizasyon çok hızlı meydana gelir. Polimerizasyonda kullanılan çapraz bağlayıcının aktivitesi genel olarak monomerlerin aktivitesinden daha yüksektir. Polimerizasyon tepkimesi 30 dakika gibi kısa bir süre içerisinde gerçekleşebilir. Eğer tepkime ortamına inhibitör (yavaşlatıcı) ilave edilmez ise çekirdek oluşum süresi bir dakika gibi kısa bir süre olacaktır. Bu kadar hızlı gerçekleşen bir tepkimenin kinetiğinin takibi oldukça zordur (Elaissari ve Mahdivian, 2011). Mikrojel oluşum kinetiği poly(*N*-isopropilakrilamid) (NIPAM) mikrojel oluşum üzerine yapılan çalışmada verilmiştir (Wu vd., 1994). Yapılan çalışmada iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen polimerizasyon hızı farklılık göstermiştir.

Suda çözünen monomerlerin dispersiyon polimerizasyonunda, sentezlenen mikrojel partiküller genelde mikron altında boyutlara sahiptir ve dar bir boyut dağılımı sergiler. Bu kullanılan bileşenlerin yüksek aktivitelerinin ve çekirdeklenme basamağının kısa sürede olmasından kaynaklanıyor olabilir. Mikrojel boyutunda kullanılan başlatıcı ve çapraz bağlayıcı derişiminin etkinliği ve sıcaklığın mikrojel boyutu üzerine etkin olduğu da yapılan çalışmalar sonucu ortaya konulmuştur (Duracher vd., 1999). Mikrojel partikül boyut değişimi zamanla taramalı elektron mikroskop (SEM) ve ışık saçılım yöntemi ile ölçülmüştür. Zamanla mikrojel boyutu değişiminde SEM ve ışık saçılım ölçümleri sonuçlarının birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. İki ölçüm sistemi arasında gözlenen fark, SEM ölçümlerinde kuru mikrojel partiküllerinin, ışık saçılımında şişmiş halde bulunan mikrojel dispersiyonlarının kullanılmasından kaynaklanmaktadır.

2.3.2.1. Başlatıcıların etkisi

Başlatıcıların kullanımı partikül sentezinde kullanılan radikal polimerizasyonunda en önemli parametredir. Başlatıcıların kinetik üzerine etkisi ile ilgili oldukça fazla çalışma mevcuttur (D. Duracher 1999). Başlatıcının monomer dönüşümü üzerine kinetik etkisi Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8. İki farklı başlatıcı derişiminde monomerin zamanla polimerizasyonu, PNIPAM partikül oluşumu, 70 °C

Polimerizasyon sırasında başlatıcının bozunması nedeniyle zamanla konsantrasyon değişir. Aynı zamanda tepkime sıcaklığı da başlatıcının bozunma hızını etkiler, sonuç olarak ortamda radikallerin derişimi artar. Bu sebeple polimerizasyon tepkime sıcaklığı sonuç molekülün ağırlığını ve dağılımını etkiler.

Emülsiyon polimerizasyonunda sıkça kullanılanlar başlatıcılara örnek olarak 2,2'-azobisizobütironitril (AIBN), 4,4′-azobis(4-siyanovalerik asit) (ACVA), potasyum persülfat (KPS), amonyum persülfat (APS), benzoil peroksit, ter-bütil peroksit verilebilir.

2.3.2.2. Çapraz bağlayıcının etkisi

Partikül üretiminde önemli bir diğer bileşen ise çapraz bağlayıcıdır. Çapraz bağlayıcılar polimer zincirlerini kimyasal olarak birbirlerine bağlarlar. Çapraz bağlayıcının

seçimi hem partikül oluşumunu hem de sonuçta oluşan partikülü etkilemektedir. Çapraz bağlayıcılar monomer ile karşılaştırıldığında daha yüksek aktiviteye sahip olduklarından dolayı, çapraz bağlayıcı oranında yapılacak küçük miktarda değişimler dahi polimerizasyon oranını etkiler. NIPAM partiküllerinin polimerizasyonunun metilen-bis-akrilamid (MBA) çapraz bağlayıcı kullanımı ile gerçekleştirilen çalışmada, çapraz bağlayıcı derişiminin polimerizasyon üzerine etkisi incelenmiştir (Elaïssari, 2006). Çalışmanın sonucuna göre genel olarak, MBA miktarındaki artış mikrojelin hidrodinamik boyutunu arttırmıştır. Ayrıca MBA miktarındaki artış ile birlikte çapraz bağlanma oranı artacağından dolayı sonuç ürünü olan partikülün şişme oranı ve esnekliği azalmıştır.

Çapraz bağlayıcılara örnek olarak, jelatin partiküllerinin sentezinde kullanılan dextran molekülü (Schacht, 1993), divinilazobenzen, etilenglikol dimetakrilat (EGDMA), bozunabilir 2,2'-dimetakriloiloksietil disülfit (DSDMA), glisidil metakrilat (GMA) gibi iki fonksiyon içeren monomerler verilebilir.

2.3.3. Mikrojellerin yapısal özellikleri

Mikrojel partiküllerinde, dispersiyon ortamında partikül ve molekül arasında çarpışma hareketleri meydana gelir. Bu çarpışmalar (Brownian hareketleri) aynı zamanda partikülün stabilizasyonunu kolaylaştıran bir etkidir (Myers, 1999). Çok fazla şişmiş yapıda bulanan mikrojel süspansiyonlar, daha az şişmiş mikrojellerden daha fazla ışığı geçirebilir. Aşırı şişmiş bir mikrojel süspansiyonu saydama yakın bir görünümde iken daha az şişmiş mikrojel süspansiyonu süt gibi görünen bir yapıdadır. Genel olarak mikrojeller şişmiş halde van der Waals etkinin azalmasından ve partikül yüzeyinde bulunan grupların sterik engellerinden dolayı daha stabil (kararlı) haldedir .

2.3.4. Mikrojel emülsiyon kararlılığının tanımı

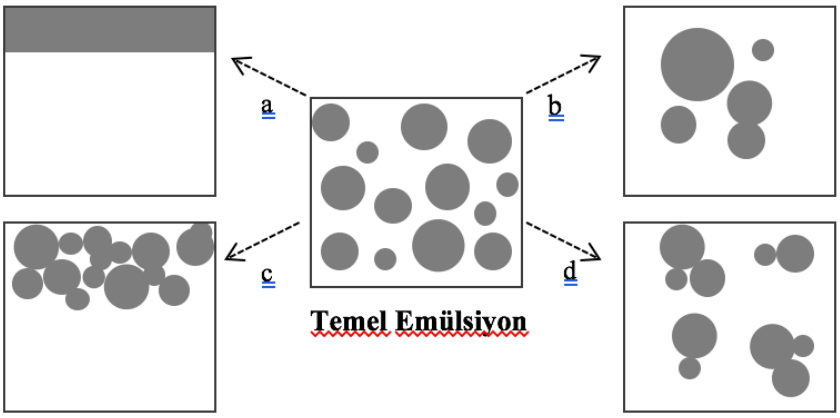
Emülsiyon kararlılığı tartışılırken sistemin fiziksel durumunu açıklamak önemli bir süreçtir. Emülsiyon bilim ve teknolojisinde sıkça karşılaşılan dört terim şu şekilde sıralanabilir; ayrılma (breaking), birleşme (coalescence), kremleşme (creaming) ve topaklanma (flocculation). Bu terimler sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılabilecek terimlerdir. Fakat anlam bakımından birbirlerinden oldukça farklıdırlar.

Ayrılma; emülsiyonda iki fazın net bir şekilde birbirinden ayrılması anlamına gelen bir ifadedir. Bu süreçte damlacıkların bir araya gelmesi mikroskopik ölçekten makroskopik ölçeğe taşınması söz konusudur. Böyle bir durumda emülsiyon damlacığı için tanımlanan fiziksel ve kimyasal özelliklerden bahsetmek oldukça zordur. Ayrılmaya uğramış sistemlerde emülsiyonun kararlılığından bahsedilemez.

Birleşme; iki veya daha fazla damlacığın birleşmesi ile oluşan bu durumda, büyük hacimde damla oluşumu meydana gelir iken yüzey alanında azalma söz konusudur. Bu durumda yüzey gerginliği düşeceği için sistem enerji açısından daha kararlı hale gelir. Birleşmede damlacıklar arasında kaynaşma mikroskopik boyutta oluşur.

Kremleşme; damlacıkların özelliklerinin kaybolmadığı fakat yoğun topaklanmanın olduğu bir süreçtir. Kremleşme süreci yoğunluk farkı bulunan ikili sistemlerin hemen hemen hepsinde gözlemlenebilir. Kremleşmenin oluşum hızı, sistemin fiziksel özelliklerine ve dağıtıcı fazın viskozitesine bağlıdır. Kremleşme süreci tersinir bir süreçtir ve tekrar dağılma işlemi oldukça düşük enerji ile sağlanabilir. Dağıtıcı fazın yoğunluğu her iki fazın yoğunluğundan daha fazla olursa çökelme (sedimantasyon) meydana gelir.

Topaklanma; flokulasyon da denilen bu sistemde bir arada bulunan damlacıklar karşılıklı olarak birbirlerinden etkilenirler fakat fiziksel özellikleri değişmez. Bu sürecin birleşme ile farkı damlacıkların yakın ama iç içe olmamasıdır, yüzey olanı bu sistemlerde büyüktür. Topaklanma ya da diğer adıyla flokulasyonun geri döndürülmesi için çok daha az enerji gereklidir.



Şekil 2.9. Emülsiyon sistemlerin fiziksel durumları, ayrılma (a), birleşme (b), kremleşme (c), topaklanma (d)

Yukarıdaki Şekil 2.9'da tanımlanan dört yapı için bilinmesi gereken en temel nokta, flokulasyon ve kremleşmede damlacıklar birbirlerine sadece dokunurlar, birleşme olmaz. Bu sistemler arasında en kararsız yapı ayrılma olarak isimlendirilen sistemdir.

2.3.4.1. Çözücünün mikrojel kararlılığına etkisi

Tipik olarak mikrojel dispersiyonlarının içeriği %10 ile %90 arasında su içerir. Bu sebeple, yukarıda bahsedilen kararlılık mekanizmasından, stabilizör, kolloid ve çözücü sisteminde, çözücünün önemli bir rol oynadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Çözücü stabilizör oluşumunda kullanılan monomeri çözerse, polimer kolloid yüzeyine daha az adsorbe olacak ve bu parçacığın kararlılığını etkileyecektir. Bunun tersinden, çözücü polimer zincirini daha az çözen bir çözücü ile değiştirilirse, koruyucu tabakanın kalınlığı, polimerin parçacık yüzeyinde daha fazla birikmesine sebep olacaktır. Bu da topaklanmaya (flokülasyon) karşı kararlılığı azaltacaktır. Yüksek oranda çözücü içeren ve şişen jel süspansiyonları neredeyse transparan iken, az oranda şişmiş jel süspansiyonları ise geleneksel lateks dispersiyonları gibi süt beyazı renktedir.

2.3.4.2. Polimerik stabilizörlerin mekanik olarak kararlılığa etkisi

Daha önceki bölümde tartışıldığı üzere katkı maddeleri basit inorganik elektrolitler, ince bölünmüş, çözünmeyen katı parçacıklar, bir veya iki fazda da çözünen yüzey aktif

madde çözeltileri sistemin ara yüzey özelliklerini önemli derecede değiştirirler (D.Myers 1999). Uygulama sırasında, bu katkı maddelerinden bir ya da daha fazlasını kullanmanın daha kararlı emülsiyonlar üretmek için kullanıldığı bilinmektedir.

Doğal emülsiyon sistemlerinde ya da teknolojik emülsiyon sistemlerinde polimerik emülgatör ya da stabilizörlerin kullanımı sistemin kararlılığı için oldukça önemli rol oynar. Kimyasal bileşimi doğru seçerek, polimerlerin dağıtıcı faz ve dağılan faz ara yüzeyine kuvvetli bir şekilde adsorbe olması sağlanabilir. Polimerik malzemeler ara yüzey gerilimini azaltabilir, elektrostatik ya da sterik etki ile iki faz arasında bariyer oluşturabilirler. Ayrıca, çözünebilirlik özellikleri adsorbe olan katmanın kalınlığını ve ara yüzeyin viskositesini de arttırabilir. Sistemin viskozitesinin artması emülsiyonun kinetik kararlılığı için önemlidir.

Polimerik malzemelerin etkinliği ara yüzey gerilimini düşürme konusunda sınırlıdır. Polimerik malzemelerin emülsiyon sistemi için önemli etkisi, damlacıkların birleşmesini ve kaynaşmasını engelleyen mekanik ve termodinamik bir bariyer oluşturmasıdır. Polimerik malzemenin doğası gereği, molekül ara yüz üzerindeki birçok noktadan adsorbe olabilir, bu sayede malzemenin desorbsiyonun azalması ile sistem daha uzun süre karalı kalabilir. Sistemde polimerik malzemenin varlığı, dağıtıcı fazın viskozitesinin arttırarak kremleşme gibi süreçlerin oluşmasını geciktirir (Myers, 1999).

2.3.4.3. <u>Kullanılan polimerik yüzey aktif maddenin etkisi</u>

Yüzey aktif maddeler kullanılarak sentezlenen mikrojellerin şekil ve büyüklüklerini etkileyen önemli bir parametrede kullanılan yüzey aktif maddenin kendi kendine oluşturduğu ve polimerizasyonun gerçekleştiği damlacığın yapısal özellikleridir. Yüzey aktif madde su veya apolar ortamla etkileşim içerisindedir. Bu etkileşim yüzey aktif madde/su ve yüzey aktif madde/apolar çözücü etkileşimlerinin gücüne bağlıdır ve hidrofil-lipofil dengesi (HLB) olarak adlandırılır. HBL özelliği yüzey aktif maddeleri *hidrofilik* (su içinde iyi çözünen, misel oluşturmaya elverişli), *lipofilik* (tercihen apolar çözücüde çözünebilen, ters misel oluşturmaya elverişli), *amfifilik* (suda ve apolar çözücülerde çözünebilen, direkt ya da ters vezikül oluşturmaya elverişli) özelliğe sahip olabilirler.

Yüzey aktif maddenin polar ya da apolar olması, hidrojen bağı kabiliyeti, moleküler olarak aktif grup bağlayabilirliği, şekli, büyüklüğü gibi moleküler özellikleri ve deneysel koşulların etkisi oluşacak yapıyı belirleyebilir. Yüzey aktif maddenin kendiliğinden oluşturabileceği şekiller sıvı kristal, tek ve çok tabakalı yapılar, misel ya da ters misel, yağ içinde su ve su içinde mikro emülsiyon ve direkt ve geriye dönük veziküller (keseler) şeklinde sıralanabilir. Bu yapılardan birinin diğerlerine dönüşümleri prensip olarak bazı dış etkenleri değiştirerek mümkündür. Yapısal değişikler viskozite, iletkenlik, geçirgenlik, çözünürlük gibi ani fiziksel değişikliklerin ortaya çıkması ile olur. Sudaki hidrofilik yüzey aktif maddelerin miktara bağlı yapısal değişimlerine ait bilgi Çizelge 2.1'de verildiği gibidir.

Çizelge 2.1. Sudaki hidrofilik yüzey aktif maddelerin miktara bağlı yapısal değişimi

Sudaki yüzey aktif madde konsantrasyonu →				
Yüzey aktif madde moleküler olarak çözücüde dağılmış vaziyette	Küresel misel oluşum gözlenir	Silindirik misel oluşumu gözlenir	Miseller arası etkileşimin artması-ağ yapı oluşumu	Sıvı kristal faz oluşumu gözlenir

2.3.5. Mikrojel sentezinde kullanılan stabilizörlerin sınıflandırılması

Emülsiyon için stabilizörler iyonik maddeler, kolloidal katılar, polimerler ve yüzey aktif maddeler olarak dört temel başlık altında sıralanabilir,

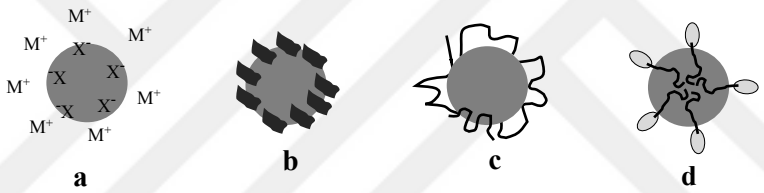
İyonik maddeler: İyonik maddeler, parçacığın yüzeyine adsorbe olan yüklü moleküllerdir. Bu iyonlar ara yüzey gerilimini çok az etkiler. Bununla birlikte, uygun koşullar altında yaklaşan damlalar arasında elektrostatik bir bariyer oluşturarak kararlılığa yardımcı olabilirler. Ayrıca çözücü moleküllerini ile ara yüzeyde etkileşerek dielektrik sabit, viskozite ve yoğunluk gibi fiziksel özellikleri (solvasyon etkisi) etkileyerek kararlılığı etkileyebilirler.

Küçük kolloid malzemeler: Bu malzemeler, yüzey gerginliğini doğrudan etkilemese de damlacıklar arasında bir bariyer oluşturarak kaynaşmayı geciktirir veya önler. Kolloid malzemelerin etkisi, parçacık boyutu, katı yüzey ve sistemin oluşturduğu iki faz arasındaki

etkileşimlere bağlıdır. Genel olarak küçük kolloid iki sıvı faz arasında kısmen ıslanmalı, ancak dağıtıcı fazı daha çok tercih etmelidir.

Polimerik katkı maddeleri: Bu tür katkılar, emülsiyon oluşumunda yüzey aktif özelliklerinden dolayı önemli bir yer kaplarlar. Etkileri, sterik veya elektrostatik etkileşimlerden, ara yüzey viskozitesi veya elastiklikten ya da sistemin hacimsel viskozitesinden kaynaklanabilir. Bazı sistemlerde bu etkileşimler aynı anda görülebilirler.

Monomerik yüzey aktif maddeler: Bu tür maddeler, ara yüzey gerilimini azaltarak sisteme kararlılık sağlarlar. Kullanılan yüzey aktif maddenin türü ve miktarı emülsiyonun kullanım koşulları, emülsiyon türü ve sıvı fazların özellikleri kullanılarak belirlenmelidir. Şekil 2.10'da emülsiyon kararlılığı ile ilgili 4 mekanizma verilmiştir.



Şekil 2.10. Emülsiyon kararlılığı için başlıca dört mekanizma, iyonlar ve yüzey aktif olmayan tuzlar (a), kolloidal parçacıklar (b), polimerler (c), yüzey aktif malzemeler (d)

2.3.6. Emülsiyon polimerizasyonunda kullanılan polimerik sürfaktantlar

Partikül sentezinde kullanılan sürfaktantların sınıflandırılmasında yapının kimyasal özellikleri kullanılabilir. Emülsiyon hazırlanmasında kullanılan sürfaktantlar molekülerinin uzatılmış halde konformasyonları ve kutuplaşabilen hidrofobik yapıları ve hidrofilik kısımları mevcuttur. Hidrofobik kısım bir veya daha fazla uzun ve esnek hidrokarbon ya da florocarbon zincirlerden oluşurken, hidrofilik kısım genel olarak tüm molekülden daha küçük ve bir bölgede yoğunlaşabilen ve polar ya da iyonik baş gruptan oluşur. Alkan zincirine bağlı olan baş grubun doğasına bağlı olarak sürfaktantlar iyonik (katyonik ya da anyonik), iyonik olmayan (polar) veya zwitteriyonik (hem pozitif hem de negatif yüklü grup içeren) şeklinde tanımlanabilir.

1) İyonik sürfaktantlar: Katyonik sürfaktantlara bir örnek olarak hekzadesiltrimetilamonyum klorit (CTAC) verilebilir. Uzun alkil zincirinin baş grubunda –

$N^+(CH_3)_3Cl^-$ bulunur. Anyonik sürfaktantlara örnek olarak ise sodyum dodesil sülfat (SDS) ya da sodyum bis(2-etilheksil) sülfosüksünat (AOT) verilebilir. SDS yapısında uzun alkil zincirlerinin baş kısmında $–OSO_3^-Na^+$ grubu bulunur.

2) İyonik olmayan sürfaktantlar: Bu tür sürfaktantların yapısında hidrofilik özellik taşıyan yüklü grup bulunmamasına rağmen sudaki çözünürlüğü sağlayan polioksietilen – OCH_2CH_2O–şeker gibi yüksek derecede polar gruplardır.

3) Amfoterik ve zwitteriyonik sürfaktantlar: Bu moleküller temel zincir üzerinde pozitif ve negatif yüklü gruplar bulundururlar. Sülfobetainler $RN^+(CH_3)_2CH_2CH_2SO_3^-$ içeren moleküller zwitteriyonik sürfaktantlara örnek olarak verilebilir.

Emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen mikrojellerin stabilizasyonunu sağlamak amacı ile proteinler, selüloz ya da onların türevleri de kullanılabilir. Ayrıca sentetik polimerler de emülsiyon polimerizasyonu stabilizasyonu için kullanılmaktadır. Amfifilik dallı ya da blok kopolimerler, kolloidal dispersiyonların stabilizasyonu ve partikül boyutunun kontrolü için yaygın olarak kullanılmaktadırlar. En sık kullanılan sürfaktantlar partikül yüzeyine fiziksel olarak adsorbe olabilen ve sulu faz ile dinamik bir kararlılık oluşturanlardır.

2.4. Yüzey aktif madde sentezinde kullanılan polimerizasyon teknikleri

Sentetik polimerizasyon kimyası ile hazırlanabilecek polimerlerin bir sınırı yoktur. Polimer sentezinde genel olarak tekil moleküller iki veya daha fazla bağ ile birbirlerine bağlanarak makromolekül olan polimeri oluşturur. Genel olarak polimer sentezi ikiye ayırılabilir. Basamaklı polimerizasyon, kondensasyon polimerizasyonu ve katılma polimerizasyonu, zincir polimerizasyonu olarak da adlandırılabilir.

Katılma polimerizasyonu da ayrıca kendi içerisinde radikalik zincir polimerizasyonu ve iyonik polimerizasyon olarak da ikiye ayrılabilir. İyonik polimerizasyon da yine kendi içerisinde zincir büyümesinin gerçekleştiği aktif gruba bağlı olarak anyonik zincir polimerizasyonu ve katyonik zincir polimerizasyonu dallarına ayırılabilir (Sacak, 1998).

2.4.1. Basamaklı polimerizasyon (kondensasyon polimerizasyonu)

Basamaklı polimerizasyon yüksek sıcaklık ve yüksek basınç gibi ekstra koşullara gereksinim duyar. Polimerizasyon HO-R-COOH gibi bir hidroksi asitten poliester oluşumu şeklinde ilerler. Polimerizasyon dimer oluşumu, trimer oluşumu şeklinde ilerlemesi nedeniyle tepkime sırasında molekül ağırlığı sürekli artar, tepkime sonlarına doğru yüksek değerlere ulaşır. Basamaklı polimerizasyonda polimer büyüklüğü (p) 2.3'de verilen carothers eşitliği ile hesaplanabilir.

$$p = \frac{\text{tepkimeye giren fonksiyonel grup sayısı}}{\text{başlangıçtaki fonksiyonel grup sayısı}} \qquad \text{(Denklem 2.3)}$$

Polimerizasyon başlangıcında N_0 sayısında bulunan fonksiyonel grup t zamanında azalır ve ortamda N sayısında fonksiyonel grup kalır. Böylece polimerizasyon büyüklüğüne aşağıdaki Denklem 2.4'den ulaşılabilir.

$$p = \frac{No - N}{No} \qquad \text{(Denklem 2.4)}$$

Polimerizasyon derecesi (DP) ise Denklem 2.5'de verildiği üzere başlangıçtaki fonksiyonel grup sayısının tepkimeye girmeyen fonksiyonel grup sayısına oranı şeklinde ifade edilir. Carothers eşitliği polimerizasyon derecesi için düzenlenebilir.

$$DP = \frac{1}{(1-p)} \qquad \text{(Denklem 2.5)}$$

2.4.2. Katılma polimerizasyonu (zincir polimerizasyonu)

Katılma polimerizasyonunda monomer olarak doymamış yapıda bulunan vinil bileşikleri kullanılır. Monomer yapısında bulunan π-bağları sayesinde, polimerleşme radikalik ya da iyonik başlatıcıları kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Radikalik katılma polimerizasyonu: Bu polimerizasyon yönteminde, organik azo bileşikleri ve peroksitler yaygın olarak kullanılır. Isı etkisi, UV ışınları, elektroliz ya da redoks tepkimeleri ile oluşan radikal başlatıcıların oluşmasını sağlar. Başlama

basamağından sonra, aktif radikal merkezine monomerin katılması ile büyüme gerçekleşir. Büyüyen polimer zincirleri birbiri ile birleşebilirler ya da ortamda bulunan diğer polimer zincirinden hidrojen aktarılması ile sonlanabilirler.

İyonik katılma polimerizasyonu: İyonik katılma polimerizasyonu karbonyum ve karbanyon iyonlarının oluşumu üzerinden ilerler.

Katyonik polimerizasyonunda başlatıcı olarak $AlCl_3$, BF_3, BCl_3 gibi Lewis asitleri ya da HCl, H_2SO_4 gibi kuvvetli protonik asitler kullanılabilir. Başlatıcının aktifleşmesinden sonra monomerin zincire art arda katılması ile zincir büyümesi gerçekleşir. Polimerizasyon hızı iyon, çözücü, monomer türüne ve sıcaklığa bağlıdır. Katyonik polimerizasyonda sonlanma zincir ucundaki iyonun ayrılması ile ya da aktifliğin monomere transferi ile olabilir.

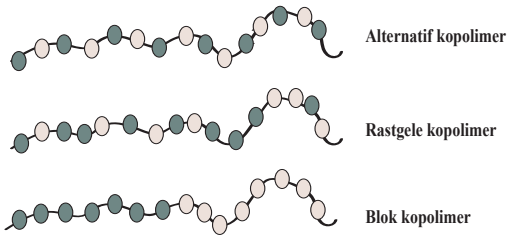
Anyonik polimerizasyonda başlatıcı olarak KNH_2, alkali metaller, n-bütil lityum gibi n-alkil lityum bileşikleri ya da grignard bileşikleri kullanılabilir. Büyüme radikalik ya da katyonik polimerizasyonda olduğu gibi aktif merkeze monomerlerin art arda katılması ile ilerler. Büyüme ortamda bulunan monomerin tamamen tükenene kadar devam eder. Ortamda H_2O, alkol, CO_2, O_2 gibi maddelerin varlığı sonlanmaya neden olur.

Yukarıda bahsedilen polimerizasyon teknikleri kullanılarak iki farklı bileşen ile oluşturulabilecek polimerler genel olarak üç başlıkta Şekil 2.11'de gösterildiği gibi özetlenebilir.

1) Alternatif kopolimer; iki bileşenin polimer zincirine art arda katılması ile sentezlenir.

2) Rastgele kopolimer; iki bileşiğin polimer zincirine rastgele katılmasıyla elde edilen kopolimerlerdir.

3) Blok kopolimer; bu polimerizasyon tekniğinde ise bileşenlerden biri polimerleştirilir ardından diğer bileşen tepkime ortamına ilave edilir ve blok polimer elde edilir.



Şekil 2.11. Kopolimer türleri

Polimer sentezinin ilgi çekici yanı, farklı oranda monomerler kullanılarak kullanım alanına uygun olarak dizayn edilebiliyor olmalarıdır. Ayrıca kontrollü polimer sistemlerinin geliştirilmiş olması sayesinde, polimer zincirlerinin kütleleri hedeflenen şekilde ayarlanabilmektedir. Kontrollü polimerizasyon ile polimerin bileşiminin yanı sıra fiziksel özellikleri de kontrol altına alınabilmektedir. Polimerler bu özelliklerinin yanı sıra tasarımları ile de dikkat çekmektedir. Yine kullanım amaçlarına göre doğrusal (lineer), dallı, fırça şeklinde ya da dentrimer olarak hazırlanabilirler.

Her ne kadar sentetik polimerlerin kütleleri kontrol edilebilse de polimer zincirleri tek tek incelendiğinde birbirlerinden farklı oldukları belirlenmiştir. Bu farklılık ise "polidispersite" tanımını ortaya çıkartmıştır. Polimer zincirlerinin birbiri ile aynı olduğu yapılar doğal polimerlerdir. Doğal polimerler %100 aynı boyda (monodispers) dağılımdadır.

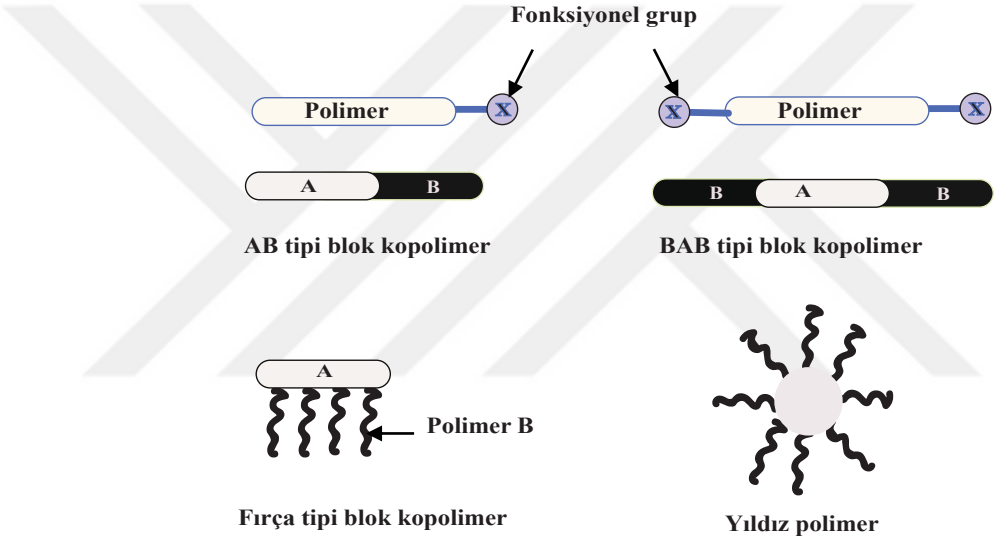
2.4.3. Canlı polimerizasyon teknikleri

Canlı polimerizasyon tanımı ilk kez 1956 yılında yapılmıştır (Szwarc, 1956). Canlı polimerizasyon sisteminde, aktif polimer zincirleri tepkime ortamında bulunan monomerler bittikten sonra da aktif kalır. Büyüyen polimer zincirlerinin sayısı ve polimer zincirlerinin her biri için polimerizasyon oranı eşit olmak zorundadır. Bu durumda ortalama polimerizasyon derecesi (DP) monomerin başlatıcıya oranına bağlı olarak Denklem 2.6'da verildiği gibi hesaplanırken, ortalama molekül ağırlığı sayısı da DP ve monomerin moleküler ağırlığına bağlı olarak Denklem 2.7'de verilen eşitlikle hesaplanır (Flory, 1953).

$$\mathrm{DP} = \frac{[\text{monomer}]}{[\text{başlatıcı}]} \qquad \text{(Denklem 2.6)}$$

$$\text{Ortalama molekül ağırlığı sayısı} = \mathrm{DP} \text{x} \text{monomer molekül ağırlığı} \quad \text{(Denklem 2.7)}$$

Canlı polimerizasyon tekniğinde birkaç önemli nokta vardır, başlatıcının oranı büyüyen polimer zincir oranından fazla olmalıdır. Böylece büyüyen polimer zincirleri eş zamanlı olarak oluşur ve büyüme aynı oranda olur. Bu oran doğru bir şekilde ayarlanmazsa polimer zincirlerinin farklı oranlarda büyüyecek ve büyüyen zincirlerin moleküler ağırlık dağılımı etkilenecektir. Ayrıca canlı polimerizasyonda, büyüyen polimer zincirlerinin tepkime sırasında herhangi bir sonlanma göstermemesi gerekmektedir. Sonuç olarak canlı polimerizasyonda çok dar bir polimer ağırlık dağılımı gözlenir. Sentezlenen polimer için ağırlıkça ortalama molekül ağırlığının (M_w) sayıca ortalama molekül ağırlığına (M_n) oranı oldukça düşük olacaktır (M_w/M_n<1,2). Şekil 2.12'de farklı tipte hazırlanabilen blok polimerler gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Çeşitli kopolimerlerin yapıları

Polimerlerin sentezinde için kullanılan canlı polimerizasyon tekniklerini grup transfer polimerizasyonu (GTP), atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), tersinir katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT) gibi birkaç alt başlığa ayırılabilir.

2.4.4.1. Grup transfer polimerizasyonu

Grup transfer polimerizasyonu (GTP) monomer ile aktif kovalent son grubun reaksiyonu üzerinden yürüyen bir polimerizasyondur. Bu polimerizasyon tekniği ilk kez 1983 yılında Webster ve çalışma arkadaşları tarafından, çeşitli alkilat metakrilatların kovalent "canlı" polimerizasyonunun, silil keten asetal başlatıcısı ile polimerleştirilmesinde

kullanılmıştır (O. W. Webster, 1983). Başlangıç basamağında monomerin silil keten asetala katılması Michael tipi katılma ile olur. Tepkime sırasında silil keten asetal başlatıcının silil grubu büyüyen polimer zincirinin uç grubuna daha sonra monomere transfer olur. Silil grubun monomere her transferinde, büyüyen polimer zincirinin ucunda silil keten asetal grup yeniden aktifleşir. Bu polimerizasyon tekniği ile kontrollü olarak 100000 g/mol ağırlığına kadar düşük molekül ağırlığı dağılımına sahip polimer zincirleri sentezlenmiş olur.

2.4.4.2. Atom transfer radikal polimerizasyonu

Atom transfer radikal polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenen polimerlerde molekül ağırlığı kontrolü oldukça başarılı bir şekilde sağlanabilir. Ayrıca sentezlenen polimerlerin molekül ağırlık dağılımı oldukça dar olabilir ($M_w/M_n<1,05$) (Webster, 1983). ATRP sentezinde başlatıcı olarak çeşitli alkil halojenürlerin kullanılabilir. Polimerizasyon alkil halojenürün (RX) yüksek aktivite gösteren organik radikale ($R^{\bullet}$) dönüşmesi ile bir geçiş metalinin (ML_n, L ligantı simgelemekte) elektron oksidasyonu tepkimesi ile ilerler. Geçiş metallerinin çoğu ile uygun ligand sistemleri oluşturulmuştur (Patten ve Matyjaszewski, 1999). Genel tercih, bakır(I)/bakır(II) redoks çifti 2,2'-pirimidin ya da 2-pirimidincarbaldehit imin ligand sistemler ile polimerleşmenin sağlanmasıdır. Benzer sistemlerle hidrofilik monomerlerin oda sıcaklığında sulu ortamda ATRP ile polimerizasyonu sağlanmıştır (Matyjaszewski, 1998; Krishnan, 2003).

2.4.4.3. Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu

Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer polimerizasyonu (RAFT) tekniği 1998 yılında GTP ve ATRP tekniklerinden sonra geliştirilmiş bir canlı polimerizasyon tekniğidir. Polimerizasyonun "canlı" olmasını sağlayan basit bir organik birleşiktir. Büyüyen polimer zinciri tersinir olarak organik bileşiğe katılır ve ayrılır. Canlı radikalik polimerizasyona bir örnek olan bu teknikle kontrollü büyüme sağlanabilir. Genelde sentezlenen polimerlerin molekül ağırlık dağılımı $M_w/M_n<1,2$ olup, bu değer bazı durumlarda 1,1 dolaylarına kadar inebilir (Chiefari vd.,1998). Bu polimerizasyon tekniğinin başlıca dezavantajı tersinir katılma-ayrışma organik ajanının yüksek maliyetli olması ve polimerizasyon sonunda ortamdan ayrılmasının zor olmasıdır. Polimerizasyon için yüksek tepkime sıcaklığı gibi özel şartlara ihtiyaç vardır.

2.4.5. Mikrojellerin saflaştırılması ve depolanması

Mikrojellerin çeşitli uygulamalarda kullanılması için karakterizasyon ve kullanım öncesi saflaştırılmaları gerekmektedir. Saflaştırma işlemlerini santrifüj kullanarak yapılabilir. Santrifüjden sonra süpernatant, üst faz, ayrılarak mikrojel tekrardan temiz bir sıvıda dağıtılmalıdır. Bu işlem birkaç kez tekrar edilerek temizleme işlemi gerçekleştirilmiş olur. Çok fazla şişmiş durumda bulunan mikrojelleri saflaştırılması için ise ultra santrifüj gerekmektedir. Ayrıca santrifüjleme sürecinde gözlenen topaklanma ve yapışma problemleri durumunda membran kullanarak mikrojelin saflaştırılması da mümkündür (Labib ve Robertson, 1978). Kullanılan membrandan düşük molekül ağırlığına sahip olan sürfaktant, başlatıcı ya da monomer kalıntıları gibi fazlalıklar bu şekilde uzaklaştırılabilir.

Hidrofobik lateks ya da mikrojeller için önemli bir problem de bakteriyel kirliliktir. Özellikle açık havada depolanmaları bakteriyel kirlenmeyi arttıracak ve stabilizasyonu etkileyebilecek bir durumdur (Wilkinson vd.,1979). Oluşacak kirlilik mikrojellerin biyomedikal uygulamalarını engelleyecek boyutta olabilir. Bu sebeple mikrojel ve lateks dispersiyonlarının dondurularak kurutulması (freze-drying) ve düşük sıcaklıkta kurutulmuş olarak depolanmaları gerekmektedir (Agbugba vd., 1998).

2.5. Mikrojel ve Lipozomal Sistemlerin Uygulama Alanları

Nano-mikrojeller ilaç ve gen taşınması çalışmalarında (Eichenbaum vd., 1999; Nayak vd., 2004; Lopez vd., 2005, Das vd., 2006), doku implantı çalışmalarında (Murthy vd., 2003; Cao vd., 2004; Saunders, 2009), manyetik alan duyarlı materyallerin sentez çalışmalarında (Pich vd., 2004), biyo-sensör teknolojisinde protein ya da enzim taşınması çalışmalarında (Hendrickson ve Lyon 2009), su/organik ya da su sistemlerin katalizinde (Li vd., 2008; Zhang ve Zhang 2008), mikro reaktör ve hibrit reaktörün sentez çalışmalarında (Karg ve Hellweg, 2009) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikrojel ve lipozomal sistemlerin uygulama alanları tartışılırken daha çok biyolojik uygulama alanları tez kapsamında değerlendirilmiştir. Alt başlıklar mikrojellerin çevre duyarlılıkları, mikrojel bünyesinde sentezlenebilecek metal nanopartiküller ve kullanım

alanları, lipozomlar, manyetik nanopartiküller ve lipozom mikrojel kompozit sistemlerin ilaç taşıyıcı ve salım sistemlerinde kullanımı şeklinde sıralanmıştır.

2.5.1. Çevre duyarlı mikrojeller

Çapraz bağlı kolloidal sistemler olan mikrojellerin önemli bir özelliği hacimsel faz geçiş (volume phase transition) sergiliyor olmalarıdır. Mikrojeller tersinir olarak çevresel uyarılara bağlı şişme büzülme davranışı sergilerler (Saunders ve Vincent, 1999; Pelton, 2000). Mikrojellerin çevre şartlarına duyarlılıkları sıcaklık, pH, iyonik kuvvet, çözücü kalitesi, ışık olabilmektedir (Murray ve Snowden, 1995; Saunders ve Vincent 1999; Pelton, 2000; Teal vd., 2000; Hendrickson vd., 2010; Romeo vd., 2010; McCann vd., 2014). Çok kısa bir zaman çerçevesinde sergilenen bu duyarlılık termodinamik olarak tanımlanabilmektedir. Polimerik jellerin hacim faz geçişi ile ilgili kapsamlı çalışma 1973 yılında yapılmıştır (Shibayama ve Tanaka, 1973). Polimer jellerinin hacim faz geçişi polimer ağı ve çözücü arasında ya da polimer zincirlerinin birbirleri arasındaki itme ve çekme kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır (Sierra-Martin vd., 2011). Bu kuvvetler Van der Waals, hidrojen bağı ve elektriksel etkileşimler olabilir. Van der Waals etkileşimleri, polimer ağını oluşturan monomerler arasındaki multipole ve çözeltinin bileşimine bağlıdır. Oksijen, azot ya da flor gibi yüksek elektronegatiflik gösteren bir atoma bağlı olan hidrojen varlığında oluşan hidrojen bağı da polimerik jellerin şişme davranışını etkileyen önemli bir güçtür. Polimer jelinde bulunan zincirlerin esnek yapıları sayesinde hidrojen bağlarının oluşumu sık sık gözlenir. Hidrojen bağları sıcaklık etkisi ile kopar ve böylece mikrojeller büzülme davranışı gösterir. Hidrojen bağlarının aksine sıcaklık artışı hidrofobik etkileşimleri artırır ve buna bağlı olarak mikrojel yine büzülme gösterir. Yine de bu etkileşimler görece zayıf etkileşimlerdir. Daha güçlü bir etkileşim olan elektrostatik etkileşimler polimer ağında sabit yüklerin varlığında açığa çıkar. Polimer zincirlerindeki bu yükler, jelin iç ve dış tarafındaki iyon dağılımının dengesizliğine sebep olur. Böylece şişme ya da büzülme meydana gelir.

2.5.1.1. <u>Sıcaklık duyarlı mikrojel sistemler</u>

Sıcaklık duyarlı mikrojel sistemlerden en yaygın kullanılanı poli(*N*-izopropilakrilamid) (PNIPAM) mikrojelleridir. PNIPAM mikrojeller ilk kez 1986 yılında literatüre kazandırılmıştır (Pelton ve Chibante, 1986). Bu çalışmada PNIPAM mikrojellerin

boyutu 20-45 C° aralığında ölçülmüş ve boyut değişiminin yaklaşık %50 oranında olduğu görülmüştür. Daha sonraki dönemlerde yapılan çalışmalarda PNIPAM mikrojelin alt kritik çözelti sıcaklığının (LCST) 32 C° civarında olduğu belirlenmiştir (Shibayama ve Tanaka, 1973).

Sıcaklık duyarlı PNIPAM mikrojellerin uygulama alanlarının başında taşıyıcı ve salım sistemleri gelmektedir (Jinnan vd., 2015). PNIPAM mikrojel bünyesinde ilaç salımı, 25 C° ve 42 C° olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiş ve ilaç salım hızının sıcaklığa bağlı olarak değiştiği ortaya koyulmuştur (Rahikkala vd., 2015). Yine PNIPAM mikrojeller ile yapılan önemli bir diğer çalışma ise yüksek sıcaklıkta stabilizasyonu bozulan enzimlerin depolanmasında kullanımlarıdır (Walker ve Leech, 2013).

2.5.1.2. pH duyarlı mikrojel sistemler

Mikrojellerin pH duyarlılığı, sentezleri sırasında kullanılan zayıf bir bazik ya da asidik monomer ile sağlanabilmektedir. Zayıf bazik özellikteki monomerlere 4-vinilpiridin ve 2-vinilpridin, zayıf asidik özellikteki monomerlere ise akrilik asit ya da metakrilik asit verilebilir (Dupin vd., 2007; Sierra-Martin vd., 2011). Sentezlenen mikrojel polibaz içeriyorsa, pK_a noktasının altında, poliasit içeriyorsa pK_a noktasının üstündeki bölgede şişme davranışı sergiler.

pH duyarlı mikrojellerin kullanım alanlarından biri ve en önemlisi ilaç taşıyıcı ve salım sistemleridir (Lallya vd., 2007). Özellikle asidik bölge oluşan kanser dokularına hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler önemli alanlardan biridir (Liu vd., 2013). İlaç taşıyıcı sistemin kanser tedavisinin yapılacağı dokuda pH değişimi ile şişme-büzülme davranışı göstermesi sayesinde, ilaç istenilen kanser dokusuna kontrollü olarak salınacak ve böylece klasik tedavi yöntemlerinde daha etkin bir tedavi sağlanmış olacaktır.

2.5.1.3. İyonik şiddet duyarlı mikrojel sistemler

Mikrojellerin üçüncü sınıfı tuz duyarlı mikrojellerdir. Tuz etkisine duyarlı sistemler için PNIPAM ve P(NIPAM-*co*-DMA) mikrojelleri kullanılmıştır. Her iki mikrojel

çalışmasında da farklı sıcaklıklarda NaCl ilavesine duyarlı olduğu ve büzülme davranışı sergilediği belirlenmiştir (Park ve Hoffman 1993; Zha, Hu vd., 2002).

Yukarıda verilen sıcaklık, pH ve iyon etkisinin yanında mikrojellerin ışık duyarlı (He ve Zhao, 2011), elektrik alan duyarlı (Ge, 2012) ya da çözücü değişimine duyarlı sistemler (Dong ve Zhou, 2013) olduğu bilinmektedir. Bu sistemler ile yapılan ilaç salım çalışmaları ya da metal nanopartikül üretiminde kullanımlarına dair çalışmalar literatürde mevcuttur.

2.5.1.4. Çoklu çevre etkisine duyarlı mikrojel sistemler

Çevre duyarlı mikrojellerin daha etkin kullanımını sağlamak amacıyla iki ya da üçlü çevre şartları değişimine duyarlı mikrojel sistemler geliştirilmiştir (Klinger ve Landfester, 2012). Çoklu duyarlı sistemler genelde sıcaklık duyarlı NIPAM ile etil akrilat, akrilik asit ya da metakrilatların kopolimerleştirilmesi sayesinde pH duyarlılığı da kazandırılarak sentezlenebilir. PNIPAM ile akrilik asit ve N,N-dimetil aminoetil metakrilatın polimerleştirilmesi ile oluşturulan sıcaklık ve pH duyarlı mikrojel ilaç salım sistemlerinde başarılı şekilde kullanılmıştır (Liua vd., 2006). Bu çalışmada farklı sıcaklık ve pH değerlerinde yapılan ilaç salımları ortaya koyulmuştur. Yapılan çalışmada altın nanopartikül yüzeyinde P(NIPAM-AA) polimerleştirilmiştir. PNIPAM mikrojelin *o*-nitrobenzil akrilat gibi ışığa duyarlı sistemle türevlendirilmesi ile elde edilen sıcaklık ve ışığa duyarlı sistemler (Jochumab ve Theato, 2013) ya da PNIPAM-allilamin kopolimer mikrojellerin spiropiran fotokrom (SP) ile türevlendirilmesi ile elde edilen ısı-ışık-sıcaklık duyarlı mikrojeller ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Garcia vd., 2007).

Yukarıda özet olarak sıralanan sistemlerden de görülebileceği gibi sıcaklık, pH, iyonik şiddet ve çözücü duyarlılıklarını tek bir sistemde toplanması ile elde edilebilecek mikrojelin hem ilaç salım sistemleri için hem de metal nanopartikül sentezi ve bu nanopartiküllerin çeşitli alanlarda kullanımı için çok anlamlı olduğu görülmektedir. Bu kapsamda sıcaklık, pH, iyon şiddeti ve çözücü etkisine duyarlı sistemlerin 2-(*N*-morfolino)etil metakrilat monomer kullanılarak organik çözücüde sentezlenmesi ilk kez 2011 yılında gerçekleştirilmiştir (Butun vd., 2011). Ayrıca yapılan bu çalışmada PMEMA mikrojel yüzeyi Fe_3O_4 manyetik nanopartikül ile kaplanarak, manyetik alan duyarlı hale

getirilmişlerdir. PMEMA mikrojeller daha sonraki yıllarda biyolojik sistemler için uygunluğunun sağlanması amacıyla su içerisinde de sentezlenmiştir (Tuncer vd., 2015).

2.5.2. Şişme davranışının termodinamiği

Mikrojellerin şişme davranışının termodinamiği açıklanırken, mikrojel partiküllerinin her birini çözelti içerisindeki tek bir polimer zinciri olarak değerlendirmek gerekmektedir. Mikrojel partikülünün çözelti içerisinde homojen olarak dağılması sonucu homojen bir çözelti ya da tersinden partikülün çözelti için homojen olarak karışmamasıyla heterojen bir çözelti oluşması mümkündür. Karışımın homojen ya da heterojen olmasını iç enerji (U_{kar}) ve karışımın entropisi (S_{kar}) belirlemektedir (Sierra-Martin, 2011). Polimer-çözücü karışımlarına enerji ve entropi katkısı, sistemin hacim ve sıcaklığının sabit olarak kaldığı varsayılan durumlarda, Denklem 2.8'de verildiği gibi Helmholtz enerji dağılımı ΔF_{kar} ile ifade edilebilir.

$$\Delta F_{kar} = \Delta U_{kar} - T\Delta S_{kar} \qquad \text{(Denklem 2.8)}$$

Karışımın basınç değişimi olmadığı için, Helmholtz enerji değişimindeki değişim Gibbs serbest enerjideki değişime eşit olur ve dolayısıyla $\Delta F_{kar} = \Delta G_{kar}$ eşitliği kurulabilir. Gerçek sistemlerde, polimer zincir-çözelti karışımı kapalı sistemlerde ve sabit bir ısı deposuyla (örneğin yağ banyosunda) bulunduğundan dolayı sistemin basıncı ve sıcaklığı sabit kalır. Ayrıca hacim değişimi de sınırlı ve küçük olduğundan $\Delta F_{kar} = \Delta G_{kar}$ eşitliği uygun bir denklem ortaya çıkarır (Sierra-Martin, 2011). Çapraz bağlayıcı oranının değişiminin şişme davranışı üzerinde etkisi olmasına rağmen, faz geçiş sıcaklığının çapraz bağlayıcı oranından bağımsız olduğu ortaya koyulmuştur.

2.5.3. Çapraz bağlayıcı yoğunluğunun şişme davranışı üzerine etkisi

Şişmiş durumdaki polimer ağlarının esnekliği temelde çapraz bağlayıcı yoğunluğuna bağlıdır. Çapraz bağlayıcı yoğunluğunun şişme davranışı üzerine etkisi, ilk kez 1973 yılında PNIPAM mikrojellerin sentezinde farklı oranlarda metilen bisakrilamit (MBA) çapraz bağlayıcı kullanılarak yapılmıştır (McPhee, 1973). Bu çalışma ve daha sonraki çalışmalar ile çapraz bağlayıcı yoğunluğunun artmasıyla mikrojelin şişme oranının azaldığı ortaya

koyulmuştur. Çapraz bağlayıcının arttırılması mikrojel partiküllerinin boyut değişimini yavaşlatmıştır (Sierra-Martin, 2011).

2.5.4. Mikrojel bünyesinde metal nanopartikül sentezi ve uygulama alanları

Mikrojeller, polimer zincirleri arasındaki kimyasal ya da fiziksel bağlanmalar sayesinde porlu bir yapı oluşturur. Mikrojellerin bu porlu özelliklerinden faydalanarak bünyelerinde metal-nanopartiküllerin (metal-NPs) sentezi sağlanabilmektedir. Mikrojel bileşiminde yapılacak değişiklikler ile sabit ya da geçici pozitif ya da negatif yüklü mikrojellerin sentezi ve böylece anyonik, katyonik ya da hem anyonik hem katyonik metal tuzları aracılığıyla nanopartiküllerin (NPs) sentezi mümkündür.

Sıcaklık duyarlı PNIPAM kabuklu mikrojel sistem 30 °C civarında hacimsel faz geçişinden kaynaklı kısmi pozitif yüklere sahiptir. Bu özellik ile mikrojel bünyesinde negatif yüklü metal tuzlarının tutulması mümkündür. Yapılan çalışmada $AuCl_4^-$ metal tuzu iyonlarının mikrojel ile etkileşimi sağlanmış ve Au metal nanopartikül mikrojel bünyesinde sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen bu metal-mikrojel sistemi ile alkollerin aldehitlere oksidasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Lu vd., 2009). Yine sıcaklık duyarlı PNIPAM mikrojel bünyesinde kullanılan Au nanopartiküllerin 4-nitrofenolü 4-aminofenole indirgenme tepkimelerinde de kullanıldığına dair çalışmalar mevcuttur (Wu vd., 2012). Bir diğer çevre duyarlı sistem olan pH duyarlı mikrojel sistemleri de metal nanopartikül sentezi için kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada 2-(dietilamino)etil metakrilat monomeri kullanılmıştır. Yüksek pH değerinde (pH 9) hazırlanan mikrojelin şişmiş durumdaki yapısı pH değişimi ile değişmiş ve içerisinde metal nanopartikül sentezi mümkün hale gelmiştir (Christodoulakis vd., 2009). PNIPAM ve akrilik asit kopolimerizasyonu ile oluşan mikrojeller üzerine sıcaklık ve pH değişimine duyarlı sistemler kullanılarak metal nanopartiküllerin stabilizasyonunun sağlanmasına yönelik çalışmalar da mevcuttur (Park ve Lee, 2011). Gümüş nanopartikül (AgNPs) içeren sistemler antibakteriyel etkinlik çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Mohan vd., 2007; Jubya vd., 2012). Antibakteriyel etkinlik çalışmalarında literatürde karşımıza çıkan bir diğer metal partikül ise altın nanopartiküllerdir. Gram pozitif *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerine AuNPs etkinliğinin kontrol grubuna kıyasla %80 olduğu yapılan çalışmayla ortaya koyulmuştur (Manju vd., 2016). Altın nanopartiküllerin *Staphylococcus aureus, Salmonella typhi* ve

Pseudomonas pneumonia bakterileri üzerine etkinlik çalışmalarında, altın nanopartikülün antibakteriyel bir ajan olduğu gösterilmiştir (Abalaka vd., 2014).

2.5.5. Lipozomların hazırlanması

Lipozomlar sulu ortamlarda yapılarında bulunan fosfolipit sistemlerin hidrate olmalarından kaynaklı olarak kolloidal davranış sergilerler (Anderson, 2008). Lipozomlar uzun zincirli yağ asitleri, glikolipit, toksik olmayan yüzey aktif maddeler ve kolesterolden oluşan küresel yapılardır (Bangham, 1965). Lipozomlar yapılarına göre ve hazırlanma yöntemlerine göre sınıflandırılabilirler.

2.5.5.1. Yapılarına göre lipozomların sınıflandırılması

Lipozomlar tek tabakalı olabilecekleri gibi çoklu katmanlardan da oluşabilirler. Küçük tek tabakalı (SUV) lipozomlar 20-100 nm boyutlarında, orta boyutta tek tabakalı lipozomlar (MUV) 100 nm boyutundan büyük, büyük tek tabaka lipozomlar (LUV) 1 μm den büyük, oligo tabakalı lipozomlar (OLV) 0,1-1 μm aralığında ve yaklaşık 5 tabakalı, çoklu tabakalı lipozomlar (MV) 1 μm den büyük boyutlarda ve 5 μm den fazla tabakalı olarak sınıflandırılabilirler (Samad, 2007).

2.5.5.2. Hazırlanma yöntemlerine göre lipozomların sınıflandırılması

Lipozomların hazırlanmasında kullanılan en kolay yöntem mekanik bir hazırlama yöntemi olan film oluşturmadır. Bu yöntemde lipit organik bir çözeltide dağıtılır sonrasında yüksek vakum ve sıcaklık ile çözücü uçurularak ince film oluşturulur. Oluşturulan ince film su ile hidrate edilir (Bangham, 1980). Hazırlanan lipozomların boyutları 1 μm civarında ve boyut dağılımları oldukça geniştir. Bu yöntemle lipozom hazırlarken lipitlerin geçiş sıcaklığı (T_c) değerinin bilinmesi önemlidir. Lipozom hazırlanması için film oluşturulması sırasında sıcaklık T_c noktasının üzerinde tutulmalıdır. Lipozom hazırlarken kullanılan bir diğer mekanik yöntem ise ultrasonik yöntemdir. Bu yöntemle elde edilen lipozomlar tek tabakalıdırlar. Lipozom boyutu ultrasonik prop ya da ultrasonik banyo kullanılarak ayarlanabilir (Hwang vd., 1987).

Yukarıda verilen yöntemlerin yanı sıra ters faz buharlaştırma yöntemi (Papahadjopoulosa vd., 1975), dondurma ve püskürtme yöntemleri (Mayer vd., 1986) ile de lipozom hazırlanması mümkündür.

2.5.6. Lipozomların kullanım alanları

Kolloidal lipozomlar, ilaç taşıyıcı sistem olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilmektedir. Lipozomların endüstriyel uygulamalarda aşı ya da kozmetik ürünlerin katkısı olarak, çeşitli hastalıkların teşhisinde kullanılan işaretleyiciler olarak ve stabilizör olarak kullanımları söz konusudur (Daraee, 2016). Lipozomların toksik olmamaları biyolojik sistemlerde kullanım alanı bulmalarını sağlamıştır. Ayrıca yapılarında hidrofilik ve hidrofobik grupların bulunması hidrofilik ya da hidrofobik ilaç etken madde taşınması/salınmasına olanak tanır (Wang vd., 2012). Lipozomlar üzerine 1960 yıllarında çalışmalar başlamış ve ilk kez 1995 yılında Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDI) tarafından Doxil için salım sistemi olarak kabul edilmiştir ((Chezy)Barenholz, 2012). Daha sonra yapılan çalışmalarda doxorubicin, doxil/caelyx, daunoXome, depocyte anti-kanser isimli ticari ilaçların, abelcet, ambisome, amphotec isimli ticari antifungalların, peptit hormonlarının, proteinlerin, *Epaxal, Inflexal* isimli ticari aşıların ve genetik biyomalzemelerin taşınmasında kullanımları onaylanmıştır ve birçok tedavi için de faz II ve faz III çalışmaları sürdürülmektedir (Oudhia vd., 2014, Kraft vd., 2014).

Biyolojik ya da sentetik yapıdaki lipozomların vücutta bozunma süreleri ve stabilizasyonları kullanım alanları için oldukça önemlidir. Yapılan araştırmalar lipozomların yüzey özelliklerinin lipozom topaklanması ve hedeflenen bölgeye taşınmasını etkilediğini ortaya koymaktadır (Kraft vd., 2014). Bu etkilerden dolayı lipozom yüzeyi, çeşitli molekül ağırlıklarına ya da dallanmaya sahip olan polietilenglikol gibi hidrofilik polimerler ile kaplanmıştır. Bu yaklaşım ile sentezlenen PEG kaplı lipozomların, hedef bölgede ilaç konsantrasyonunu artırma, tedavilerin iyileştirici etkilerini arttırma gibi pek çok yönden PEG kaplanmamış lipozomlara kıyasla daha fazla etkin olduğu ortaya koyulmuştur (Cern vd., 2014). Ayrıca PEG biyo-uyumlu bir polimer olduğundan *in-vivo* çalışmalarda vücudun, sentezlenecek taşıyıcı sistemi tehdit olarak algılamadığı ve böylece dolaşımı sağlayabildiği gözlenmiştir (Gupta ve Curtis 2004). Kim ve çalışma arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada pactitaxel yüklü yumurta fosfolipitleri kullanmıştır. Nanopartikülün

stabilizasyonu PEG ile edilmiş fosfolipitlerle sağlanmış ve katı lipit nanopartiküller hazırlanmıştır. Yaklaşık 200 nm çapında hazırlanan pactitaxel yüklü lipozomlar kullanılarak MCF-7 hücreleri ile yapılan in-vitro ilaç salım çalışmalarında elde edilen sonuçların gelecekte parenteral uygulamalar için umut verici olduğu ortaya koyulmuştur (Lee vd., 2007)

Lipozomların etkinliğini arttırmak için yapılan bir başka çalışmada, manyetik rezonans kontrast ajanı olan gadoliniyum, çapraz bağlı lipozom sistemin içerisine hapsedilmiştir. Araştırma sonucuna göre çapraz bağlı sistemde polimer ile lipozom arasındaki ilişki termodinamik olarak uygun stabilizasyonu sağlamıştır. Ayrıca çapraz bağlı lipozomda lipozomun agredasyonu ve ilaç etken maddenin salımı, çapraz bağ içermeyen lipozomlardan daha yavaş olduğu dolayısıyla salımın daha kontrollü olduğu ortaya konmuştur (Smith ve Kong 2014). Lipozomlar antibadi gibi ajanlar ile veya pH (Wang vd., 2014), sıcaklık (Kim vd., 2014) gibi dış etkilere duyarlı sistemler ile hedef bölgeye taşınabilmektedir. pH duyarlı bir blok ile türevlendirilen lipozomlar ilaç salım sistemlerinde sıkça kullanılmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak polihisdidin kullanılarak hazırlanan lipozomlar verilebilir (Wu vd., 2013). pH 5,0- 6,0 ve 7,4 olmak üzere üç farklı değerde yapılan ilaç salım çalışmalarında, pH değişiminin ilaç salım kinetiği üzerine etkin olduğu ortaya konulmuştur.

2.5.7. Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller ve kullanım alanları

Süper paramanyetik nanopartiküllerin sentezi kolloidal yapılarından kaynaklı olarak oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu sistemlere dair en önemli gereksinim uygun boyutta (genellikle 10-20 nm) ve dar bir boyut dağılımında sentezlenmeleridir. İkinci önemli nokta ise sentez sonrasında santrifüj, manyetik filtrasyon gibi karmaşık saflaştırma yöntemleri olmaksızın homojen boyut dağılımlı partiküllerin oluşmasının sağlanmasıdır (Laurent vd., 2008). Manyetik nanopartiküllerin sentezi için kullanılan en yaygın yöntem metal tuzlarının birlikte çöktürme yöntemidir (Meraa vd., 2007). Bu yöntemde $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ tuzları kullanılır. Manyetik Fe_3O_4 sentezlenirken önemli olan, pH değerinin 8-14 aralığında, oksijensiz ortamda ve başlangıçta kullanılan Fe^{+3}/Fe^{+2} sitokiyometrik oranının 2:1 olarak sabit tutulması gereksinimidir. Fe_3O_4 manyetik nanopartikül oluşum tepkimesi denklem 2.9'da verildiği gibidir.

$$Fe^{+2} + 2Fe^{+3} + 8OH^{-} \longrightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O \quad \text{(Denklem 2.9)}$$

Oluşan bu manyetik partiküllerin her bir tanesi sıcaklığın birbirleri ile etkileşmesini önlediği yüksek sıcaklıkta (~ 80 °C), tek bir manyetik alan haline gelir. Bu nanopartiküller büyük bir manyetik momente sahiptirler ve manyetik alan varlığında hızla tepki verirler. Süper paramanyetik nanopartiküller oda sıcaklığında topaklanma ihtimali çok az olduğundan biyomedikal uygulamalar için uygundurlar (Lu vd., 2007) .

Süper paramanyetik nanopartiküllerin bu çekici özelliklerinin yanında kaçınılmaz bir stabilizasyon problemleri de mevcuttur. Nano boyuttaki partiküller oldukça geniş yüzey alanı/hacim oranına bağlı olan enerjiyi azaltmak için topaklanma eğilimleri gösterirler. Ayrıca çıplak metalik nanopartiküller kimyasal olarak aşırı aktiflerdir ve havada kolaylıkla oksitlenebilirler. Oksitlenme nedeni ile de dispersitelerini ve manyetik özelliklerini genelde kaybederler (Lu vd., 2007). Manyetik nanopartiküllerin sentezden sonra kimyasal stabilizasyonlarının sağlanması konusunda geliştirilen pek çok yöntem vardır. Partikül stabilizasyonu ile ilgili olarak elektrostatik ve sterik stabilizasyonun önemine ait bilgi daha önceki bölümlerde verilmiştir. Genel olarak manyetik nanopartiküllerin stabilizasyonu, partikülün etrafına kaplanan bir tabakayla ya da kendisinden daha büyük bir polimerik sistemin içine partikülün gömülmesi ile sağlanabilir.

2.5.7.1. <u>Manyetik nanopartikülün yüzeyinin kaplanması</u>

Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin çekirdekte bir kabuk stabilizörü ile stabilizasyonu için, partikülün yüzeyi polimer ya da yüzey aktif maddeler ile, Au ya da Ag metal nanopartikül ile, silika ya da karbon inorganik bir kabukla kaplanabilir. Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin sentezinden sonra polimer ya da yüzey aktif madde ile stabilizasyonunda elektronik ya da sterik itme etkileri ile nanopartikül stabilize edilebilir. Bu konuda kullanılan en eski yöntem 1965 yılında geliştirilen demir akışkanlardır (ferrofluids) (Papel 1965). Manyetik nanopartiküllerin stabilizasyonunu geliştirmenin en önemli yolu yüzey yükü ve özel yüzey aktif maddelerin kullanımıdır (Raj ve Moskowitz, 1990). Yüzey aktif madde veya polimer, manyetik nanopartikülün yüzeyine fiziksel ya da kimyasal olarak tek ya da çoklu kabuklar şeklinde adsorbe olabilir (Lu vd., 2007). Nanopartikül yüzeyinde oluşan kabuk sterik etki ve van der Waals etkilerini dengelemektedir. Polimerlerde bulunan

karboksilik asit, fosfat, sülfat gibi gruplar manyetik nanopartikülün yüzeyine bağlanır. Biyouyumlu polimerler kullanılarak yapılan yüzey modifikasyonu manyetik alana yönlendirilebilen ilaç hedefleme ve salım sistemleri ya da manyetik rezonans görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesinde kullanılabilir. Manyetik nanopartikülün yüzeyinin Au ya da Ag gibi metallerle kaplanması mikro emülsiyon yöntemi ile sağlanabilir. Altın kaplı demir nanopartiküllerin ters mikro emülsiyon yöntemi ile sentezinde, yüzey aktif madde olarak ketil trimetilamonyum bromid kullanılmıştır (Liu vd., 1998). $NaBH_4$ indirgeyicisi kullanılarak $FeSO_4$ indirgenmiş ve $HAuCl_4$ ilavesi ile demir nanopartiküllerin yüzeyi Au ile kaplanmıştır. Altın nanopartikül ile geliştirilen Au kaplı manyetik nanopartiküller tiol grupları ile türevlendirilerek geliştirilen sistemler, katalitik ya da optik uygulamalarda kullanılması açısında önemlidir. Manyetik nanopartiküllerin silika ile kaplanması, manyetik nanopartikülün stabilizasyonunu aynı zamanda da partikül yüzeyinde gerçekleşebilecek istenmeyen etkileşimlerin oluşmasını önler. Örnek olarak manyetik nanopartikülün boya molekülü ile etkileşiminin limünesans etkisini sönümlendirmesi verilebilir (Ma, 2006). Bunun önüne geçmek amacı ile manyetik nanopartikül öncelikle silika kabuk ile kaplanır, ardından boya molekülü ile aşılama yapılabilir. Silikanın yüzeyinin düşük pH değerlerinde kolaylıkla aktifleştirilebilmesi sayesinde yüzeyin istenilen başka bir fonksiyonel grup ile modifiye edilmesi de oldukça kolaydır.

2.5.7.2. Manyetik nanopartikülün yüzeye kaplanması

Manyetik nanopartikülün kendinden daha büyük bir çekirdek-kabuk sistemin yüzeyine kaplanması yönteminde, silika gibi bir yüzeyi manyetik nanopartikül ile kaplanır. Bu yöntem ile stabilizasyonu sağlanan manyetik nanopartiküllerin asit-baz erozyonuna ya da oksidasyona karşı korunması sağlanmış olur. Bu yöntemin dezavantajı ise manyetik nanopartikülün ev sahibi sistem üzerine rastgele dağılmasıdır. Örnek olarak, amin grupları ile aktifleştirilen silika partiküllerin yüzeyinin 15 nm boyutlarında negatif yüklü manyetik nanopartikülleri ile kaplanması ve ardından $HAuCl_4$ ile bu sistemin Au kaplı hale getirilmesi verilebilir (Stoeva vd., 2005). Yapılan bir başka çalışmada ise lipozom sistemlerin içerisinde manyetik nanopartiküllerin stabilizasyonu sağlanmıştır (Laurent vd., 2008). Manyetik nanopartikül yüklü lipozomlara dışarıdan bir manyetik alan uygulanması ile hedeflenen bölgeye sentezlenen sistemin taşınması ve istenen bölgede birikmenin sağlanmasının mümkün hale getirildiği gözlenmiştir. Manyetik lipozomlar ile *in-vitro* yapılan bir diğer

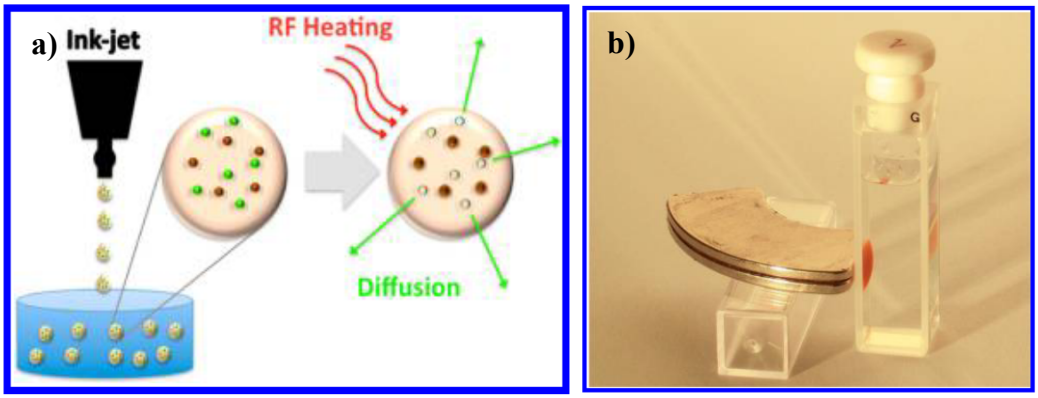
çalışmada demir oksit yüklü lipozomlar kullanılarak meme kanseri hedefleme sayesinde manyetik görüntüleme ve bu bölgede kanser tedavisinde kullanılan trastuzumab'ın salımı sağlanmıştır (Zheng vd., 2009).

2.5.8. Lipozom-mikrojel kompozit sistemler

Lipozomlar ile henüz yeni değerlendirilmeye başlanan ve polimer kimyasının dikkat çekici çıktılarından olan "mikrojeller" lipozom uygulamalarına yeni yaklaşım getirme imkânı sunmaktadır. Lipozom-mikrojel kompozit sistemler sayesinde biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere yüksek stabilizasyonda ve etkili küresel ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması mümkün hale gelmiştir. Ayrıca lipozom-mikrojel sistem kullanılarak iki veya daha fazla ilacın kombine olarak tedavide kullanılması ile ilgili çalışmaların yapılması da mümkündür (Kazakov ve Levon, 2006). Lipozom-mikrojel kompozit sistemlere örnek olarak, lipozom içinde sentezlenen mikrojel verilebilir (Eunjung vd., 2012). Bu çalışmada sodyumhiyaluranat mikrojeller, hücre yapısını taklit etmek amacıyla lipozom içerisinde sentezlenmiştir. Mikrojelin stabilizasyonu su ve yağ fazları arasında bulunan, lipit membranın düşük yüzey gerilimi sağlaması sayesinde olmuştur. Bir başka çalışmada ise sıcaklık duyarlı lipozomlar aljinat mikrojele yüklenmiş ve manyetik olarak görüntülenebilen [$Gd(HPDO_3A)(H_2O)$] kullanılarak görüntüleme ve ilaç salım çalışması için flöresin boya maddesinin salım çalışması yürütülmüştür (Elk vd., 2015). 2014 yılında yapılan bir başka çalışmada lipozomlar fiziksel olarak mikrojel bünyesine yerleştirilmiştir. Mikrojel içerisinde lipozom kapiler mikro akışkan aracı ile üretilmiştir. Belli bir akış hızında mikro kanallardan geçen sıvının mikrojel oluşturulması yönteminde mikrojel UV ile fotopolimerizyon sayesinde üretilmiştir. Daha sonra yapılan ilaç salım çalışmasında ise lipozomun mikrojel içerisine yerleştirilmesi, ilaç salım hızını ve sürekli salımı dikkate değer bir şekilde etkilediği görülmüştür (Jeonga vd., 2014).

Lipozom-mikrojel kompozit sistemlerin hedeflendirilmesi ile ilgili çalışmalar da literatürde mevcuttur. Örneğin Hunus ve arkadaşları tarafından 2013 yılında yapılan bir çalışmada, manyetik lipozom-mikrojel bünyesine yerleştirilerek, radyo dalgaları ile manyetik nanopartiküller titreştirilerek ısınma sağlanmış ve aynı zamanda lokal olarak manyetik alan uygulaması ile sıcaklık istenilen seviyede tutulmuştur (Hanus vd., 2013).

Sıcaklığın istenilen seviyede tutulması ve manyetik partikül ile taşıyıcı sistemin hedefte yönlendirilmesi sayesinde kontrollü difüzyon sağlanmıştır (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. a) Lipozom-aljinat manyetik mikrojellerin hazırlanması ve radyo frekans ile kapsüllenmiş bileşiğin difüzyon ile salımı, b) mikrojellerin manyetik alana yönelmesi

5-Florourasil (5-FU) antimetabolit etken madde DNA ve RNA makro moleküllerin yapısına girerek molekülün yapısını bozar ve DNA sentezi için gerekli olan timidilat sentetaz enziminin inhibisyonuna sebep olur. Timidilat sentetaz enziminin ifadesi 5-FU etken maddenin etkisinin belirlenmesinde anahtar noktalardan bir tanesidir. Ayrıca 5-FU etken maddesinin tedavi için kullanıldığı sistemlerde p53 genini etkilediğine dair bilgiler de literatürde mevcuttur (Longley vd., 2003). 5-FU etken madde bu özelliklerinden dolayı meme ve bağırsak kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. 5-FU etken maddenin avantajı katı tümör bölgelerinde hızlı kanser hücresi çoğalmasını engellemesi iken dezavantajı plazmada 10-20 dakika gibi kısa bir sürede yarılanması nedeniyle etkinliğinin kısa sürmesidir (Milano ve Chamorey 2002). Yapılan çalışmalarda anti kanser ajan olan bu etken maddenin kimyasal yapılar, lipozomlar veya polimerik malzemeler ile modifiye edilmesi hedeflenmiştir (Li vd., 2014). Chacko ve çalışma arkadaşları tarafından hazırlanmış olan ayrıntılı çalışmada, boyutları 2 nm ile 800 nm arasında değişen lipozom ya da polimer temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin farklı kullanım alanlarına göre düzenlenebileceğine değinilmiştir. Taşıyıcı sistemlerin yapılarına ilave edilen manyetik nanopartikül veya floresan içerikli bir çekirdekle ilaç taşıyıcı sistemin görüntülenebileceği ayrıca yine taşıyıcı sistemin yüzeyine hedefleme vektörü bağlanarak sistemin kontrollü bir şekilde hedefe ulaştırılabileceği açıklanmıştır (Chacko vd., 2011).

Bu tez kapsamında literatürün ayrıntılı bir incelemesi ile ortaya çıkan yeni bir fikir ele alınmıştır. Lipozom ile kaplı 5-florourasilin pH, sıcaklık ya da iyonik şiddet gibi dış etkilerle şişme-büzülme davranışı sergileyen yeni tip polimerik mikrojel sistemler (yarıçap <300) içerisinde hedefe yönlendirilmeleri ve istenen hedef bölgede birikmelerinin sağlanması ve çevresel etkiye duyarlı olarak salımı planlanmaktadır.

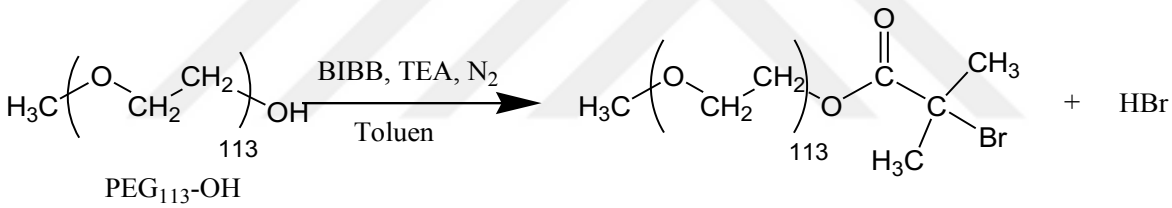
Manyetik nanopartiküllerin yüzeylerinin ilaç etken maddesi ile kaplanması ve ardından yüzeyde yapılan polimerizasyon ile kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur (Hashemi-Moghaddama vd., 2016). Bu çalışmalardan birinde Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve ardından 5-FU varlığında dopamin ile yüzey kaplanmıştır. Meme kanser tedavisinde Balb/C fareler üzerine *in-vivo* olarak kullanılan bu sistemle, 5-FU ilaç etken maddesi hedeflenmesi ve kontrollü salımı sağlanmıştır. Ayrıca meme kanseri bölgesine hedeflemenin sağlanması ile serbest 5-FU ve kontrollü salım ile salımı sağlanan 5-FU etken maddesinin çevre dokular olan karaciğer ve böbrek dokularında birikmesi ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Nano ve Mikro Boyutlu Sistemler

3.1.1. Mikrojel sentezinde kullanılan başlatıcının sentezi

ATRP yöntemi ile sentezlenen blok kopolimer için öncelikle bir ucu metoksi olan poli(etilen glikol) (PEG-OH, $PEG_{113,}$ 5000 g/mol ağırlıklı, Aldrich) homopolimeri ATRP makro-başlatıcısına (PEG_{113}-Br) dönüştürülmüştür. Başlatıcı sentezinde (trietilenamin (TEA, Aldrich), 2-2'bromo-2-metil-propionil bromür (BIBB, Aldrich), toluen (≥%99,7, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. ATRP reaksiyonunda kullanılmak üzere sentezlenen PEG_{113}-Br makrobaşlatıcı sentezi tipik bir esterleşme reaksiyonudur. Başlatıcı sentezine ait reaksiyon şeması Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. PEG_{113}-Br makrobaşlatıcı sentez şeması

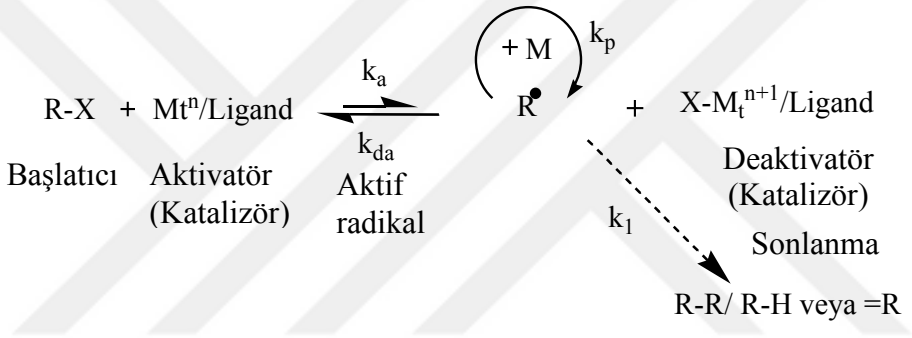
Başlatıcının sentez reaksiyonun ardından trietilenamin HBr tuzu ve süzgeç kâğıdı yardımıyla ayrılmış ve saflaştırma işlemi yapılmıştır.

3.1.2. Mikrojel sentezinde kullanılan stabilizör sentezi

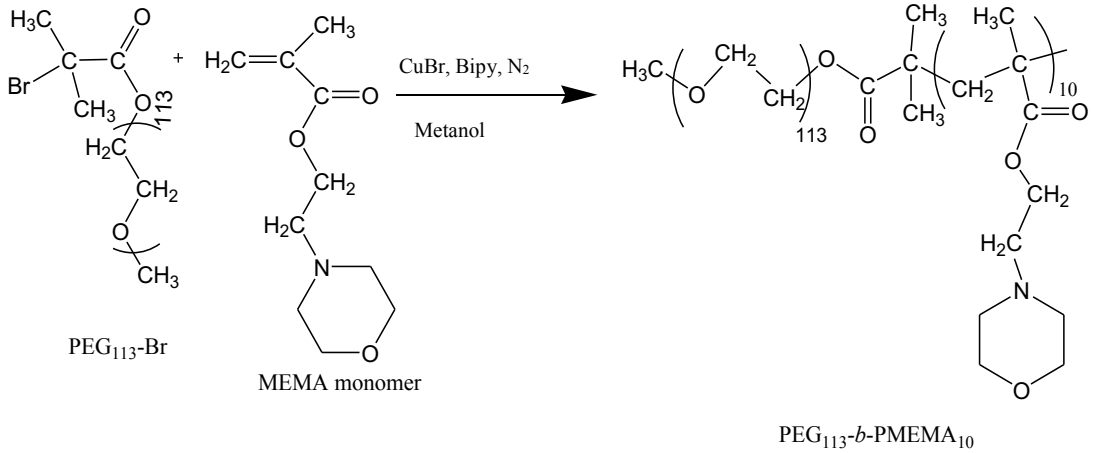
PEG-*b*-PMEMA blok kopolimer sentezinde PEG_{113}-Br makro-başlatıcı ve MEMA, CuBr, Bipy ikilisi ATRP katalizör sistemi olarak kullanılmıştır. Çözücü olarak metanol (Aldrich), sentezlenen polimeri saflaştırmak için silika kolon (Aldrich) ve dietil eter (Aldrich) kullanılmıştır.

Makrobaşlatıcı PEG_{113}-Br metanol içerisinde çözülmüştür. Azotlanan reaksiyon ortamına ATRP metal/ligand kompleksi için gerekli olan CuBr ve Bipy ilave edilmiştir. Son

olarak kullanılmadan önce alümina kolondan geçirilen MEMA monomer reaksiyona ortamına ilave edilmiştir. Kolondan geçirilen monomer daha az uçucu olan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil hidrat inhibitörü ilave edilerek derin dondurucuda (-20 ^{o}C) muhafaza edilmiştir. Kullanımdan önce MEMA yüksek vakum altında damıtılmıştır. ATRP yöntemi ile sentezlenen blok kopolimere ait genel reaksiyon şeması Şekil 3.2'de verilmiştir. Ayrıca sentezlenen polimerin reaksiyon şeması Şekil 3.3'de verilmiştir. Oluşan ürünün saflaştırma işlemi için silika kolon kullanılmıştır. Metanol yürütücü fazı ile metal/ligand kompleksi kolon yardımı ile uzaklaştırılan polimer daha sonrasında üç kez dietil eterde çöktürülmüştür. Tüm bu işlemlerden sonra elde edilen ürün yüksek vakum altında freeze-dryer ile kurutulmuştur.



Şekil 3.2. Genel ATRP mekanizması

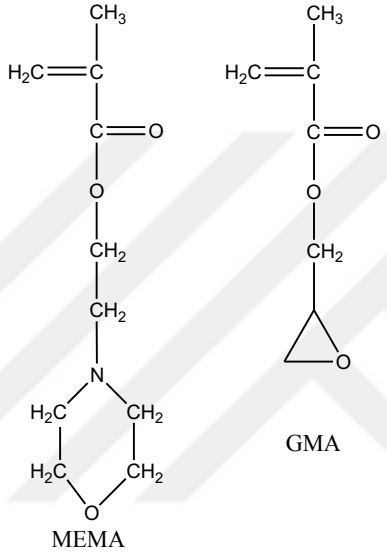


Şekil 3.3. PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ sentez şeması

Blok kopolimerizasyonu Şekil 3.3'de görülebileceği gibi, PEG_{113}-Br makrobaşlatıcının azot ortamında MEMA monomerler ile radikal polimerizasyonu mekanizması üzerinden gerçekleşmiştir.

3.1.3. Mikrojel sentezi

Mikrojel sentezinde stabilizör olarak PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer kullanılmıştır. Monomer olarak 2-(*N*-morfolino)etil metakrilat (MEMA, Aldrich), çapraz bağlayıcı olarak glisidil metakrilat (GMA, Aldrich), başlatıcı olarak ise amonyum persülfat (APS, Fluka) kullanılmıştır. Emülsiyon polimerizasyonu filtrelenmiş (0,2 µm, Whatman) çift distile su ortamında yapılmıştır.



Şekil 3.4. Mikrojel sentezinde kullanılan 2-(*N*-morfolino)etil metakrilat (MEMA) ve glisidil metakrilat (GMA) monomerlerin kimyasal yapısı

Mikrojel sentezinde kullanılan MEMA monomeri ve otoçapraz bağlayıcı GMA komonomeri, ticari inhibitörleri uzaklaştırmak amacı ile kullanımlarından önce bazik alümina kolonundan geçirilmiştir. Kullanılan monomerlerin kimyasal yapısı Şekil 3.4'de verilmiştir. Mikrojel sentezi 65 ºC sıcaklıkta, 1000 rpm sabit karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Mikrojel sentezinde kullanılan komonomer ve aynı zamanda otoçapraz bağlayıcı olan GMA monomerin çapraz bağlanmasına ilişkin tepkimenin aydınlatma çalışması ^{1}H-NMR ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen P(MEMA-GMA) mikrojelin pH, sıcaklık ve iyon şiddeti ve türü değişimi karşısındaki davranışı DLS ve zetasizer ile incelenmiştir.

3.2. Mikrojellerin Çoklu Çevre Duyarlılık Çalışmaları

3.2.1. pH duyarlılık

P(MEMA-GMA) mikrojel sentezi sırasında kullanılan MEMA monomerinde bulunan morfolino grubundaki azot atomunun asidik bölgede protonlanması ile mikrojelin su adsorplayarak şişmesi, bazik bölgede ise azot grubunun de-protonlanarak suyu mikrojel dışına itmesi sonucu mikrojel şişme-büzülme davranışı sergiler (Butun vd., 2001).

3.2.2. Sıcaklık duyarlılığı

P(MEMA-GMA) mikrojel yapısında bulunan metakrilat sayesinde sıcaklık artışı ile hacimsel faz geçişi sergiler. PEG-PMEMA blok kopolimer kullanılarak farklı oranlarda otoçapraz bağlayıcı GMA içeren P(MEMA-GMA) mikrojelin hidrodinamik yarıçapının sıcaklıkla değişimi DLS çalışması ile ortaya koyulmuştur.

3.2.3. İyonik şiddet duyarlılığı

P(MEMA-GMA) mikrojeller aynı zamanda pH>6,5 iyonik şiddet (tuz) etkisine de duyarlıdır. Mikrojellerin iyonik şiddet değişimi ile hidrodinamik yarıçaplarındaki değişim DLS ile takip edilmiş ve sonuçlar grafikler ile verilmiştir. İyonik şiddet duyarlılık çalışmaları NaCl ve Na_2SO_4 tuz çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. P(MEMA-GMA) mikrojeller de P(MEMA) mikrojeller gibi iyonik şiddet değişimine tepki vermektedir (Butun vd., 2011).

3.3. Mikrojel Bünyesinde Metal Nanopartikül Sentezi

AuNPs sentezinde hidrojen tetrakloroaurat hidrat ($HAuCl_4.3H_2O$, %99,9, ABCR), indirgeyici ajan olarak ise sodyum bor hidrür ($NaBH_4$ %98, Across) kullanılmıştır. Sentezler sulu ortamda yapılmıştır.

Porlu yapıları sayesinde mikrojellerin bünyesinde kontrollü boyut dağılımına sahip metal nanopartiküllerin sentezi mümkündür. Bu özelliklerinden faydalanarak mikrojel bünyesinde altın nanopartikül sentezi yapılmıştır. P(MEMA-GMA) mikrojellerin sentezinde

kullanılan monomerin yapısında bulunan azot atomunun düşük pH değerlerinde protonlanması ile mikrojel pozitif yüklü hal almaktadır. Bu pozitif değerin maksimum olduğu pH yaklaşık 3 değeri olarak belirlenmiştir. pH 3 değerinde pozitif olan mikrojel ile negatif $AuCl_4^-$ iyonlarının etkileşimi maksimum olacaktır. Bu sebeple hazırlanan %0,1 derişimdeki mikrojel çözeltilerinin pH değeri yaklaşık 3 değerine getirilmiş ve AuNPs sentezi için $HAuCl_4.3H_2O$ çözeltisi ile çalışmalar sürdürülmüştür. İndirgeyici ajan olarak kullanılan $NaBH_4$ molce $HAuCl_4.3H_2O$ bileşiğinin 3 katı oranında kullanılmıştır.

Tez çalışması çerçevesinde farklı amaçlarda kullanılan mikrojeller bu başlıkta da AuNPs sentezi için konak olarak kullanılmıştır. Daha küçük boyutta ve homojen metal partikül sentezi için indirgeme ultrasonik banyo içerisinde yapılmıştır (Atobe vd., 2010). Ultrasonik banyo ile yapılan çalışmada mikrojelin parçalanmasını önlemek amacı ile çapraz bağ yoğunluğu %5 (kütlece iki monomerin birbirine oranı) oranına çıkarılmıştır.

3.4. AuNPs Yüklü Mikrojel ile Antibakteriyel ve Antifungal Etkinlik

Nötral yüzey özelliğine sahip P(MEMA-GMA) mikrojel bünyesinde sentezlenen AuNPs sistem ile 11 farklı bakteri ve 2 farklı mantar üzerine antimikrobiyal etkinlik çalışmaları 24 saat inkübasyon süresi ile yapılmıştır. AuNPs ve bakteriler pozitif kontrol olarak seçilen amoxicillin (5 mg/mL) ve funguslar (mantarlar) için pozitif kontrol olarak seçilen Ketokonazol antibiyotik (5 mg/mL) ile karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

3.5. Mikrojel İçerisinde Fe_3O_4 Manyetik Nanopartikül Sentezi

Mikrojel içerisinde Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin sentezi, mikrojelin ilaç salım sistemi olarak kullanıldığı çalışmalarda, hedefleme yapılabilmesi için gerçekleştirilmiştir. Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin sentezi için demir (III) klorür hekzahidrat ($FeCl_3.6H_2O$, Merck) ve demir (II) klorür tetradidrat ($FeCl_2.4H_2O$, Merck) kullanılmıştır. İndirgeyici olarak amonyum hidroksit (NH_4OH, Aldrich) kullanılmıştır. Sentezlerde 0,2 μm filtre (Whatman) ile filtrelenmiş çift distile su kullanılmıştır.

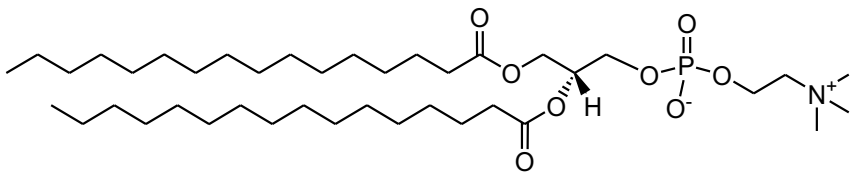
Kuru P(MEMA-GMA) mikrojel, $FeCl_3.6H_2O$ (1,80 mmol) ve $FeCl_2.4H_2O$ (0,90 mmol) tuzları 2:1 sabit mol oranında 20 mL çift distile su içerisinde çözülmüştür. 50 mg

kuru mikrojeller hazırlanan $FeCl_3.6H_2O$ ve $FeCl_2.4H_2O$ çözeltisi içerisinde ultrasonik banyoda 45 dk. dağıtılmıştır, ardından N_2 ile tepkime ortamından gazlar uzaklaştırılmıştır. Tepkime 80 °C yağ banyosu içerisinde 1000 rpm sabit karıştırma hızında 1 gün sürdürülmüştür. 1 gün sonra tepkime ortamına 3 mL, %50 NH_4OH ilave edilmiştir. Reaksiyon sonunda sistem mıknatıs yardımıyla 3 kez saf su ile temizlenmiştir.

3.6. Lipozom Sentezi

Lipozom sentezinde 1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC, Sigma) fosfolipit ve kolesterol (Sigma), dağıtıcı faz olarak kloroform ($CHCl_3$, %98-99 Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Hidratasyon için 0,01 M PBS (Aldrich), lipozomların monodispers dağılımlarını sağlamak amacıyla polikarbonat membran filtre kullanılmıştır (100 nm ve 50 nm, Whatman) ve filtreleme için Avanti Mini Extruder kullanılmıştır.

Lipozom sentezinde, 0,03 mmol DPPC fosfolipit (Şekil 3.5) ve 0,01 mmol kolesterol 3 mL kloroform içerisinde dağıtılmıştır. Kullanılan lipit/ kolesterol oranı molce 2:1 olarak ayarlanmıştır. Kloroform içerisinde lipit ve fiziksel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kolesterolün tam çözünmesi ultrasonik banyo içerisinde sağlanmıştır. Ardından 65 °C, 270 rpm karıştırma hızındaki döner buharlaştırıcı ile çözücü uzaklaştırılarak ince film oluşturulmuştur. Hazırlanan ince film bir gece süre ile freeze dryer ile kurutulmuş ve 10 mL PBS tampon içerisinde (0,01 M, pH 7,4) 65 °C sıcaklıkta ultrasonik banyoda hidrate edilmiştir. Hazırlanan lipozomların monodispers dağılımda olmalarını sağlamak amacıyla 20 kez 100 nm, 20 kez 50 nm polikarbonat membran filtreden geçirilmiştir.



Şekil 3.5. 1,2-dipalmitol-sn-glisero-3-fosfokolin (DPPC)

Hazırlanan DPPC lipozomun yapısal karakterizasyonları 100 nm ve 50 nm polikarbonatat membran filtreden geçirildikten sonra TEM ile görüntülenmiştir.

3.7. Lipozom-Mikrojel Kompozit Sistemlerin Sentezi

Mikrojel sentezinde stabilizör olarak PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer kullanılmıştır. MEMA, GMA monomerleri, başlatıcı olarak APS kullanılmıştır. Emülsiyon polimerizasyonu için filtrelenmiş (0,2 µm, Whatman) çift distile su kullanılmıştır. Lipozom sentezinde DPPC ve kolesterol, dağıtıcı faz olarak $CHCl_3$ kullanılmıştır. Hidratasyon için 0,01 M PBS, lipozomların monodispers dağılımlarını sağlamak amacıyla polikarbonatat membran filtre kullanılmıştır (100 nm 50 nm, Whatman) ve filtreleme için Avanti Mini Extruder kullanılmıştır.

Lipozom-mikrojel kompozit sistemlerin sentezinde, 0,03 mmol DPPC fosfolipit ve 0,01 mmol kolesterol kloroform içerisinde dağıtılmış, ardından döner buharlaştırıcı ile çözücü uzaklaştırılarak ince film oluşturulmuştur. PBS tamponda dağıtılan stabilizör 65 °C'de ince film DPPC üzerine ilave edilmiş ve lipozom hidrate edildikten sonra polikarbonat membrandan geçirileek boyutları ortalama 50 nm olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından P(MEMA-GMA) mikrojel sentezinde kullanılan methot ile lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemler sentezlenmiştir. Hazırlanan DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemlerin boyut ve zeta potansiyeli Zetasizer ile ölçülmüştür. Sentezlenen lipozom- mikrojelin sulu dispersiyonunun ilaç salımında kullanılacak olması nedeniyle vücut için önemli olan sıcaklık ve iyonik şiddet değişimlerine karşı duyarlılık çalışmaları DLS ile incelenmiştir.

3.8. İlaç Taşıyıcı Sistemler

3.8.1. P(MEMA-GMA) mikrojellerin *in-vitro* ilaç salım sistem olarak kullanımı

P(MEMA-GMA) mikrojelin sentezinde PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer kullanılmıştır. MEMA, GMA monomerleri, başlatıcı olarak APS kullanılmıştır. Emülsiyon polimerizasyonu için filtrelenmiş (0,2 µm, Whatman) çift distile su kullanılmıştır.

İlaç etken madde olarak 5-FU, yükleme ve salım çalışmalarında tampon çözelti olarak fosfat tampon tuzu ile hazırlanan %0,01 M PBS, ilaç salımı için diyaliz tüp (2000 Dalton, Sigma-Aldrich), çözücü olarak ise çift distile su kullanılmıştır.

P(MEMA-GMA) mikrojel sentezinde 600 mg PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer stabilizör, 2,93 mL MEMA monomer ve 0,08 mL GMA komonomerleri, 50 mg başlatıcı APS ve 0,2 µm filtre ile safsızlıklarından arındırılmış 22 mL çift distile su kullanılmıştır. Tepkime 65 ºC sıcaklıkta 1000 rpm karıştırma hızında azot ortamında gerçekleştirilmiştir.

P(MEMA-GMA) mikrojel bünyesinde ilacın yüklenmesi ve salımı ile ilgili çalışmalar; 0,01 M PBS tampon içerisinde sürdürülmüştür. Sıvı azot ile dondurulan P(MEMA-GMA) mikrojellerin içerisindeki dağıtıcı faz olan suyu uçurma işlemi düşük basınç altında vakum yapan dondurarak kurutma cihazı (freeze dryer) ile yapılmıştır. Ardından kuru mikrojel 1000 ppm 5-FU içeren 0,01 M PBS içerisinde 24 saat oda sıcaklığında dağıtılmıştır. Tam dağılma sağlanmasının ardından 5 mL 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojel diyaliz poşet içerisine alınmıştır. İlaç salım çalışmaları 37 ºC ve 42 ºC sıcaklıklarda 100 mL 0,01 M PBS içerisinde 100 rpm sabit karıştırma hızında gözlenmiştir. Çoklu çevre duyarlı mikrojelden 5-FU ilaç etken maddesinin salımına sıcaklık etkisi ve iyonik şiddet etkisi çalışmaları, 100 mL PBS içeisinde 37 ºC ve 42 ºC sıcaklıklarda ve 37 ºC sıcaklıkta serum fizyolojik ve PBS içerisinde 100 rpm sabit karıştırma hızında edilmiştir.

Belirli zaman aralıklarında salım ortamından 100 µL çözelti alınmıştır. Salım ortamının hacminin değişmesini önlemek amacı ile her 100 µL tampon çözelti alımından sonra ortama 100 µL tampon çözelti ilave edilmiştir. Alınan örnekler HPLC ile bağlı 266 nm sabit dalga boyunda UV-vis. spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir.

3.8.2. İlaç etken madde 5-FU yüklü lipozom sentezi ve *in-vitro* salım çalışmaları

5-FU ilaç etken madde yüklü DPPC lipozom sentezinde, ilaç etken madde 5-FU, DPPC fosfolipit ve kolesterol, dağıtıcı faz olarak $CHCl_3$kullanılmıştır. Hidratasyon için 0,01 M PBS, lipozomların monodispers dağılımlarını sağlamak amacıyla polikarbonat membran filtre (100 nm, 50 nm) kullanılmıştır. Filtreleme işlemi Avanti Mini Extruder ile yapılmıştır. Tüm sulu çözelti ve dispersiyonların hazırlanmasında filtrelenmiş (0,2 µm) çift distile su kullanılmıştır.

İlaç etken madde yüklü lipozom sentezinde, 0,03 mmol DPPC fosfolipit ve 0,01 mmol kolesterol 3 mL kloroform dağıtılmıştır. Kullanılan lipit/kolesterol oranı 2:1 olarak ayarlanmıştır. Kloroform içerisinde lipit ve fiziksel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kolesterolün tam çözünmesi için ultrasonik banyo kullanılmıştır. Ardından 65 °C, 270 rpm karıştırma hızındaki döner buharlaştırıcı ile çözücü uzaklaştırılarak ince film oluşturulmuştur. Hazırlanan ince film bir gece freeze-dryer ile kurutulmuş ve 1000 ppm ilaç 5-FU içeren 10 mL PBS tampon içerisinde (0,01 M, pH 7,4) içerisinde 65 °C sıcaklıkta ultrasonik banyoda hidrate edilmiştir. Hazırlanan 5-FU içeren lipozomların monodispers dağılımlı olmalarını sağlamak için 20 kez 100 nm ve 50 nm polikarbonat membran filtrelerden geçirilmiştir.

Lipozomdan ilaç salım çalışması; 1000 ppm 5-FU ilaç etken madde içeren 5 mL DPPC lipozom bünyesinden salımı ile ilgili çalışma, 37 ºC 0,01 M PBS tampon içerisinde 100 rpm sabit karıştırma hızında, HPLC kullanılarak yapılmıştır. Belirli zaman aralıklarında 100 µL salım ortamından alınan çözeltilerin analizi HPLC ile takip edilmiştir. Salım ortamından alınan çözeltilerin hacmi değiştirmesinin önlenmesi için eksilen miktarda salım tamponu ortama ilave edilmiştir. Alınan örnekler HPLC ile bağlı 266 nm sabit dalga boyunda UV-vis. spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir.

3.8.3. İlaç etken madde 5-FU yüklü lipozom-P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezi ve *in-vitro* salım çalışmaları

5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezinde daha önce kullanılan 5-FU yüklü DPPC lipozom kullanılmıştır. İlaç etken madde yüklü DPPC lipozom sentezinde, ilaç etken madde 5-FU, DPPC fosfolipit ve kolesterol, dağıtıcı faz olarak $CHCl_3$ kullanılmıştır. Hidratasyon için 0,01 M PBS, lipozomların monodispers dağılımlarını sağlamak amacıyla polikarbonat membran kullanılmıştır (100 nm, 50 nm, Whatman) ve filtreleme işlemi sırasında Avanti Mini Extruder kullanılmıştır. Ardından P(MEMA-GMA) mikrojel sentezinde olduğu gibi PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ stabilizör, MEMA ve GMA monomer, başlatıcı olarak APS, çift distile su ile hazırlanan 0,01 M PBS kullanılmıştır. Tüm sulu çözelti ve dispersiyonların hazırlanmasında filtrelenen (0,2 µm, Whatman) çift distile su kullanılmıştır.

5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) sistemin sentezinde aşağıdaki aşamalar ele alınmıştır.

Birinci basamakta; Daha önce açıklandığı gibi lipit/kolesterol oranı 2:1 olarak ayarlanmıştır. Kloroform içerisinde DPPC lipit ve fiziksel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kolesterolün tam çözünmesi ultrasonik banyo içerisinde sağlanmıştır. Ardından 65 °C, 270 rpm karıştırma hızındaki döner buharlaştırıcı ile çözücü uzaklaştırılarak ince film oluşturulmuştur. Hazırlanan ince film bir gece freeze-dryer ile kurutulmuş ve 1000 ppm ilaç etken madde 5-FU içeren PBS tampon içerisinde (0,01 M, pH 7,4) içerisinde 65 °C sıcaklıkta ultrasonik banyoda hidrate edilmiştir. Hazırlanan lipozomların monodispers dağılım için 50 nm polikarbonat membran filtreden geçirilmiştir.

İkici basamakta; 5-FU yüklü DPPC lipozom ile sentezlenen 5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) sentezi için PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer stabilizör olarak kullanılmıştır. Mikrojel oluşumu sırasında MEMA monomer ve GMA komonomeri oto çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Başlatıcı olarak APS ve çözücü olarak 0,01 M PBS tampon kullanılmıştır. Tepkime N_2 altında 1000 rpm sabit karıştırma hızında 65 ºC sıcaklıkta 24 saat süre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tepkimesi sırasında kullanılan bileşenler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezi;

DPPC (mmol)	**Kolesterol (mmol)**	**MEMA (mL)**	**GMA (mL)**	**DPPC (mL)**
0,05	0,025	2,93	0,08	10
3 mL kloroform içerisinde ince film hazırlandı.		10 mL 0,01 M PBS içerisinde sentezlendi.		
5000 ppm, 10 mL PBS içerisinde dağıtıldı.				

5-FU yüklü lipozom/mikrojel sistemden ilaç salımı; 0,05 mmol DPPC ve 0,03 mmol kolesterol ile hazırlana ince film lipit üzerine 5000 ppm 5-FU içeren 10 mL 0,01 M PBS çözeltisi ilave edilmiş ve 15 dakika ultrasonik banyoda disperse edilerek lipozom hazırlanmıştır. Elde edilen 5-FU/lipozom dispersiyonu homojel sistemin eldesi ve lipozoma hapsolmayan 5-FU fazlasının uzaklaştırılması için 100 nm polikarbonat membrandan 10 kez geçirilmiştir. Elde edilen 5-FU/DPPC lipozomun içeren P(MEMA-GMA) mikrojel

kompozit sistem sentezlenmiştir. Hacimce iki katına çıkan çözelti dispersiyonda teorik olarak 2500 ppm 5-FU içermektedir. İlaç salım çalışmalarının standart bir salım oluşturmak için sentezlenen 5-FU içeren lipozom/mikrojel dispersiyonu PBS ile seyreltilmiştir. Seyreltme işleminden sonra 1000 ppm 5-FU içeren lipozom/mikrojel sistemden 5 mL alınarak diyaliz membran içerisinde salım gerçekleştirilmiştir. İlaç salım çalışmaları 100 mL hacimde 37 ºC, 42 ºC 0,01 M PBS içerisinde 100 rpm sabit karıştırma hızında yürütülmüştür. Belirli zaman aralıklarında, 100 µL salım ortamından alınan çözeltilerin 5-FU derişimi HPLC ile takip edilmiştir. Salım ortamından alınan çözeltilerin sistemde hacim değişiminin önlenmesi için eksilen miktarda salım tamponu ortama ilave edilmiştir. Alınan örnekler HPLC ile kombine çalışan 266 nm sabit dalga boyunda UV-*vis*. spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir.

3.8.4. İlaç etken madde 5-FU/DPPC lipozom-P(MEMA-GMA) mikrojel sistemi ile Fe_3O_4 manyetik NPs/DPPC lipozom-P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem sentezi

5-FU/DPPC lipozom içeren Fe_3O_4/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin sentezinde 3 basamak izlenmiştir. 5-FU/DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezinde daha önce kullanılan 5-FU yüklü DPPC lipozom kullanılmıştır. İlaç etken madde yüklü DPPC lipozom sentezinde, 5-FU, DPPC fosfolipit ve kolesterol, dağıtıcı faz olarak kloroform kullanılmıştır. Hidratasyon için 0,01 M PBS, lipozomların monodispers dağılımlarını sağlamak amacıyla polikarbonat membran filtre kullanılmıştır (100 nm, 50 nm, Whatman). Filtreleme işlemi sırasında Avanti Mini Extruder kullanılmıştır. Ardından P(MEMA-GMA) mikrojel sentezinde olduğu gibi PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ stabilizörü, MEMA ve GMA monomerleri, başlatıcı olarak APS, çift distile su ile hazırlanan 0,01 M PBS kullanılmıştır. 5-FU/ DPPC lipozom içeren Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sisteminin sentezinde $FeCl_3.6H_2O$ ve $FeCl_2.4H_2O$ kullanılmıştır. Demir iyonlarının Fe_3O_4 manyetik nanopartiküle dönüşmesinde indirgeyici olarak %26 NH_4OH kullanılmıştır. Tüm sulu çözelti ve dispersiyonların hazırlanmasında filtrelenmiş (0,2 µm) çift distile su kullanılmıştır.

5-FU/DPPC lipozom içeren Fe_3O_4 manyetik NPs/DPPC-lipozom P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin sentezinde izlenen üç basamak aşağıdaki gibidir.

Birinci basamak; DPPC fosfolipit ve kolesterol kloroformda dağıtılmıştır. Kullanılan lipit/ kolesterol mol oranı 2:1 olarak ayarlanmıştır. Kloroform içerisinde lipit ve fiziksel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan kolesterolün tam çözünmesi ultrasonik banyo içerisinde sağlanmıştır. Ardından 65 °C, 270 rpm karıştırma hızındaki döner buharlaştırıcı ile çözücü uzaklaştırılarak ince film oluşturulmuştur. Hazırlanan ince film bir gece freeze-dryer ile kurutulmuş ve 1000 ppm ilaç etken madde 5-FU içeren PBS tampon içerisinde (0,01 M, pH 7,4) 65 °C sıcaklıkta ultrasonik banyoda hidrate edilmiştir. Hazırlanan lipozomların monodispers dağılımda olmalarını sağlamak amacıyla 20 kez 100 nm, 20 kez 50 nm polikarbonat membran filtreden geçirilmiştir.

İkici basamak; 5-FU/DPPC lipozom kullanılarak 5-FU/DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) sentezlenmiştir. Sentez için PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer stabilizör olarak kullanılmıştır. Mikrojel oluşumu sırasında MEMA monomer ve GMA komonomeri oto çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Başlatıcı olarak APS, çözücü olarak 0,01 M PBS tampon kullanılmıştır. Tepkime N_2 altında gerçekleştirilmiştir. 5-FU/DPPC tepkime ortamında monomerlerin içerisinde ilave edilmiştir.

Üçüncü basamak; 5-FU/DPPC lipozom içeren Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin sentezinde 5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel kullanılmıştır. Mikrojel dispersiyonu sıvı azot ile dondurulmuş ardından freeze-dryer ile kurutulmuştur. Kuru mikrojel molce 2:1 oranında $FeCl_3.6H_2O$ ve $FeCl_2.4H_2O$ içeren dağıtıcı faz H_2O içerisinde ultrasonik banyoda 45 dakika dağıtılmıştır. Disperse edilen mikrojel ortamından gazların uzaklaştırılması tepkime ortamından 15 dakika N_2 gazı geçirilmiştir. Tepkime 80 ºC 1000 rpm sabit karıştırma hızında, yağ banyosunda 24 saat sürdürülmüştür. Ardından amonyum hidroksit (%50 seyreltilmiş) ile demir iyonları indirgenerek Fe_3O_4 nanopartikül sentezlenmiştir. Sentezin ardından 5-FU/DPPC lipozom içeren Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin 3 kez mıknatıs ile toplanarak saf su ile yıkanmış ve tekrar dağıtılmıştır. Kullanılan bileşenlere ait bilgiler Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. 5-FU/DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sentezi; 600 mg PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$, 50 mg APS, 65 ° C, 0,01 M PBS

DPPC (mmol)	Kolesterol (mmol)	5-FU (ppm)	MEMA (mL)	GMA (mL)	DPPC lipozom (mL)	Lipozom /mikrojel (mg)	$FeCl_3.6H_2O$ (mmoL)	$FeCl_2.4H_2O$ (mmoL)
0,03	0,01	5000	2,93	0,08	10	50	1,80	0,90
3 mL kloroformda ince film hazırlandı 10 mL PBS'de dağıtıldı.			10 mL 0,01 M PBS'de sentezlendi. Teorik olarak 2500 ppm 5-FU içerdiği hesaplanmıştır.			20 mL H_2O içerisinde sentezlendi. %50 NH_4OH: H_2O ile indirgendi.		

3.8.5. Kalibrasyon eğrisi oluşturma

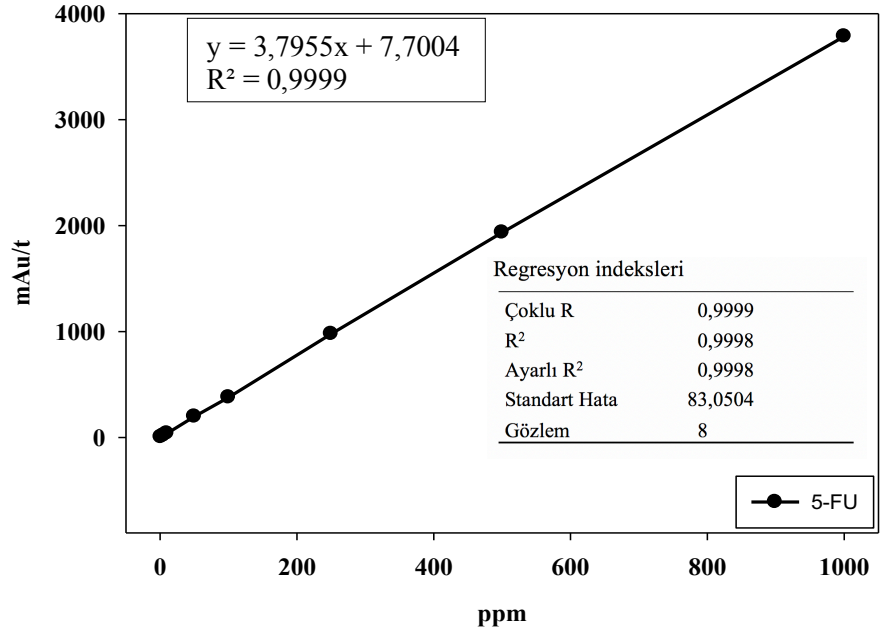
P(MEMA-GMA) mikrojellerin ilaç taşıyıcı ve salım sistemi olarak kullanımında ilaç etken madde olarak meme ve kolon kanseri tedavisinde kullanılan 5-florourasil kullanılmıştır. 5-FU ilaç etken maddesine ait doğrusal kalibrasyon grafiği 266 nm dalga boyunda UV-vis spektrometresi bağlı HPLC kullanılarak oluşturulmuştur. 1000 ppm ile 1 ppm arasında 0,01 M PBS içerisinde hazırlanan çözeltiler kullanılarak yapılmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan 5-FU çözeltilerinin integral pik alanlarına bağlı olarak kalibrasyon grafiği Şekil 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.3. 5-FU etken maddenin konsantrasyona bağlı HPLC pik alanları

ppm	mAu	mAu	mAu (ort)	mAu/t	mAu/t	mAu/t (ort)
1	21,10	20,60	20,85	3,93	3,88	3,91
5	105,60	105,10	105,35	19,66	19,62	19,64
10	207,20	206,10	206,65	38,58	38,48	38,53
50	1057,80	1052,60	1055,20	196,98	196,50	196,74
100	2015,30	2089,20	2052,25	375,29	382,17	378,73
250	5255,30	5227,10	5241,20	978,64	976,01	977,33
500	10395,10	10364,70	10379,90	1935,77	1932,94	1934,36
1000	20287,60	20430,40	20359,00	3777,95	3791,25	3784,60

5-FU ilaç ekten madde derişiminin kalibrasyon eğrisi HPLC kromotogram pik alanları kullanılarak oluşturulmuştur. 1 ile 1000 ppm arasında konsantrasyon değiştirilerek

elde edilen değerlerin regrasyon analizi incelendiğinde R^2 değerinin 0,9999 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.6. 5-FU ilaç etken maddesine ait kalibrasyon grafiği

3.8.6. XTT çalışması

MCF-7 ve L929 hücre hatları üzerine sitotoksisitesi belirlenmiştir. Çalışmalarda XTT testi kullanılmıştır. Söz konusu deneysel çalışalar sekiz kez tekrarlanmış ve elde edilen absorbans değerleri ölçülmüştür.

Doz belirleme çalışması için MCF-7 ve L929 hücre hatları kullanılmıştır. Tüm hücreler 25 cm^2 kültür flasklarında kültüre edilmiştir. MCF-7 ve L929 hücreleri %10 FBS (fetal bovine serum), %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO_2, 37˚C ortamda kültüre edilmiştir.

$5x10^3$ hücre/mL konsantrasyonda MCF-7 ve L929 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Plaklar bir gece %5 CO_2, 37 ˚C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerindeki vasat atılmış ve farklı konsantrasyonlarda örnekler taze vasat kuyucuklara eklenmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 25 µL XTT çözeltisi eklenmiştir. 2 saat inkübasyon sonrası kuyucukları 450 nm'de absorbansları belirlenmiştir. Kontrol kuyucuklarındaki hücreler sadece hücre kültür vasatı ile muamele edilmiştir.

3.8.7. 5-FU içeren DPPC-mikrojelin MCF-7 üzerine etkisi

5-FU içeren DPPC-P(MEMA-GMA) lipozom mikrojel sistemin MCF-7 hücre hatları üzerine sitotoksisite çalışması yapılmıştır. Çalışmalarda 12 ve 24 saatlik sitotoksisite XTT testi ile belirlenmiştir. Söz konusu deneysel çalışalar sekiz kez tekrarlanmış ve elde edilen absorbans ölçülmüştür. Bu çalışmada MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. Daha önce yukarıda bahsedildiği gibi aynı şekilde, hücreler 25 cm^2 kültür flasklarında kültüre edilmiştir. MCF-7 hücreleri %10 FBS, %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO_2, 37 ^oC ortamda kültüre edilmiştir. Çalışmada $5x10^3$ hücre/ml konsantrasyonda MCF-7 hücreleri 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Plaklar bir gece %5 CO_2, 37 ^oC sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerindeki vasat atılmış ve farklı konsantrasyonlarda örnek içeren taze vasat kuyucuklara eklenmiştir. Plaklar 12 ve 24 saat süre ile %5 CO_2, 37 ^oC sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklara 25 µl XTT çözeltisi eklenmiştir. 2 saat inkübasyon sonrası kuyucukları 450 nm dalga boyunda absorbansları belirlenmiştir. Kontrol kuyucuklarındaki hücreler sadece hücre kültür vasatı ile muamele edilmiştir.

3.9. *İn-vivo* Tümör Model Oluşturulması

6-8 haftalık dişi savunma sistemi baskılanmış farelerin üçüncü ve altıncı memelerine (sağ ve sol arka bacaklarına yakın bölge) deri altına hücre kültür laboratuvarında çoğaltılan $10*10^6$ MCF-7 hücresi 100 µL PBS içerisinde enjekte edilmiştir. ER^+ ve $PR^{+/-}$ ve $HER2^-$ reseptör içeren MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. Bu sayede bahsi geçen genlerin tayini ile tedavinin gerçekleşip gerçekleşmediği test edilmiştir.

Tümör boyutu ortalama 100-150 mm^3 oluncaya kadar meme doku büyümesi sürdürülmüştür. Tümör büyüklükleri sürgülü kumpas (Vernier caliper) kullanılarak denklem 3.1'de verilen eşitlikle hesaplanmıştır.

$$Hacim = \frac{Genişlik^2 \; x \; Uzunluk}{2} \qquad \text{(Denklem 3.1)}$$

3.10. Meme Kanseri Tedavi Protokolü

Uygun boyuta gelen 20 CD1 dişi nude fare rastgele 5 gruba ayrılmıştır. Gruplar şu şekilde tanımlanmıştır;

1) Kontrol grubu; CD1 dişi farelere $10*10^6$ MCF-7 hücre enjekte edilmiş ve tümör boyutu 100-150 mm^3 olduğunda fareler sakrifiye edilerek tümör dokuları alınmıştır.

2) Serbest 5-FU ile tedavi edilen grup; CD1 dişi farelere $10*10^6$ MCF-7 hücre enjekte edilmiş ve tümör boyutu 100-150 mm^3 olduktan sonra fareler tedaviye alınmıştır. Tedavide farelere 14 gün boyunca bir gün aralıklarla 0.l ml serum fizyolojik içerinde çözünmüş olan 5-FU, 5mg/kg/vücut ağırlığı olacak şekilde karın bölgesinden verilmiştir.

3) DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem enjekte edilen grup; CD1 dişi farelere $10*10^6$ MCF-7 hücre enjekte edilmiş ve tümör boyutu 100-150 mm^3 olduktan sonra fareler kontrollü salım sistemine maruz bırakılmıştır. Bu gruba 14 gün boyunca birer gün aralıklarla serum fizyolojik içerisinde disperse edilmiş olan 100 μg/mL DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 0,1 mL 3. ve 6. meme bölgesinde bulunan tümör bölgesine tümör içi olacak şekilde enjekte edilmiştir.

4) Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem grubu; CD1 dişi farelere $10*10^6$ MCF-7 hücre enjekte edilmiş ve tümör boyutu 100-150 mm^3 olduktan sonra fareler kontrollü salım sistemine maruz bırakılmıştır. Bu gruba 14 gün boyunca birer gün aralıklarla serum fizyolojik içerisinde disperse edilmiş olan 100 μg/mL Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemden 0,1 mL 3. ve 6. meme bölgesinde bulunan tümör bölgesine enjekte edilmiştir.

5) 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem grubu; CD1 dişi farelere $10*10^6$ MCF-7 hücre enjekte edilmiş ve tümör boyutu 100-150 mm^3 olduktan sonra fareler kontrollü salım sistemi olan 5-FU

içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) ile tedavi edilmiştir. Bu gruba 14 gün boyunca birer gün aralıklarla serum fizyolojik içerisinde disperse edilmiş olan 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) sistemden 5-FU miktarı 5mg/kg/vücut ağırlığı olacak şekilde 100 μg/mL 0,1 mL 3. ve 6. meme bölgesinde bulunan tümör içine enjekte edilmiştir (Renard vd., 2010).

Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem ve 5-FU içeren Fe_3O_4 mayetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem gruplarının bileşeninde bulunan Fe_3O_4 manyetik NPs aracılığıyla sistemlerin hedefe yönlendirilmesi manyetik alan kullanılarak yapılmıştır.

3.11. Karakterizasyon

3.11.1. Jel geçirgenlik kromotografisi (GPC)

Mikrojel sentezinde stabilizör olarak kullanılan blok kopolimerin sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) ve molekül ağırlık dağılımı (M_w/M_n) GPC ile belirlenmiştir. GPC Agilent 1200 serisi olup pompa, refraktif indeks (RI) ve UV dedektörü sahiptir. Sentezlenen polimerin molekül kütlesine bağlı olarak lineer diblok kopolimerler için Mixed ‘D’ ve ‘E’ kolonlarından oluşmaktadır. GPC cihazı, molekül ağırlıkları 1390 g/mol ile 259000 g/mol arasında değişen, polimetil metakrilat (PMMA) homopolimer standartları kullanılarak kalibre edilmiştir. GPC cihazında sürükleyici faz olarak HPLC türü tetrahidrofuran (THF, Sigma) stabilizör olarak 2,6-di-*t*-bütil-4-metil fenol (BHT, Fluka) kullanılmıştır. THF akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlanmıştır.

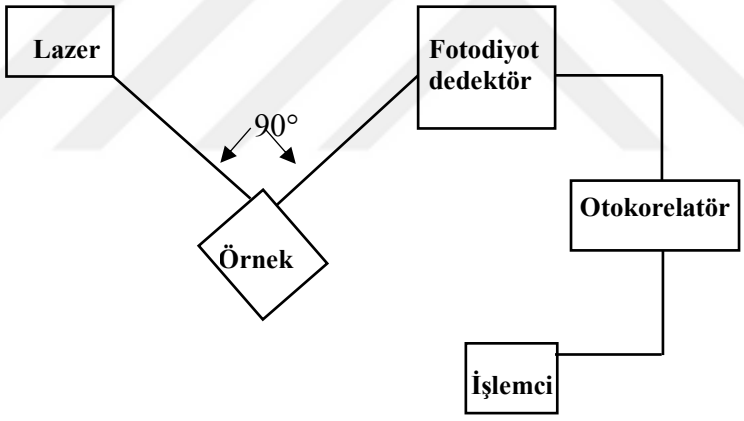
3.11.2. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Sentezlenen blok kopolimerin polimerizasyon derecesinin hesaplanması ve mikrojelin GMA ile çapraz bağlanma mekanizmasının aydınlatma çalışması JEOL ECZ 500R marka 500 MHz (11,75 Tesla) manyetik alan gücüne sahip NMR spektroskopi cihazı ile incelenmiştir. ^{1}H-NMR spektrumları incelenen örneğin özelliklerine göre döteryum içeren çözücüler kullanılarak alınmıştır. Polimerizasyon derecesi ve molekül yapısı ^{1}H-

NMR spektrumlarında gözlenen spesifik piklerin integral alanları karşılaştırılarak yapılmıştır.

3.11.3. Dinamik ışık saçılması (DLS)

Kolloidal partikül olan mikrojeller, Faraday Tyndall etkisi olarak adlandırılan optik özelliklere sahiptir. Kuvvetli bir ışık demeti altında kalan kolloid ışığın bir miktarını dağıtır ve yansıtır (Zsigmondy 1914). Kolloidal partiküllerin boyutu doğrudan ölçülemese bile ışığın dağılması ile oluşan ışığın incelenmesi ile gözlemlenebilir ve sayılabilir. Elektron mikroskobu yüksek enerjili elektronların kullanılması ile kolloidlerin partikül büyüklüklerini, şekillerini ve yapılarını incelenebilmektedir. Işık saçılımı seyreltik kolloidal partiküller üzerine ışık gönderildiğinde her bir partikülden ışık saçılır. Fraday Tyndall etkisine dayanan bu yöntem ile misel çözeltileri ya da emülsiyonların boyutları ölçülebilir.



Şekil 3.7. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) şematik gösterimi

P(MEMA-GMA) mikrojelin pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu türü ve değişimine karşı gösterdiği etkinin aydınlatılması ve hazırlanan lipozom, mikrojel nano-mikro yapıların boyut ve boyut dağılımının (polidispersite indeks-PDI) belirlenmesi için DLS cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.7). DLS çalışmaları hem Zetasizer Nano ZS cihazı (Malvern Instruments, Inc, Birleşik Krallık) hem de ALV/CGS-3 kompakt goniometre sistemi (Malvern Instruments, Inc, Birleşik Krallık) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ALV/CGS-3 kompakt goniometre sistemi, λ_0 632,8 nm'de 22 mW He-Ne lazeri, yüksek kuantum verimliliği ile çalışan fotodiyot dedektörü, bir ALV/LSE-5003 çoklu tau dijital korelatör elektronik sistemden oluşmaktadır. Bütün ölçümler %0,1-1,0 arasındaki konsantrasyonlara

sahip polimer çözeltileri üzerinden 90º sabit açılı saçılmalar ile yapıldı. Veriler ikinci dereceden kumulantlarının analizi kullanılarak işlenmiştir. Çözelti sıcaklığı ısı kontrollü su banyosu ile ± 1 ºC duyarlılıkta sabit tutulmuştur.

3.11.4. Zetapotansiyel ölçümleri

Zetasizer Nano ZS cihazı ile zeta potansiyeli ölçümleri de yine mikrojel ve lipozom nano-mikro yapıların zeta potansiyelleri belirlenmiştir. Zeta potansiyeli, sıvı ortamda dağılmış olan partiküllerin çeşitli yollardan yük kazanması ile ortaya çıkar. Bu, partikülün yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların iyonlaşması ile olabileceği gibi kolloidin bulunduğu dispersiyon ortamından pozitif veya negatif iyonları absorbe etmesi ile de olabilir. Partikül pozitif ve negatif yüklü oluşuna göre aksi yükteki iyonlar ile çevrilebilir, böylece tek tabakalı (monomoleküler) bir yapı oluşur. Bu tabakanın etrafında partiküle bağlı olmayan hareketli ikinci iyon tabakası yer almaktadır. İkinci tabakaya Helmoltz çift tabakası veya hareketli difüze çift tabaka denir. Çift tabakanın dışında pozitif iyonların negatif iyonlara eşit olduğu nötral bir alan vardır. Partikül yüzeyi ile bu nötral yüzey arasında bulunan bu fark zeta potansiyelini oluşturur.

3.11.5. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

Sentezlenen sistemlerin yapısal karakterizasyonu JEOL JEM 1220 marka, tungsten flamalı TEM ile gerçekleştirilmiştir. TEM çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Elektronların örnek ile etkileşimleri sonucu oluşan görüntü büyültülür ve floresans ekran, fotoğrafik film katmanı ya da CCD kamera gibi bir sensör üzerine odaklanır. Bu teknik sayesinde düşük büyütmelerden yüksek büyütmelere (50x-200.000x) kadar morfolojik, yapısal ve elementel bilgiler alınabilmektedir. Biyoloji, Tıp ve Temel bilim alanlarında numune yüzey ve ince yapılarının ayrıntılı olarak yüksek çözünürlük ve kontrastta görüntülenmesi, morfolojik araştırmalar, yapı-fonksiyon ilişkilerinin yorumlanması gibi birçok analiz yapılabilmektedir.

3.11.6. Taramalı elektron mikroskop-enerji dağılımlı X-ışınları spektroskopisi (SEM-EDX)

P(MEMA-GMA) mikrojel içerisinde sentezlenen Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin görüntülenmesi ve kalitatif-kantitatif analizinin yapılması için SEM ile kombine edilmiş olan EDX spetroskopisi kullanılmıştır. EDX incelenen örnek içerisinde bulunan elementlerin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Yapılan çalışmada SEM ile birleştirilmiş EDX kullanılmıştır. SEM aracılığı ile örneğin yüzeyi yüksek enerjili elektron demeti ile taranır. Bu sayede yüzeyde çeşitli tür sinyaller oluşturulur. Bu sinyaller yüzeyden geri saçılmış elektronlar, Auger elektronları, ikincil elektronlar, X-ışını emisyonu ve değişik enerjili fotonlardır. Geri saçılmış ve ikinci elektronlar taramalı elektron mikroskopun temelini oluşturur. EDX yönteminin temelinin ise elektron bombardımanına maruz bırakılan numuneden elektronlar ile numunenin etkileşimi sonucu salınan X-ışınlarının çözümlenmesine dayanır. Elementlerin her birinin farklı elektronik yapıya sahip olmaları sayesinde her bir elementin elektronik dalgaya farklı bir cevap ürettiği ve her bir element için salınan ışının enerjisinin farklı olması sonucu doğar. Bu sayede incelenen örnekte bulunan her bir elementin karakterizasyonu sağlanabilmektedir.

3.11.7. Yüksek performans sıvı kromotografisi (HPLC)

Ayırma teknikleri içerisinde en çok kullanılan teknik sıvı kromotografi tekniğidir. Yöntemin duyarlılığı, doğru nicel tayinlerde uygulanabilir olması, otomasyon kolaylığı veya sıcaklıkla bozunabilen türlerin ayırılması için kullanılabilir olması tercih sebebidir. Amino asitler, proteinler, ilaçlar gibi çeşitli organik türlerin ya da çeşitli anorganik bileşiklerin tayininde kullanılan bir yöntemdir.

Yapılan ilaç salım çalışmasında belli bir akış hızı ile kolona gönderilen maddenin dedektörde okunan pik alanları kullanılarak derişime karşı pik alanı kalibrasyon grafiği oluşturulmuş ardından çeşitli zamanlarda salım ortamından alınan örneklerin pik alanları belirlendikten sonra alıkonma süresi kullanılarak pik normalizasyonu yapılmıştır. Elde edilen değerler kalibrasyon eğrisinde yerine konulmuş ve ilaç salım miktarı hesaplanmıştır. HPLC analizlerinde 1,0 ml/dakika akış hızında 1 µL enjeksiyon hacminde 95:5:1 oranında su: metanol: fosforik asit hareketli faz kullanılmıştır.

3.11.8. RT-PCR analizi; RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve qRT-PCR metodu ile tayini

Dokulardan total RNA izolasyonu yüksek saflıkta RNA izolasyon kiti-(Roche) kullanılarak yapılmıştır. RNA'nın miktarı ve saflığı (Nanodrop 1000-Thermo Scientific) 260 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçülerek hesaplanmıştır. cDNA sentezinde cDNA sentez kiti-(Roche) kullanılarak toplam tepkime 20 µl'den oluşacak şekilde, içerisinde 500 ng toplam RNA, 1 µl random hexamer primer, 1 µl anchored-oligo$(dT)_{18}$ primer, 4 µl buffer 5x, 1,1 µl reverse transkriptaz, 0,5 µl protektör RNAaz inhibitörü, 2 µl deoxinükleotit mix, 1 µl DTT ve iki kez distile su bulundurulmuştur. cDNA sentezi için PCR koşulları, 29 ^{o}C'de 10 dakika, 48 ^{o}C'de 60 dakika ve 85 ^{o}C'de 5 dakikadır. qRT-PCR üretici firmanın (Roche) tavsiyelerine göre laboratuvarımızda kullandığımız metodu doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerden; TYSM, östrojen, progesteron, EGFR, β-aktin (referans gen olarak kullanılmıştır) mRNA düzeyleri, dual label (Taqman prob) kullanılarak Roche nano lightcycler ile ölçülmüştür. RT-PCR çalışmaları üç kez tekrarlanarak yapılmıştır. Sonuçlar Tukey kullanılarak one-way ANOVA ile hesaplanmıştır.

3.11.9. Patolojik analiz ve immünohistokimyasal boyama doku tespiti

Boyama işlemi aşağıda ayrıntılı olarak verilen basamakların takibi ile yapılmış, dokular lam üzerine alınmış ve patolojik analizin yanında ER, PR, Cerb-B2, p53 genlerinin takibi de yapılmıştır. Doku tespiti 24 saat içerisinde yapılmıştır.

Formaldehit (nötral-tamponlanmış) içeriği, %10: 100 mL saf su (pH:7), 4 gr sodyum fosfat monobazik, 6,5 gr sodyum fosfat dibazik, 100 mL saf formaldehit, (%37-40).

Doku takibi (dehidratasyon): Doku takibi için alınan örnekler sırasıyla verilen içeriklerde birer saat bekletilmiştir. 1.kap: %70 etil alkol, 2. kap: %80 etil alkol, 3.kap: %90 etil alkol, 4.kap: %96 etil alkol, 5.kap: %96 etil alkol, 6.kap: Saf etil alkol, 7.kap: ksilen, 8.kap: ksilen, 9.kap: parafin, 10.kap: parafin.

Doku gömme (bloklama): Dokuların mikrotom cihazının blok tutucu yuvasına monte edebilir hale getirmek için, metal gömme kalıbına az miktarda parafin dökülür, pens yardımıyla dokular kalıba yerleştirilir. Soğuk bir kısma alınır. Kalıp içindeki dokulara bastırılarak tabana eşit olarak yapışmaları sağlanır. Üzerine blok kaseti konur. Blok kasetini deliklerini geçinceye kadar parafin ilave edilir.

Doku kesimi (mikrotom cihazı): Mikrotom cihazı blok tutucu yuvasına blok kaseti takılır. Dokunun ön yüzü tıraşlanarak doku bütünlüğüne ulaşılır. 4 mikrom kalınlığında kesitler alınır. Fırça yardımıyla 45 derece su banyosuna kesitler atılır. Suda açılan kesitler lama alınır.

İmmünohistokimyasal boyama: (ER, PR, Cerb-B2, p53): Pozitif şarjlı lam üzerine 4 mikronluk kesit, lamın protokol yazılı üst kısmının hemen altına alınır.

Boyama öncesi genel deparaffinizasyon: 60 °C etüvde 60 dakika bekletildikten sonra, ksilen içerisinde 3 kez 10 dakika bekletilmiştir.

Boyama öncesi genel hidratasyon: Sırasıyla saf etil alkol, %96 etil alkol, %90 etil alkol, %70 etil alkol, akan çeşme suyu, saf su içerisinde birer dakika bekletilmiştir.

Antigen açığa çıkarma (retriavel): Düdüklü tencere içinde EDTA tampon çözeltisi içerisinde (pH:8) :1/10 basınç uygulanarak yapılır.

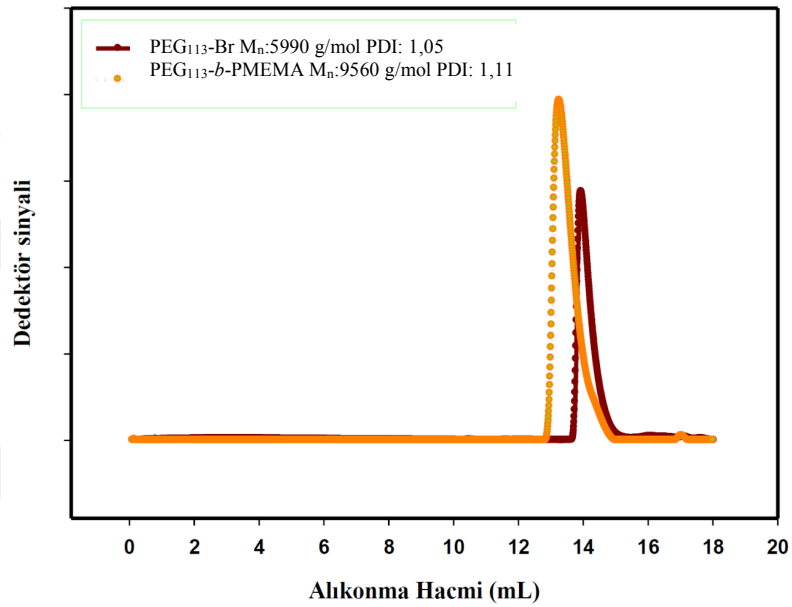
Boyama tekniği: Uygulama kapalı kutu içinde nemli ortamda yapılır. Solüsyonlar lam yüzeyindeki doku üzerini örtecek şekilde damlatılır. Doku sınırlama kalemi ile dokuların etrafı çizilir. Ardından 30 saniye saf su, 10 dakika hidrojen peroksit (%3 sulu), 30 saniye saf su, 3 dakika PBS, (pH:7.4 -3 kez tekrarlanır ve doku sıkılarak kurutulur), 5 dakika Ultra V Blok Solüsyonu, 1 saat primer antibadi (ER, PR, Cerb-B2, p53), 3 dakika PBS (3 kez tekrarlanır ve doku sıkılarak kurutulur), 20 dakika Amplifier, 3 dakika PBS (3 kez tekrarlanır ve doku sıkılarak kurutulur), 20 dakika HRP polimer, 3 dakika PBS (3 kez tekrarlanır ve doku sıkılarak kurutulur), 3 dakika Kromojen, DAB, 30 saniye akan su ile yıkama, 1 dakika Hematoxylin boyası, 1 dakika akan su ile yıkama, 1 dakika %70 etil alkol, 1 dakika %90 etil alkol, 1 dakika %96 etil alkol, 1 dakika saf alkol, 1 dakika 3 kez ksilen.

Monte etme (kapama işlemi): Lam ortasına 3 damla entellan damlatılır. 24x60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatılır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

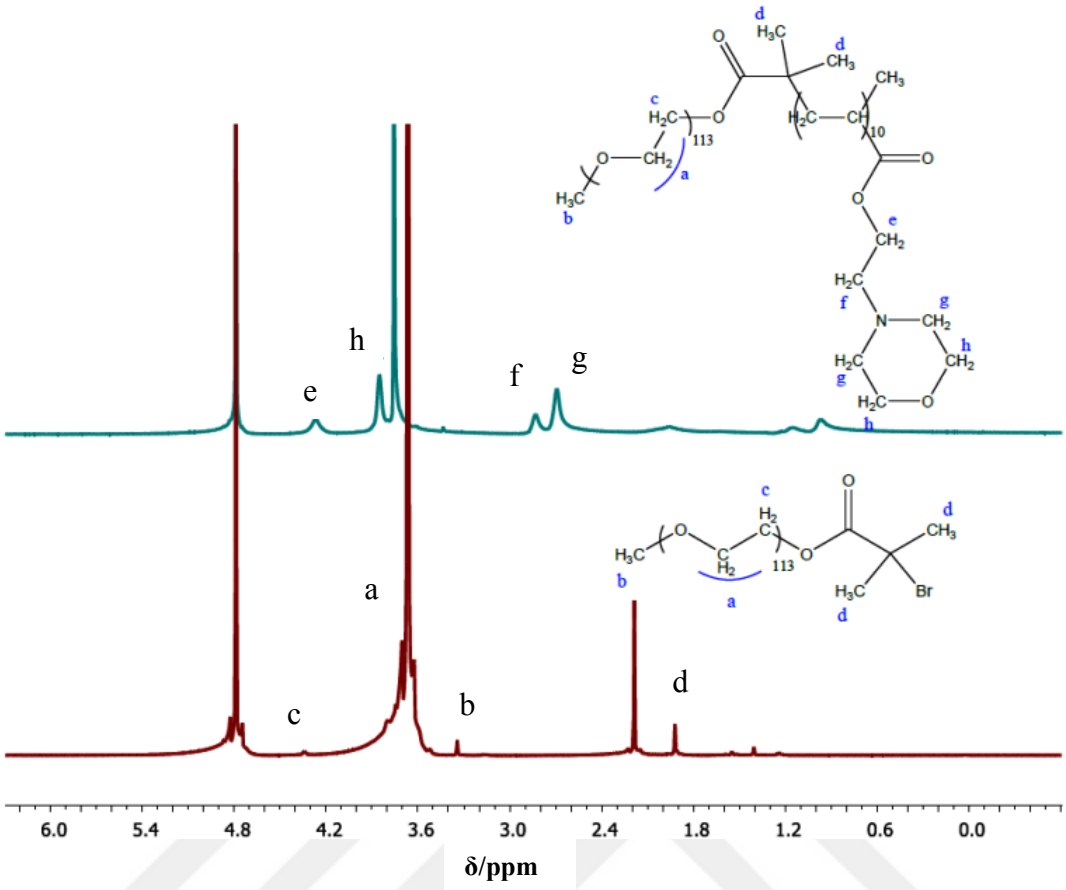
4.1. Mikrojel sentezinde kullanılan blok kopolimerin karakterizasyonu

İlaç taşıyıcı mikrojel ve lipozom/mikrojel sentezinde kullanılan PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimere ait GPC ve ^{1}H-NMR spektrumu sırasıyla Şekil 4.1ve 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. PEG_{113}-Br ve PEG_{113}-*b*-PMEMA blok kopolimere ait GPC kromatogramı

PEG_{113}-Br (PEG_{5000}-Br) ve PEG_{113}-*b*-PMEMA polimerilerine ait GPC kromatogramı incelendiğinde polimerin blok kopolimerin sentezlendiği sonucuna varılabilir. Beklendiği gibi PEG_{113}-*b*-PMEMA blok kopolimer PEG113-Br makrobaşlatıcıdan daha kısa süre kolonda tutunmuştur. PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer D_2O içerisinde çözünmüş ve ardından ^{1}H-NMR spektroskopi analizi yapılmıştır.



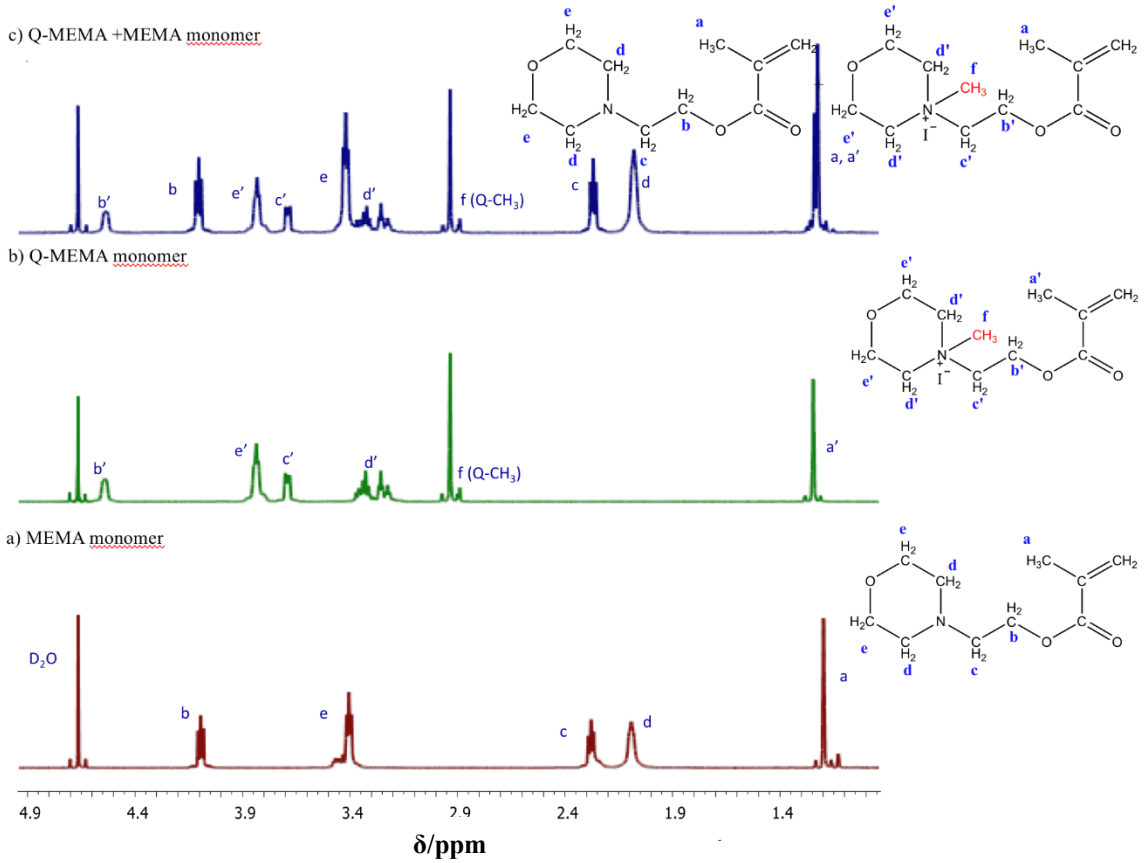
Şekil 4.2. PEG_{113}-Br ve PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer ^{1}H-NMR spektrumu (D_2O)

Uç grup analizi yöntemi ile incelenen ^{1}H-NMR spektrumlarında δ 3,4 değerinde uç gruba ait 3 adet protonun piki görülmektedir. δ 3,4 pikine verilen sabit değer ile diğer piklerin integral alanları hesaplanmıştır. δ 4,0 değerinde gelen pik morfolino halkasında bulunan 4 adet protonun spesifik pikidir. δ 2,6 ve 2,8 değerinde gelen piklerde 2-(*N*-morfolino)etil metakrilat monomerinde bulunan spesifik piklerdir.

4.2. Mikrojel Sentez Çalışmaları

4.2.1. P(MEMA-GMA) mikrojelin çapraz bağlanma mekanizmasının aydınlatılması

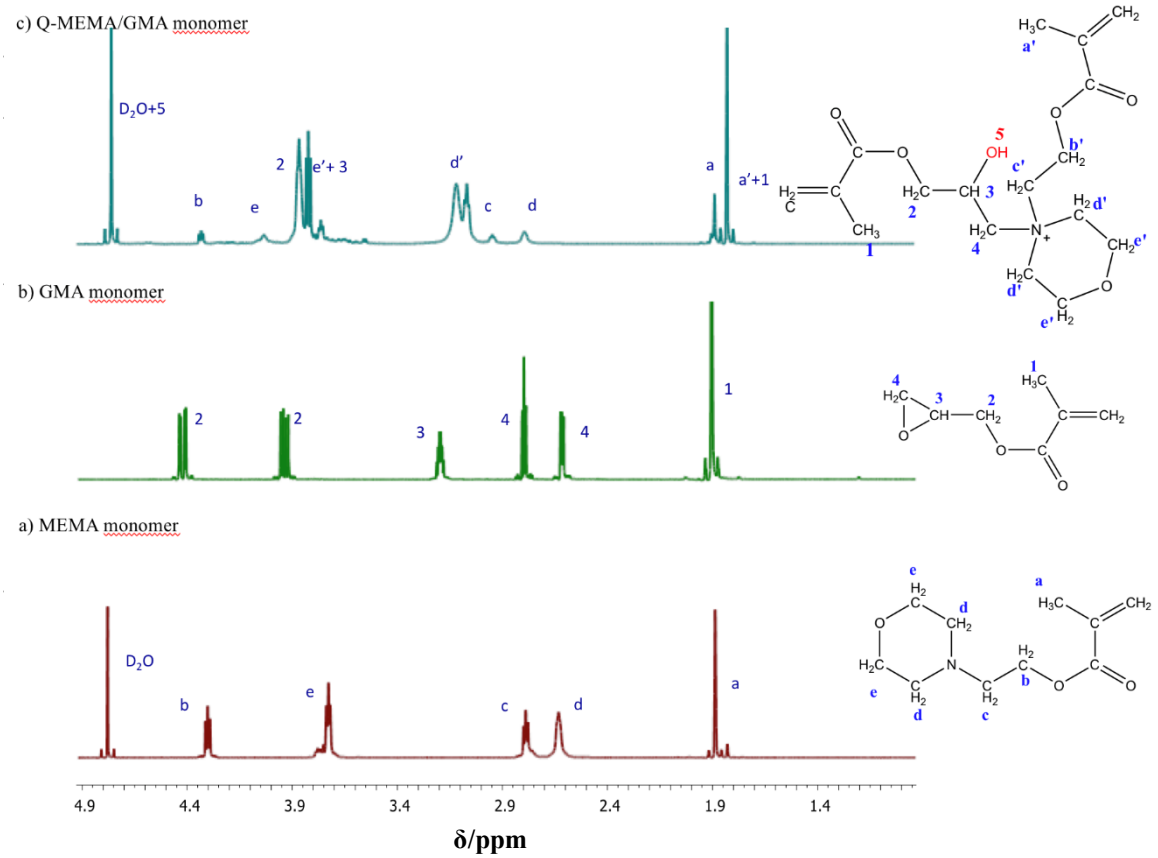
Mikrojel sentezinde kullanılan GMA komonomeri ve aynı zamanda otoçapraz bağlayıcısının bağlanmasına ilişkin tepkimenin ^{1}H-NMR spektrumları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3. a) MEMA, b) Q-MEMA ve c) Q-MEMA+MEMA monomerlerine ait ^{1}H-NMR (D_2O) spektrumu

P(MEMA-GMA) mikrojelin oluşum tepkimesi Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilen ^{1}H-NMR spektrumlarından yararlanılarak aydınlatılmıştır. Şekil 4.3'de MEMA, Q-MEMA ve QMEMA+MEMA monomerlerine ait ^{1}H-NMR spektrumları MEMA halkası üzerindeki azotun kuaternizasyonuna örnek olması için kullanılmıştır. Şekil 4.3-a MEMA monomerine ve Şekil 4.3-b Q-MEMA monomerine ait ^{1}H-NMR spektrumları ayrıntılı olarak incelendiğinde, morfolino halkası üzerinde bulunan azotun metil iyodür ile kuaternizasyonu sonucu azota bağlı –CH_2 ve morfolino halkasında bulanan –CH_2 protonlarının pikleri yaklaşık 2,3 ve 2,0 ppm değerlerinden sırasıyla 3,7 ve 3,3 ppm değerlerine kaydığı

gözlenmektedir. Şekil 4.3-b ^{1}H-NMR spektrumunda morfolino halkasında bulunan azotun kuaternize olmasına ve metil iyodür kaynaklı –CH_3 grubunun azot üzerinden yapıya katıldığına dair en belirgin pik 3,0 ppm değerinde gözlenmektedir. Şekil 4.3-c MEMA ve Q-MEMA monomerlerin ^{1}H-NMR spektrumlarını birlikte göstermektedir.

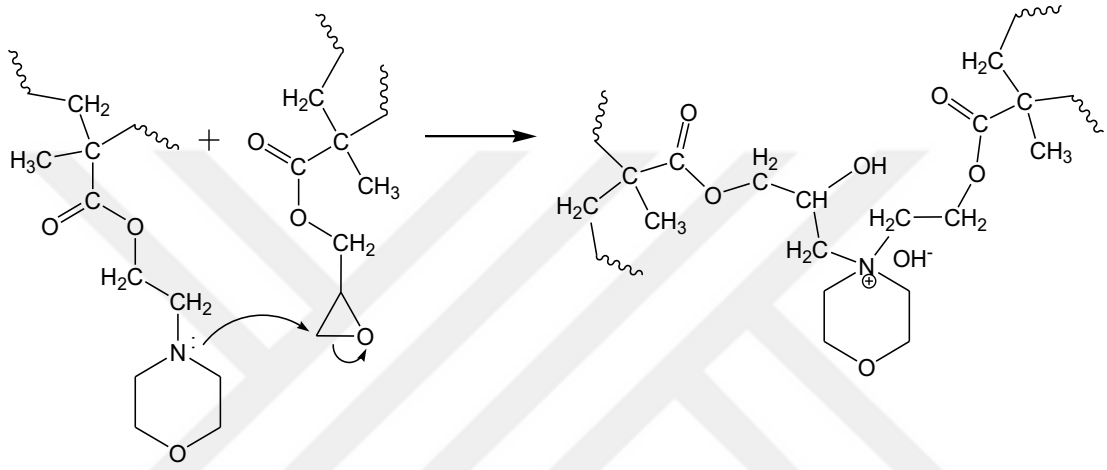


Şekil 4.4. a) MEMA (D_2O), b) GMA($CDCl_3$) ve c) Q-MEMA/GMA (D_2O) monomerlerine ait ^{1}H-NMR spektrumu

MEMA ve GMA monomerlerinin sulu ortamda tepkimeye girmesi ile ilgili yapılan çalışmada 75:25 MEMA:GMA kullanılmıştır. Şekil 4.4-b, GMA monomere ait ^{1}H-NMR spektrumunda epoksi halkası yapısında bulunan –CH_2 grubuna ait pik yaklaşık 2,8 ve 2,6 ppm değerlerinde gözlenmiştir. Şekil 4.3 ve 4.4'de verilen spektrumlar birlikte değerlendirildiğinde MEMA monomer yapısında bulunan azot grubu oldukça elektronegatif olan epoksi halkasının açılmasına sebep olduğu ve kuaternizasyona ait özel pik kaymalarının oluştuğu, ayrıca epoksi halkasının açılmasından kaynaklanan özel pik kaymalarının meydana geldiği açık bir şekilde görülmüştür (Ratcliffe, Ryan et al. 2013). Kuaternize MEMA morfolino gruplarının yanında kuaternize olmayan MEMA monomerlerinin olduğu

da Şekil 4.4-c'de bulunan ^{1}H-NMR spektrumlundan görülmektedir. Özellikle Şekil 4.4-c de 4,0- 4,25 ppm arasında gözlenen pikler kuaternizasyon sonucu MEMA azotu etrafındaki -CH_2 protonlarına işaret etmektedir.

P(MEMA-GMA) mikrojelin bileşenlerinin ayrı ayrı ^{1}H-NMR spektrumları incelendiğinde mikrojelin çapraz bağlanma mekanizmasının Şekil 4.5'de verildiği gibi olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.5. P(MEMA-GMA); GMA komonomeri ile öngörülen otoçapraz bağlanma reaksiyon şeması

Mikrojel sentezi sırasında kullanılan suda çözünen kopolimerin sıcaklığı bulutlanma noktası (cloud-point) 65 ºC olduğu için tepkime sıcaklığı 65 ºC olarak sabit tutulmuştur. Mikrojel sentezinde kullanılmak üzere sentezlenen makrobaşlatıcı, bir ucu metoksi ile kapatılmış PEG homopolimeridir. PEG, hem hidrofilik özellikte olması hem de biyo uyumlu olması (mikrojellerin kullanım alanlarının geliştirilmesi açısından) nedeniyle seçilmiştir (Gigli vd., 2014, Stankovic vd., 2014). Yapılan deneme çalışmalarında pH, sıcaklık, iyonik şiddet etkisi gibi çevre şartlarına duyarlılık açısından en uygun sistem olarak %2,25 oranında stabilizör, %99 MEMA ve %1 GMA oranlarında yapılan mikrojel belirlenmiştir. Fakat bu mikrojel daha sonra yapılan lipozom/mikrojel kompozit için uygun olmadığından, farklı oranlarda yeniden sentezlenen P(MEMA-GMA) mikrojele ait bileşenlerin oranları Çizelge 4.1'de verildiği gibi düzenlenmiştir. Mikrojel sentezinin ardından, tepkimeye girmeyen bileşiklerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlamak için mikrojel 20000 rpm dönme hızında 20 dakika süre ile ultasantrifüj ile çöktürülmüş, ardından H_2O ilave edilerek mikrojel tekrar dağıtılmıştır.

Çizelge 4.1. Mikrojel sentez bileşenleri; 50 mg APS, 22 mL H_2O, 65 ºC sıcaklık, PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ stabilizör, 1000 rpm karıştırma hızı

Stabilizör (% m)	***Monomer MEMA (% v)**	***Komonomer GMA (% v)**
2,25	97,5	2,5

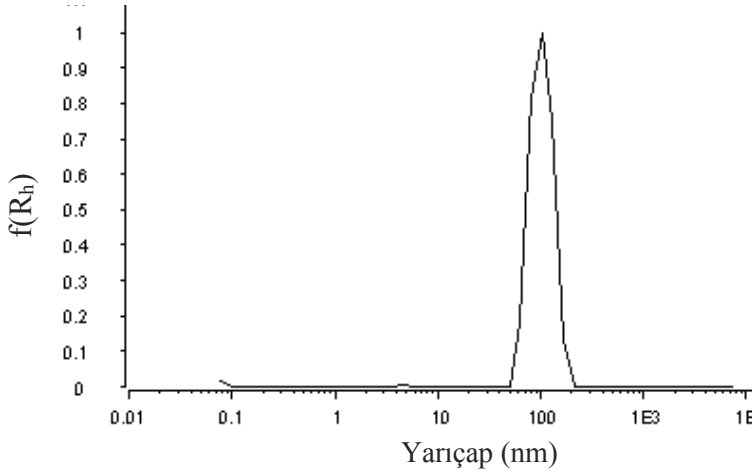
*MEMA monomer/GMA komonomer oranları birbirlerine göre hacimce verilmiştir.

4.2.2. P(MEMA-GMA) mikrojelin boyut ve boyut dağılım analiz çalışmaları

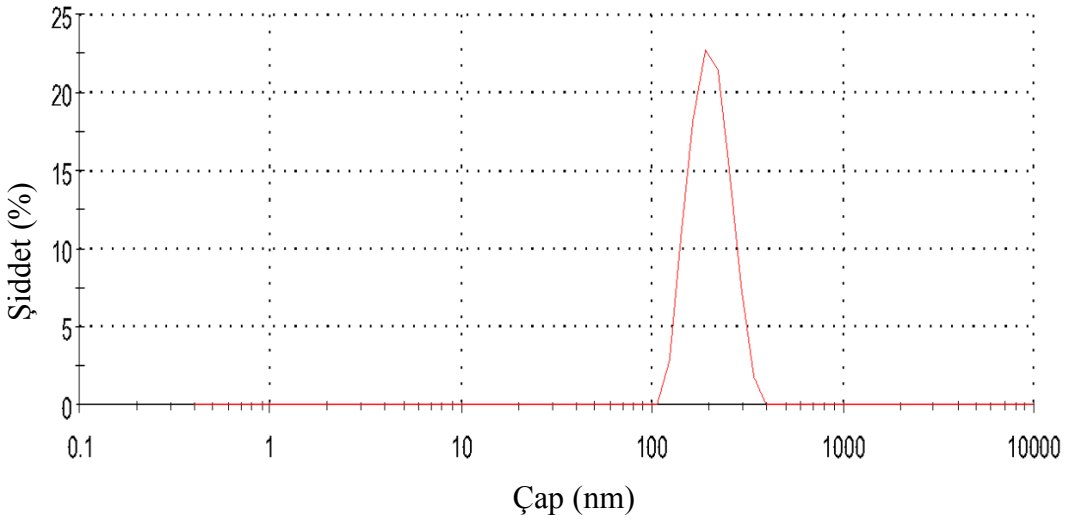
Sentezlenen mikrojellerin boyut ve boyut dağılım analizi DLS, yapısal karakterizasyonu TEM ile incelenmiştir. Mikrojellerin boyut dağılımı ve yapısal görüntüleri sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verilmiştir.

P(MEMA-GMA) mikrojelin boyut analizi ve boyut dağılım analizine ait DLS sonuçlarına göre sulu dispersiyonda mikrojelin hidrodinamik yarıçapı 96,7 nm olarak, partikül dağılımı olan PDI değeri ise 0,06 olarak kaydedilmiştir.

P(MEMA-GMA) mikrojelin boyut analizi 12 tekrar ile zetasizer kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlara göre mikrojelin sulu dispersiyonunda hidrodinamik çap yaklaşık 205 nm olarak, partikül dağılımı PDI değeri 0,04 olarak, standart sapma değeri ise 48,3 nm olarak belirlenmiştir.

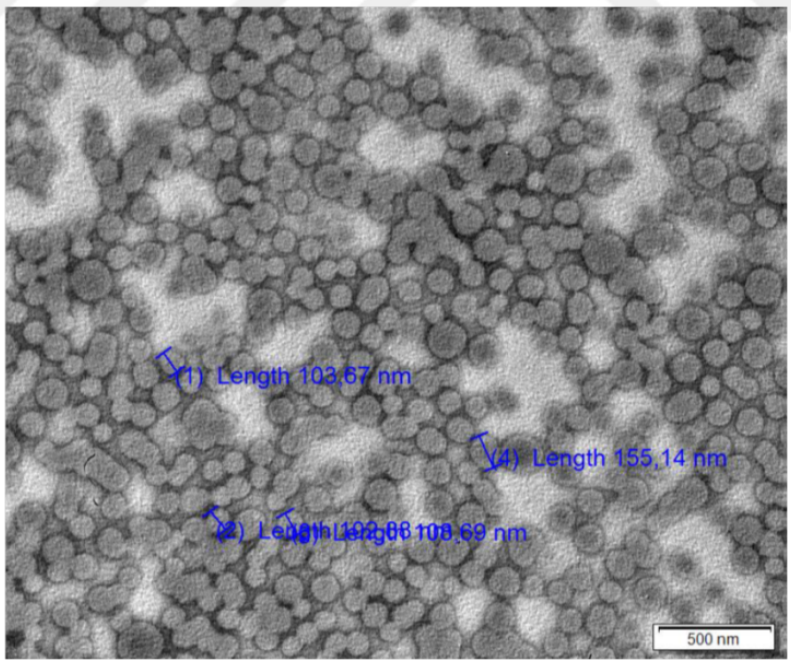


Şekil 4.6. P(MEMA-GMA) mikrojelin hidrodinamik yarıçap dağılımı (DLS) 24 °C, pH 7.0



Şekil 4.7. P(MEMA-GMA) mikrojelin hidrodinamik çap dağılımı (Zetasizer- DLS)

P(MEMA-GMA) mikrojelin yapısal karakterizasyonu TEM ile yapılmıştır. Şekil 4.8'de verilmiş olan, yüksek vakum altında freeze-dryer ile kurutulan, mikrojellerin boyut dağılımı 100-150 nm arasında olduğu belirlenmiştir.



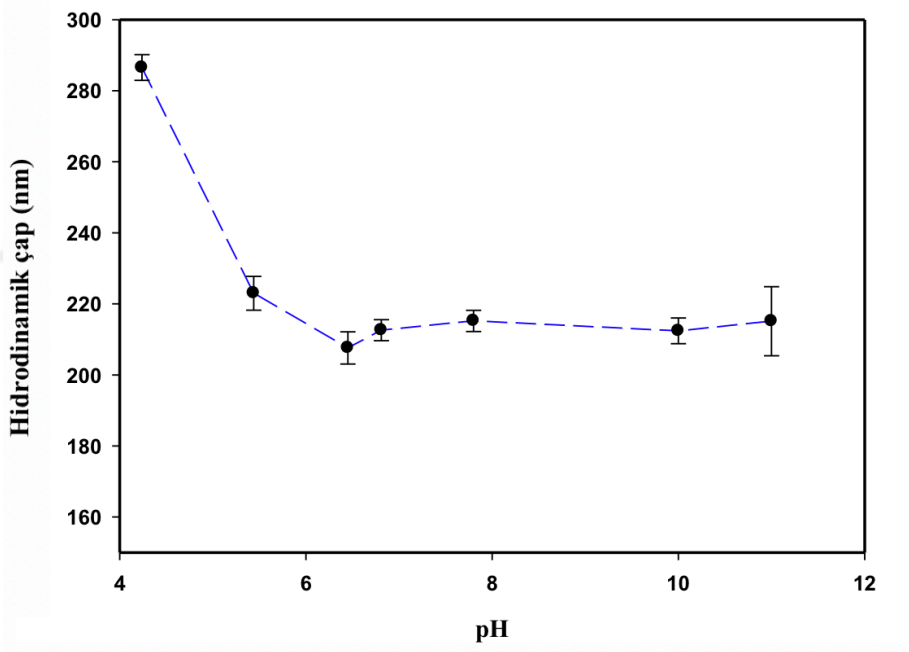
Şekil 4.8. P(MEMA-GMA) mikrojelin yapısal karakterizasyonu (TEM 30 kV)

4.3. P(MEMA-GMA) Mikrojelin Çevre Duyarlılık Çalışmaları

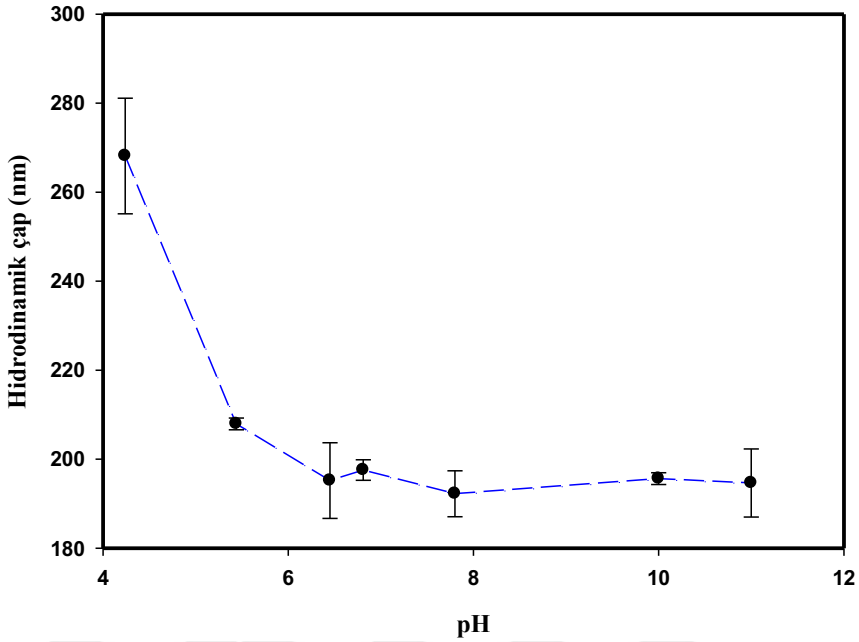
P(MEMA-GMA) mikrojel pH, sıcaklık, iyonik derişimi gibi çoklu çevre etkilerine duyarlı bir mikrojeldir (Butun vd., 2011, Tuncer vd., 2015). Bu çalışmada ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan P(MEMA-GMA) mikrojelin çevre duyarlılık çalışması DLS ve zetasizer ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 P(MEMA-GMA) mikrojelin pH duyarlılık çalışmaları

Mikrojelin pH değişimine karşı hidrodinamik çapında meydana gelen değişim pH 4 ile 11 arasında değişen değerler için DLS ve Zetasizer ile incelenmiştir. İlgili çalışmaları sonuçları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. DLS ile P(MEMA-GMA) mikrojelin pH duyarlılık çalışması

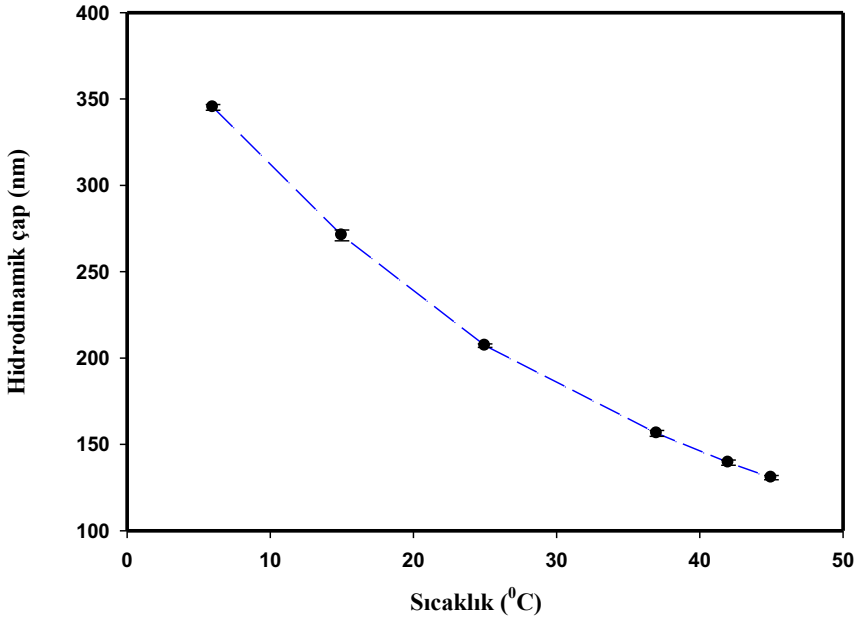


Şekil 4.10. Zetasizer ile P(MEMA-GMA) mikrojelin pH duyarlılık çalışması (pH=7)

%2,25 oranında stabilizör ve %2,5 oranında GMA komonomer içeren mikrojelin pH değişimi ile çapında meydana gelen değişim grafikleri Zetasizer ve DLS kullanılarak ortaya konulmuştur. Grafiklerden görülebileceği gibi mikrojellerin çapında pH artışı ile azalma meydana gelmiştir. Zetasizer ve DLS ile sonuçları birbirlerine paralel sonuçlar ortaya koymuştur. P(MEMA-GMA) mikrojellerde meydana gelen çap değişimi yaklaşık %25 olarak kayıt edilmiştir. Tüm çalışmalar üç kez tekrar edilmiştir. Mikrojelin boyut dağılımı PDI değerleri pH çalışmasında 0,08 ±0,02 olarak ölçülmüştür.

4.3.2 P(MEMA-GMA) mikrojelin sıcaklık duyarlılık çalışmaları

P(MEMA-GMA) mikrojelin sıcaklık değişim ile hidrodinamik çapta meydana gelen değişim DLS ile üç ölçüm yapılarak takip edilmiş ve ilgili grafik Şekil 4.11'de verilmiştir.

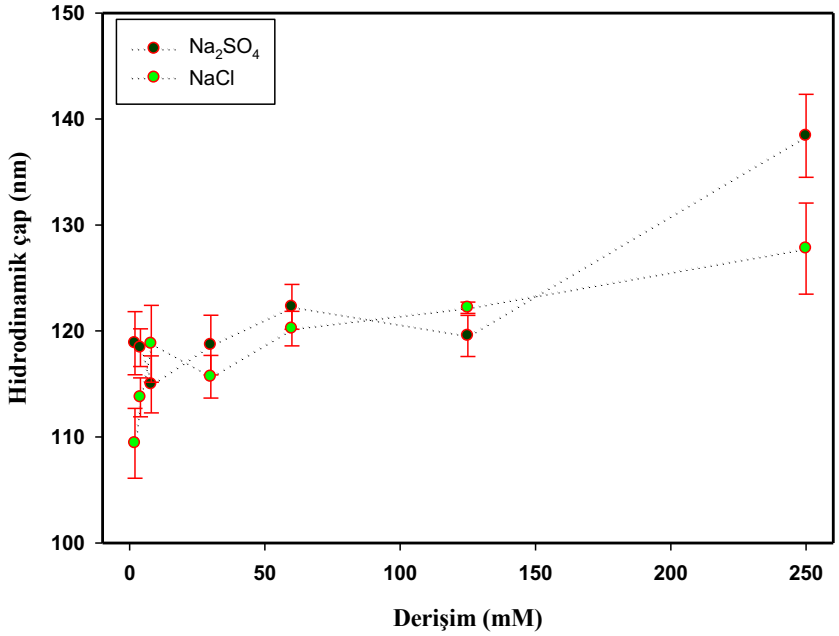


Şekil 4.11. DLS ile P(MEMA-GMA) mikrojelin sıcaklık duyarlılık çalışması (pH=7)

Görüleceği gibi P(MEMA-GMA) mikrojelin hidrodinamik çapı sıcaklık artışı ile azalmıştır. Hidrodinamik çapta meydana gelen değişim %60 oranındadır. Mikrojelin sıcaklık değişimi ile boyut dağılımı PDI değeri 0,06 ±0,01 olarak bulunmuştur.

4.3.3. P(MEMA-GMA) mikrojelin iyonik şiddet duyarlılık çalışmaları

P(MEMA-GMA) mikrojelin Na_2SO_4 ve NaCl değişimi ile hidrodinamik yarıçapında meydana gelen değişim DLS cihazı ile aydınlatılmıştır. İlgili çalışmanın sonucu Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. DLS ile P(MEMA-GMA) mikrojelin Na_2SO_4 ve NaCl duyarlılık çalışması

Mikrojelin hidrodinamik yarıçapında Na_2SO_4 ve NaCl iyon derişimlerinin artması ile meydana gelen değişim incelendiğinde, her iki derişim artışının yaklaşık aynı eğilim ile hidrodinamik çap artışına sebep olduğu görülmüştür. P(MEMA-GMA) mikrojelin Na_2SO_4 ve NaCl derişiminin artması ile hidrodinamik çapında meydana gelen değişim yaklaşık %15, oranındadır. 2-250 mM derişimleri arasında Na_2SO_4 ve NaCl içeren iki dispersiyondaki farklı iyon türlerinin mikrojelin hidrodinamik çapı üzerine farklı oranda etki gösterdiği gözlenmiştir. Na_2SO_4 ile yapılan çalışmada mikrojel boyut dağılımı PDI 0,08±0,02 iken NaCl değişimi çalışmasında PDI 0,08 ±0,01 olarak belirlenmiştir.

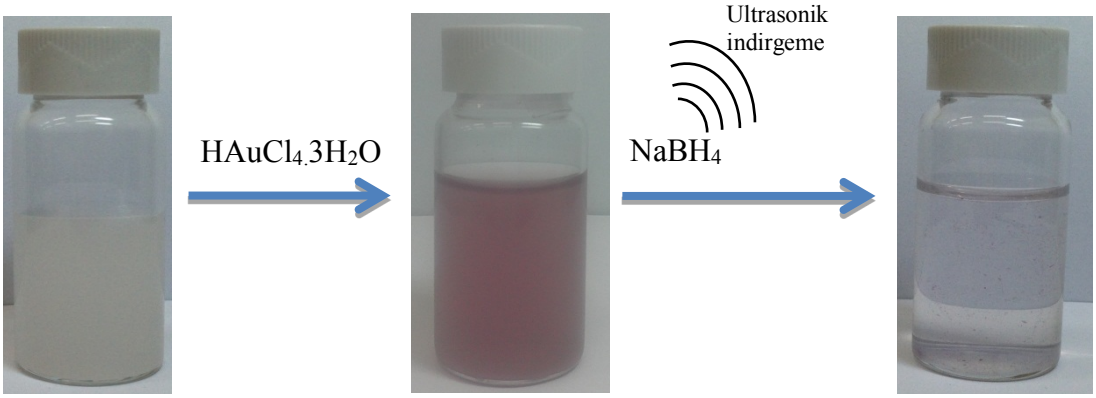
4.4. Mikrojel Bünyesinde AuNPs Sentezi

Mikrojel bünyesine nanopartikül sentezi için kullanılan $HAuCl_4.3H_2O$ miktarları Çizelge 4.2'de verilmiştir. AuNPs sentezinde indirgeyici ajan olarak $NaBH_4$ literatüre uygun olarak kullanılmıştır (Hu, Yin et al. 2011). P(MEMA-GMA) bünyesinde maksimum miktarda metal sentezinin sağlanması amacıyla 6 farklı oranda çalışılmıştır.

Çizelge 4.2. P(MEMA-GMA) mikrojel bünyesinde Au nanopartikül sentezi; %0,1 mikrojel çözeltisi 10 mL H_2O içerisinde kullanılmıştır.

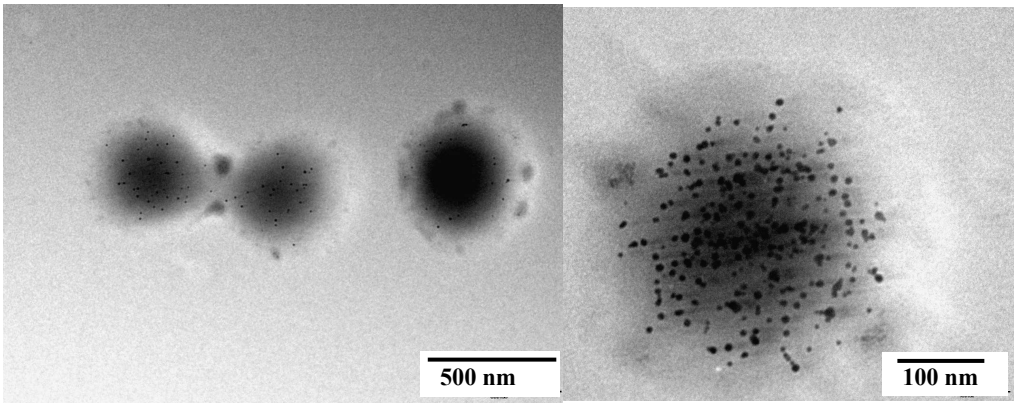
Numune Kodu	$HAuCl_4.3H_2O$ (mmol)	AuNPs (mg)
AuNPs-1	$0,2x10^{-3}$	0,05
AuNPs-2	$0,5\ x10^{-3}$	0,1
AuNPs-3	$1,0x10^{-3}$	0,2
AuNPs-4	$2,5x10^{-3}$	0,5
AuNPs-5	$3,8x10^{-3}$	0,75
AuNPs-6	$5,0x10^{-3}$	1,0 (stabilizasyon yok)

AuNPs'nin sentez çalışmalarında yükleme ve indirgeme ultrasonik banyoda yapılmıştır. Bu sayede sentezlenen NPs'de metaller mikrojel içerisinde sentezlenmiştir. P(MEMA-GMA) sentezi sırasında mikrojel bünyesinde kontrollü nanopartikül sağlanması amacıyla metal tuzlarının mikrojelin yüzeyinde değil içinde olması amaçlanmıştır. Bu sebeple ultrasonik banyo kullanılmıştır. Ultrasonik banyo kullanılarak elde edilen sistemlerde beklenmedik bir sonuç ile karşılaşılmıştır. $NaBH_4$ ilavesi ile indirgeme yapıldıktan sonra oluşan rengin kaybolmasıdır. AuNPs-4 kodlu nanopartikül/P(MEMA-GMA) mikrojel sentezinde, %0,1'lik P(MEMA-GMA) mikrojel çözeltisine farklı miktarlarda $HAuCl_4.3H_2O$ ilave edilmiş ve indirgemeden önce pembe renk elde edilmiştir. Ultrasonik banyoda yapılan indirgemeden sonra çözeltinin rengi kaybolmuş ve çözelti berraklaşmıştır (Şekil 4.13).

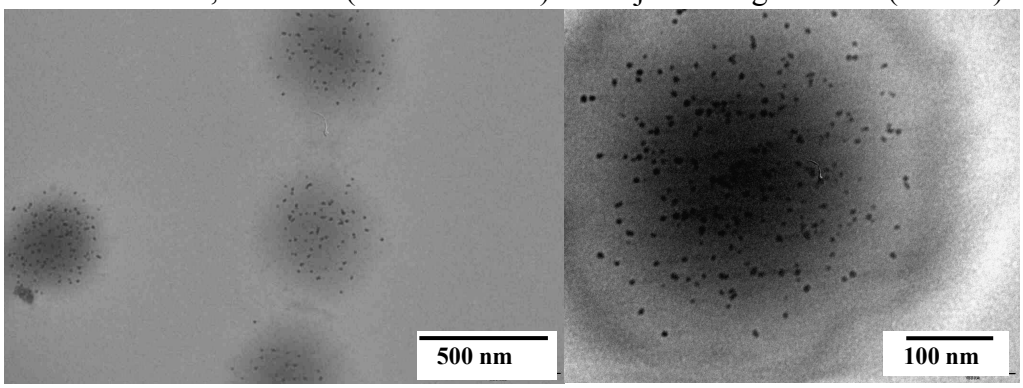


Şekil 4.13. AuNPs-4 kodlu nanopartikül/P(MEMA-GMA) sentezi

AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojellerin yapısal karakterizasyon çalışmaları TEM ile gerçekleştirilmiştir. İki farklı sistem için görüntüler Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.14. AuNPs-4, AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel TEM görüntüsü (200 kV)



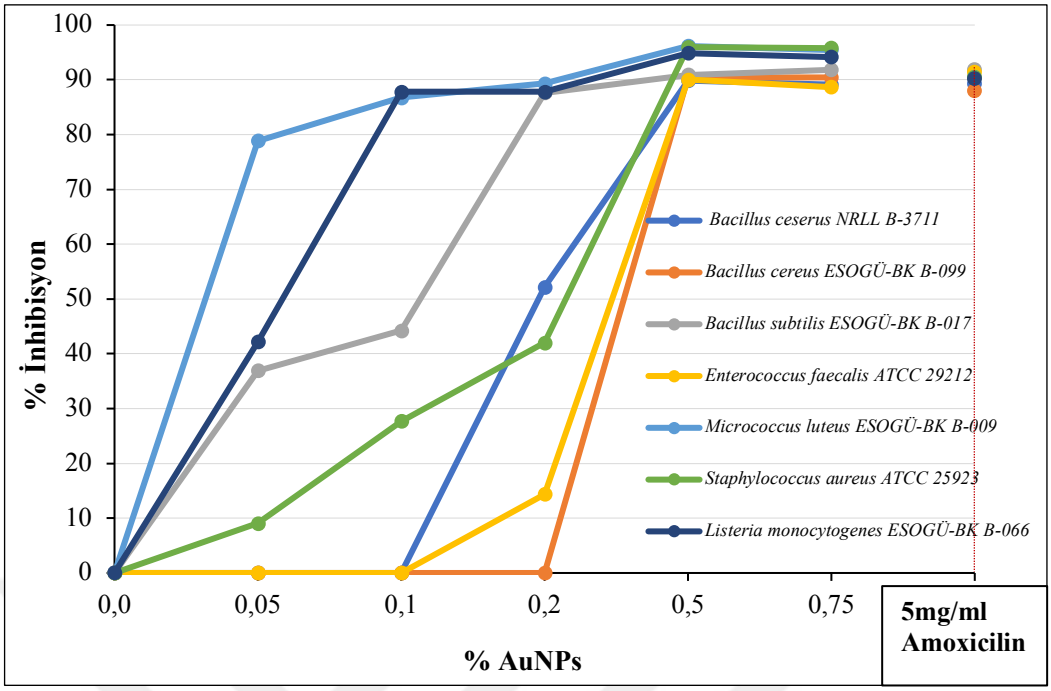
Şekil 4.15. AuNPs-5, AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojelin TEM görüntüsü 200 kV

Yukarıda verilen TEM görüntülerinde görülebileceği gibi AuNPs mikrojelin içinde başarı ile sentezlenmiştir. Sentez sırasında $HAuCl_4.3H_2O$ miktarının artırılması ile mikrojel bünyesinde maksimum AuNPs yükleme çalışması da yapılmıştır. $HAuCl_4.3H_2O$ miktarının artışı mikrojel çapının artmasına, AuNPs'de ise nanopartikül çapının azalmasına sebep olmuştur. Ortalama AuNPs boyutunun 10-15 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni mikrojelin tuz ilavesi ile hidrodinamik yarıçapındaki artışa paralellik göstermesidir. Artan miktarda $HAuCl_4.3H_2O$ kullanılarak sentezlenen AuNPs sistemlerin antibakteriyel etkinlikleri de tez kapsamında incelenmiştir.

4.5. AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemlerin antibakteriyel etkinlik çalışması

AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemlerin için yapılan antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında AuNPs içermeyen sistem, amoxicillin ve ketokonazol miktarları sabit tutulmuştur. Her bir bakteri ve maya üzerinde AuNPs-4 kodlu AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemin etkisi artan miktarlarda takip edilirken edilmiştir. Grafiklerde verilen sonuçlar amoxicillin veya ketokonazol antibiyotiklerinin ilgili bakteri veya maya üzerindeki etkinliği ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca grafikte verilen sonuçlarda amoxicillin ve ketokonazol miktarı 5mg/ml derişimindedir.

AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemlerin antibakteriyel etkinlik çalışmalarda gram pozitif bakterilerden, tarla, bahçe ürünlerinde, et ve süt ürünlerinde bulunabilen *Bacillus cereus* (NRLL B-3711 ve ESOGÜ-BK B-099), bitki ve toprakta bulunan *Bacillus subtilis* ESOGÜ-BK B-017, insan ve diğer memeliler için sindirim sistemini olumsuz etkileyen ve hastane kaynaklı bakteri olan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212**,** su, hava toprakta bulunan ve doğal olarak memeli derisinde bulunan fakat bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde patojen etki gösteren *Micrococcus luteus* ESOGÜ-BK B-009, insan cilt florasında bulunan fakat bağışıklık sistemi zayıf kişilerde iyileşmeyi geciktiren bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ölümcül olabilen ve merkezi sinir sistemi hastalıklarına sebep *Listeria monocytogenes* ESOGÜ-BK B-066 türü bakteriler üzerine etkinlik çalışmaları yapılmıştır. Gram pozitif bakteriler üzerine AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemin etkisi Şekil 4.16'da verilmiştir.

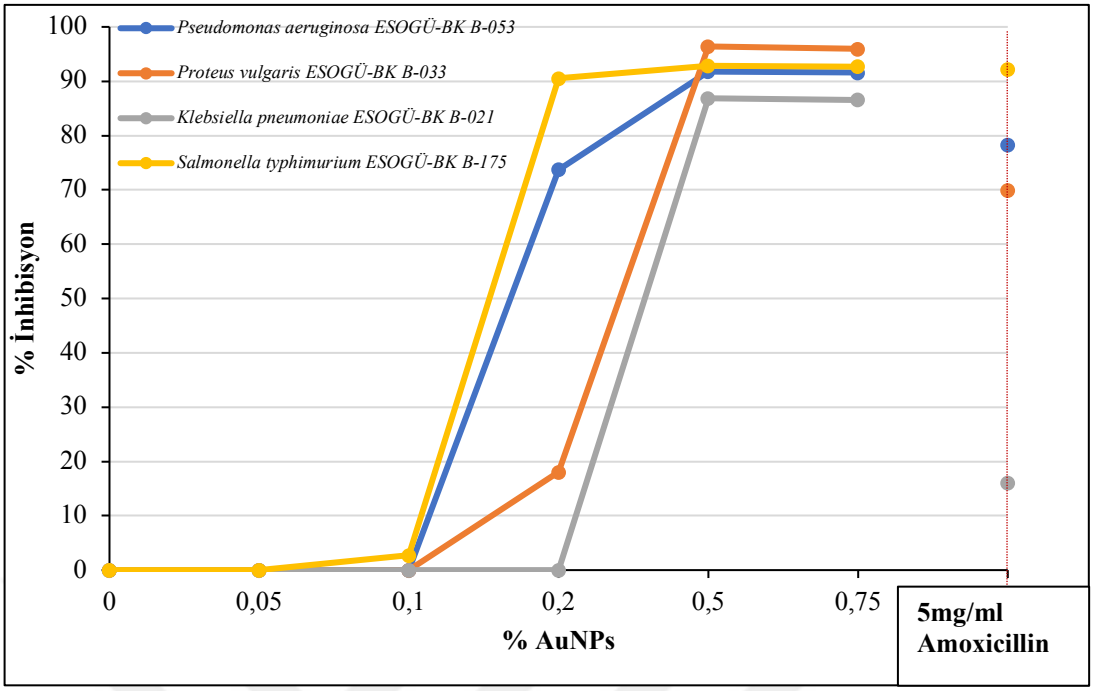


Şekil 4.16. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin gram pozitif bakteriler üzerine etkisi

Farklı oranda AuNPs içeren AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemin gram pozitif bakteriler üzerine etkisi amoxicillin antibiyotiğe karşı incelendiğinde, AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemin %0,5 ve %0,75 oranlarında antibiyotikle aynı seviyede etkili olduğu gözlenmiştir.

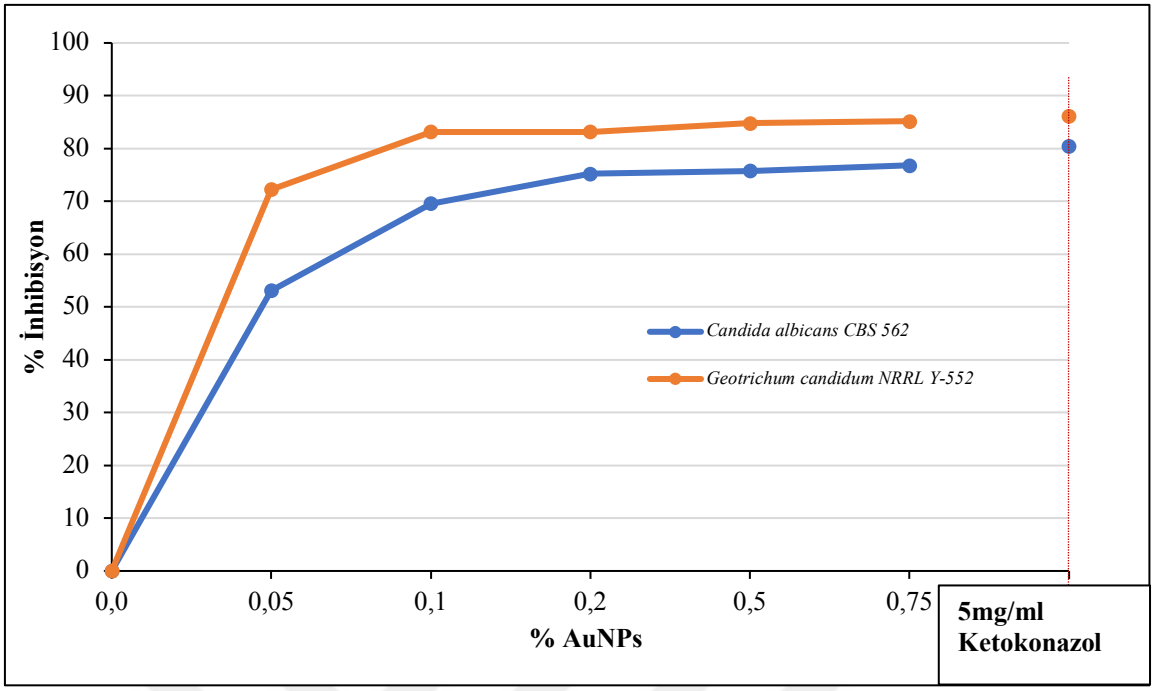
AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemlerin gram negatif bakteriler üzerine antibakteriyel etkinlik çalışmaları bitki hayvan ve insanları etkileyen özellikle hastanede kazanılan enfeksiyonlardan kaynaklı hastalıklara sebep olan *Pseudomonas aeruginosa* ESOGÜ-BK B-053, normal şartlarda ağız, deri ve bağırsakta bulunan fakat akciğerde varlığında insan ve diğer memelilerde olumsuz etkilere sebep olan hastane enfeksiyonlarından *Klebsiella pneumoniae* ESOGÜ-BK B-021, mide ve bağırsak hastalıklarına sebep olan *Salmonella typhimurium* ESOGÜ-BK B-175, insan ve hayvanların bağırsaklarında yaşayan, toprak su ya da dışkıda bulunan ve yara enfeksiyonu idrar yolu enfeksiyonuna sebep olan *Proteus vulgaris* ESOGÜ-BK B-033 kullanılarak yapılmıştır.

Gram negatif bakteriler üzerine AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemin etkisi Şekil 4.17'de verilmiştir. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemlerde %0,5 ve %0,75 oranında AuNPs içeren sistemlerin amoxicillin antibiyotikten daha etkin olduğu ortaya koyulmuştur.



Şekil 4.17. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin gram pozitif bakteriler üzerine etkisi

AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemlerin ayrıca *Candida albicans* CBS 562 ve *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 mantarları üzerine antifungal etkinliğini de incelenmiştir. *Candida albicans* AIDS, kanser kemoterapi, organ nakli hastalarının zayıflayan bağışıklık sistemlerini ölümcül derece tehdit eden enfeksiyonlardır. Bağışıklık sistemi zayıf olmayan kişiler içinde hastanelerde edinebilecek bu mantar sindirim sistemi, ağız ya da vajina enfeksiyonlarına sebep olabilir. *Geotrichum candidum* deride ya da tükürükte ya da dışkıda bulanan bu mantar türü ise akciğer ya da diğer organlarda hastalık yapıcı bir türdür. Şekil 4.18'de mantarlar üzerine AuNPs/P(MEMA-GMA) sistemleri etkisi verilmiştir.



Şekil 4.18. AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin mantarlar üzerine etkisi

Candida albicans ve *Geotrichum candium* mantarları üzerine AuNPs /P(MEMA-GMA) sistemlerin etkinliği incelendiğinde, %0,1 AuNPs içeren sistemin dahi ketokonazol antibiyotik ile aynı oranlarda etki ettiği görülmüştür.

4.6. Fe_3O_4 Manyetik NPs/Mikrojel Kompozit Sistemin Sentezlenmesi

P(MEMA-GMA) mikrojel içerisinde $FeCl_3.6H_2O$ ve $FeCl_2.4H_2O$ bileşikleri kullanılarak hazırlanan Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin manyetik alana yönlenmesi yaklaşık 15 saniye gibi çok kısa bir süre içerisinde gerçekleşmiştir.

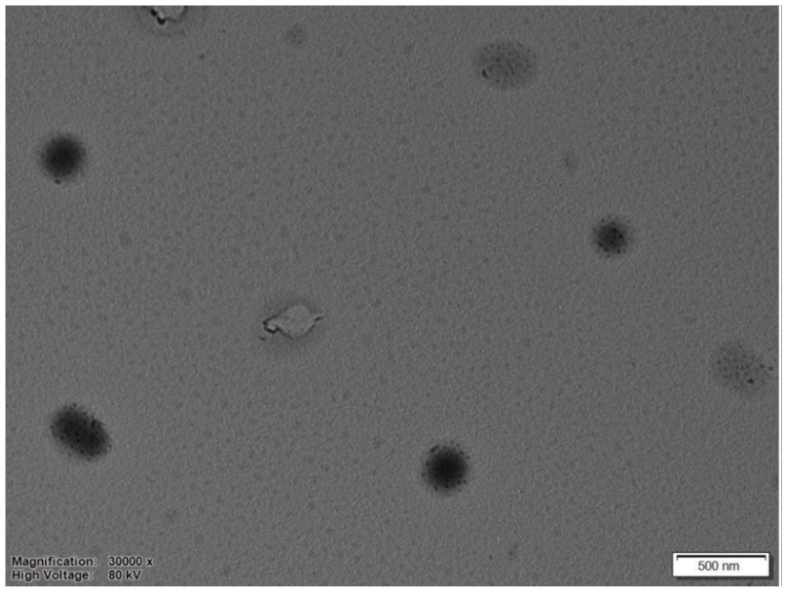
Hazırlanan Fe_3O_4 manyetik NPs/mikrojel kompozit sistemlerin dijital görüntüleri Şekil 4.19'de verilmiştir.



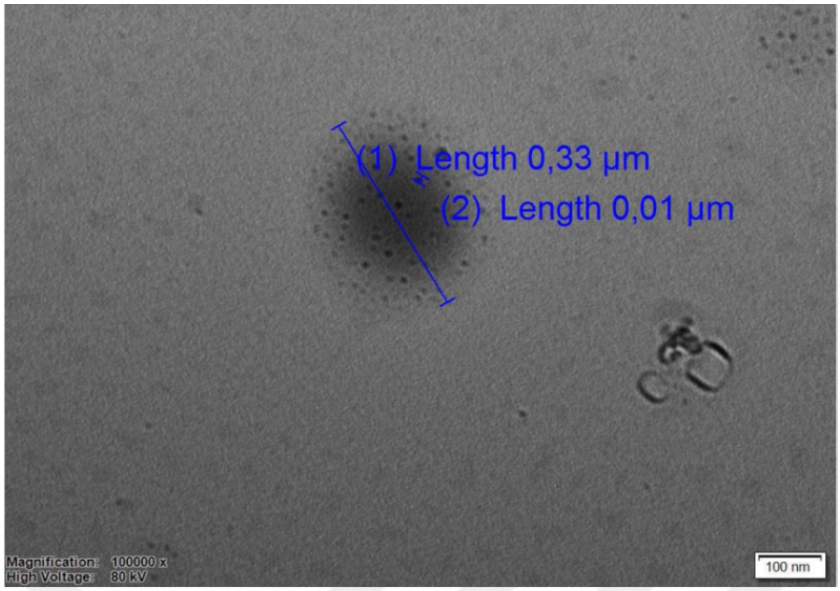
Şekil 4.19. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin manyetik alana yönlenmesine ait dijital görüntüler

4.6.1. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem karakterizasyonu

P(MEMA-GMA) mikrojel içerisinde Fe_3O_4 manyetik nanopartikül varlığı TEM ile ortaya konmuştur. Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de görüldüğü gibi mikrojel içerisinde Fe_3O_4 sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Boyutu yaklaşık 200 nm olan miokrojeller içerisinde neredeyse monodispers dağılmış yaklaşık 15 nm çapındaki Fe_3O_4 manyetik NPs net bir şekilde görülmektedir.

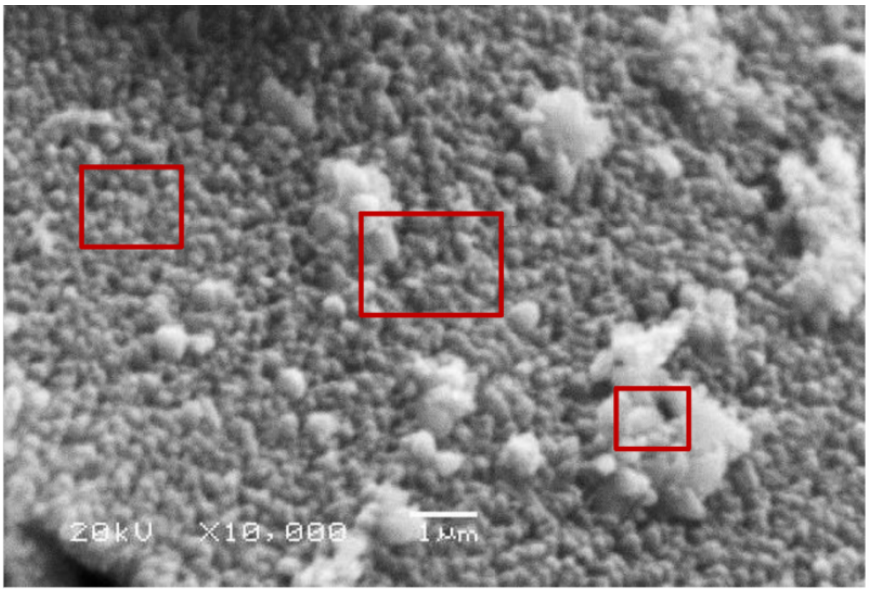


Şekil 4.20. Fe_3O_4 manyetik NP/sP(MEMA-GMA) mikrojel kompozitin TEM görüntüsü (80 kV)



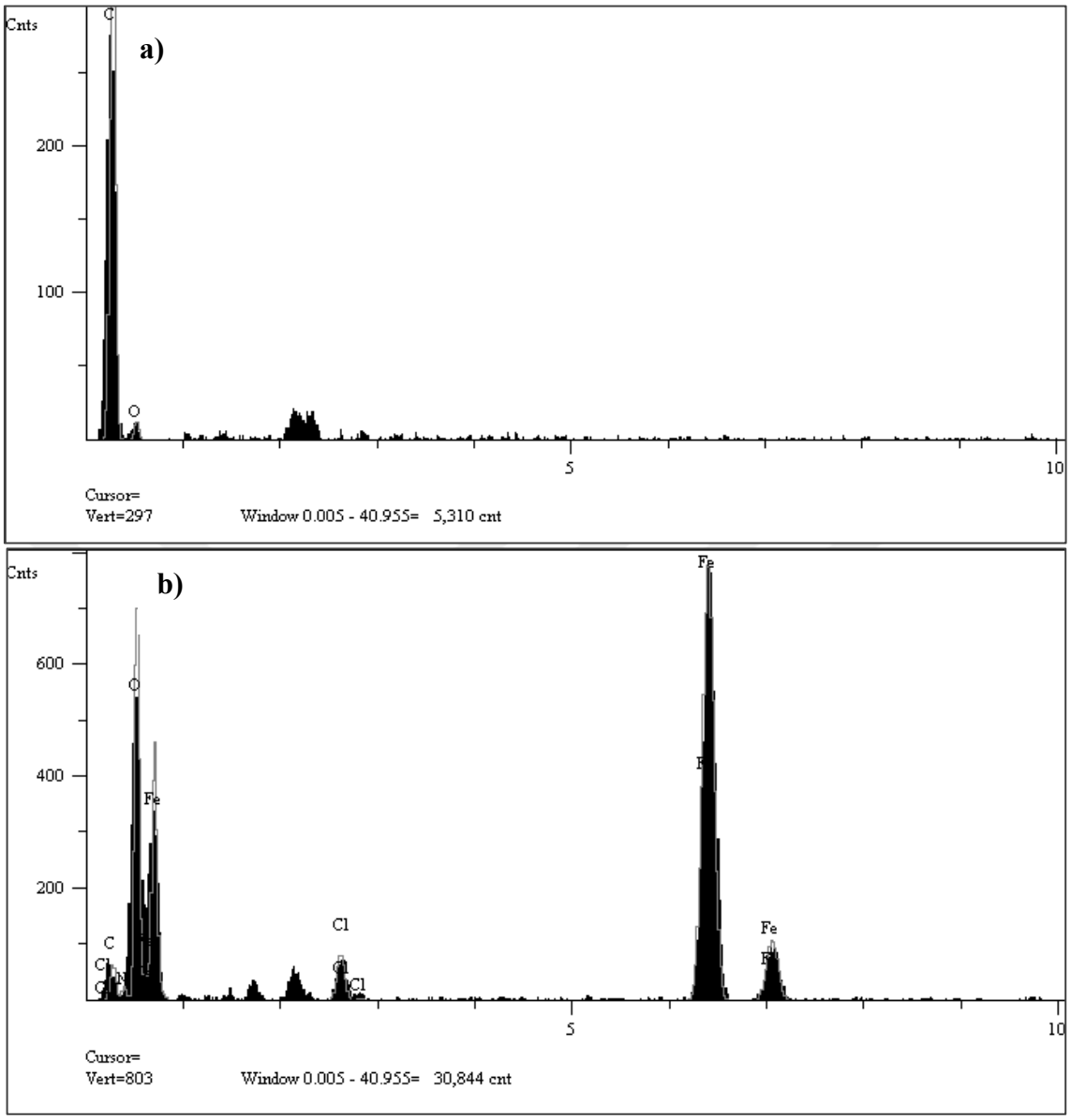
Şekil 4.21. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozitin TEM görüntüsü (80 kV)

Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin manyetik alana yönlenme hızı 15 saniye gibi kısa bir zaman içerisinde meydana gelmiştir. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin içerisinde bulunan elementlerin kantitatif analizi SEM bağlantılı EDX cihazı kullanılarak aydınlatılmıştır.



Şekil 4.22. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin SEM görüntüsü (20 kV)

İlgili SEM görüntüsü Şekil 4.22'de, EDX cihazı ile yapılan kalitatif analiz Şekil 4.23'de, kantitatif analiz sonuçları P(MEMA-GMA) mikrojel ve Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem için Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.23. a) P(MEMA-GMA) mikrojel b) Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin kalitatif EDX analizi

Çizelge 4.3. P(MEMA-GMA) mikrojelin kantitatif EDX analizi

Element	% m/m	
C	83,857	
O	16,143	
	100.000	Toplam

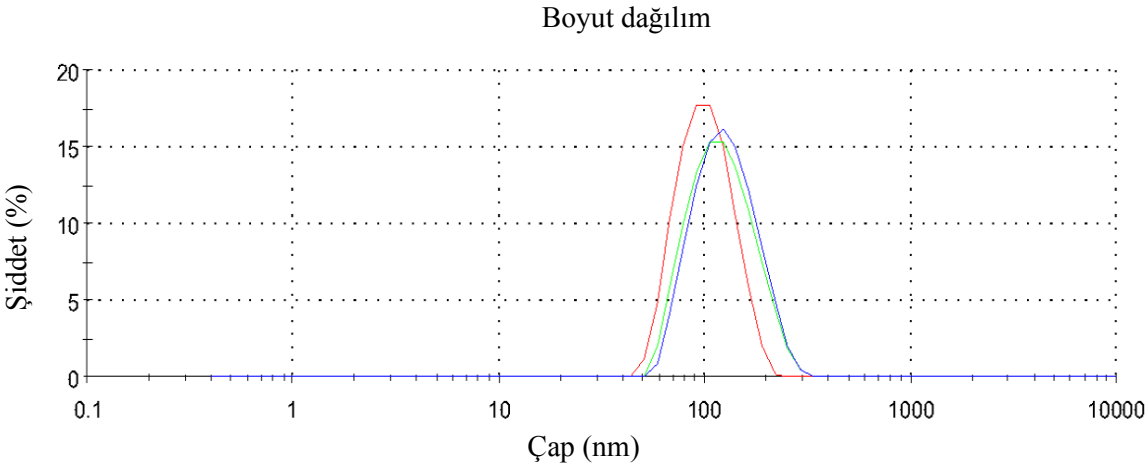
Çizelge 4.4. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin EDX alanizi

Element	% m/m	
C	7,799	
N	1,796	
O	31,013	
Cl	1,957	
Fe	57,434	
	100.000	Toplam

4.7. Lipozom

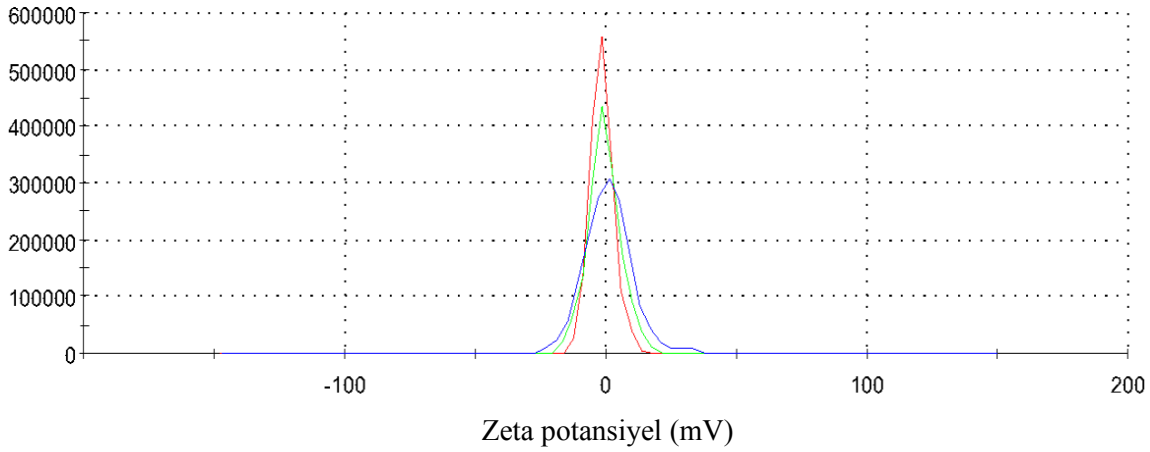
4.7.1. DPPC lipozomun yapısal karakterizasyonu

DPPC lipozomun hidrodinamik boyut analizi ve zeta potansiyeli ölçülmüş ve Şekil 4.42'de verilmiştir. Ayrıca lipozomlar TEM ile de Şekil 4.25'de verildiği gibidir.



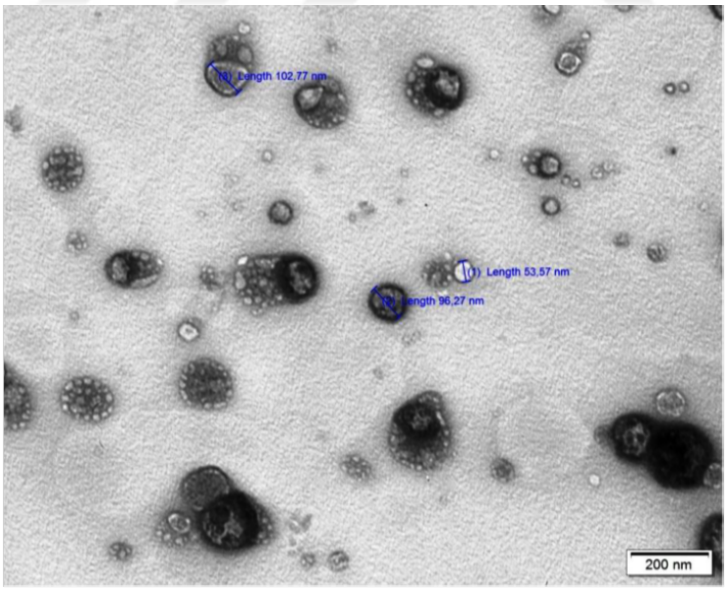
Şekil 4.24. DPPC lipozoma ait hidrodinamik çap (nm) ölçüm sonuçları (Zetasizer)

DPPC lipozoma ait zetasizer sonuçları incelendiğinde, lipozomun ortalama çapının 108 nm olduğu görülmektedir. Ayrıca zetasizer ile alınan ölçümlere göre lipozomun boyut dağılımını yansıtan PDI değeri 0,08 olarak ölçülmüştür.

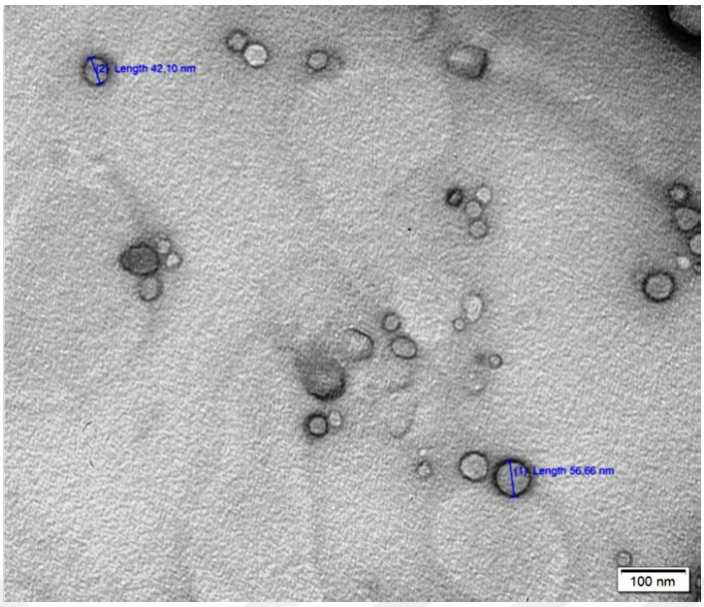


Şekil 4.25. DPPC lipozoma ait zeta potansiyometre ölçüm sonuçları

DPPC lipozoma ait zeta potansiyometre sonuçları incelendiğinde zeta potansiyel ortalaması -0,37 mV olarak ölçülmüştür. DPPC lipozomun yapısal karakterizasyonu 100 nm ve 50 nm polikarbonat filtreden geçirildikten sonra ayrı ayrı TEM ile incelenmiş ve görüntüler Şekil 4.26 ve 4.27'de verilmiştir. 50 nm polikarbon membran kullanılarak hazırlanan DPPC lipozomların daha küçük ve homojen dağılımda olduğu görülmüştür.



Şekil 4.26. DPPC lipozoma ait TEM görüntüleri (60 kV,100 nm polikarbonat membran)



Şekil 4.27. DPPC lipozoma ait TEM görüntüleri (100 kV, 50 nm polikarbonat membran)

DPPC lipozomun zetasizer ölçümlerinden elde edilen PDI değerinin 0,08 olarak ölçülmesi lipozomun monodispers yapıda olduğunu göstermekte, ayrıca TEM görüntüleri incelendiğinde ölçümlerin zetasizer sonuçları ile tutarlılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

4.8. Lipozom/Mikrojel Kompozit Sistemlerin Duyarlılık Çalışması

DPPC lipit kullanılarak hazırlanan lipozom/mikrojel kompozit sistemin çevre duyarlılık çalışmalar biyolojik sistemlere uygunluk göstermesi açısından PBS tampon çözelti ile yapılmıştır. Farklı derişimlerde hazırlanan PBS tampon çözeltileri içerisinde sistemin yanıtı Zetasizer, zeta potansiyometre ve DLS kullanılarak ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Ayrıca hazırlanan kompozit sistemin 25 °C ve vücut sıcaklığı (37 °C) değerlerinde boyut değişimi DLS ile ortaya konulmuştur.

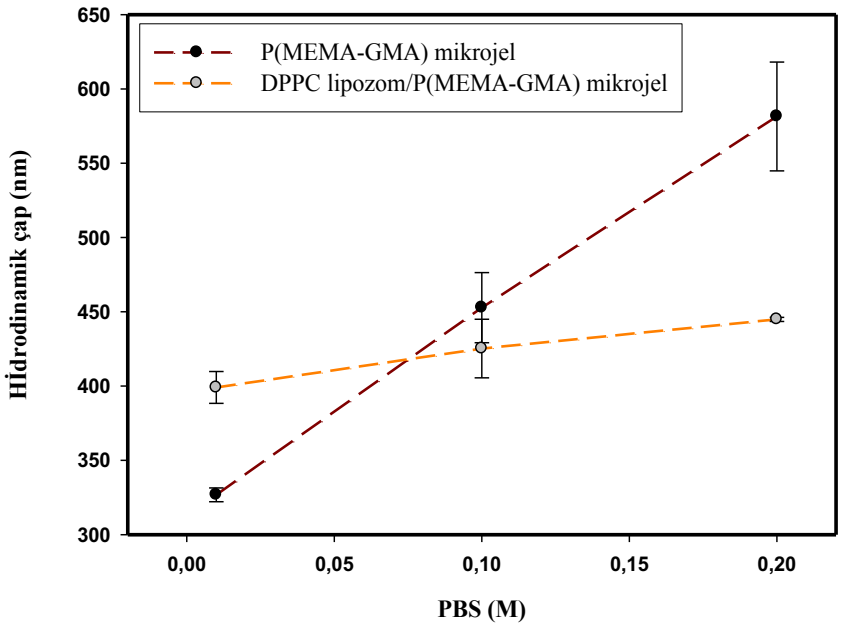
Hazırlanan P(MEMA-GMA) mikrojel, DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) lipozom mikrojel sistemlerin karşılaştırılması yapılmıştır. Mikrojel ve lipozom/mikrojel içerikleri Çizelge 4.5 verilmiştir.

Çizelge 4.5. P(MEMA-GMA) mikrojel, DPPC/P(MEMA-GMA) lipozom mikrojel sistemler

Sistem	İçerik
P(MEMA-GMA) mikrojel	%2,25 stabilizör %1 GMA
DPPC/P(MEMA-GMA) lipozom/mikrojel	%2,25 stabilizör %1 GMA

4.8.1. Lipozom/mikrojel kompozit sistemlerinin iyon derişimine duyarlılık çalışması

P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemlerine ait PBS derişim değişim zetasizer sonuçları Şekil 4.28'de verilmiştir (üç tekrar yapılmıştır).



Şekil 4.28. P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel PBS etkisi (zetasizer)

Şekil 4.28'e göre PBS derişiminin artışı mikrojel ve lipozom/mikrojel sistemlerin boyutlarında artışa sebep olmuştur. Bu sonuçlar daha önceki başlıkta değerlendirilen farklı derişimlerde Na_2SO_4 ve NaCl derişim değişimine P(MEMA-GMA) mikrojelin verdiği tepkiyle örtüşmektedir. P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) lipozom/mikrojel sistem karşılaştırıldığında, P(MEMA-GMA) mikrojelde görülen boyut artışı yaklaşık %80 iken DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) lipozom/mikrojel de meydana gelen boyut artışı %7 oranında kalmıştır. Ortaya çıkan boyut değişim farklının lipit

varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mikrojel bünyesine hapsedilen lipozom PBS konsantrasyonuna karşı gösterilen hidrodinamik çap artışını engellemiştir.

4.8.2. Lipozom-mikrojel kompozit sistemlerin sıcaklık duyarlılık çalışması-DLS çalışması

Biyolojik sistemlerde kullanılması hedeflenen P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemlerin, oda sıcaklığındaki (25°C) boyutları ve vücut sıcaklığı (37°C) değerlerinde 0,01 M, pH 7,4 PBS tampon çözeltisi ve %0,9 izotonik NaCl çözeltisi (serum fizyolojik) çözeltilerinde, boyut değişimleri zetasizer kullanılarak ölçülmüştür. Üç kez tekrarlanan ölçümlere ait ortalama sonuçlar Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Mikrojel ve lipozom mikrojel sistemlerin boyutları üzerine sıcaklık etkisi

	P(MEMA-GMA) ***Çap(nm)**	**% Değişim**	DPPC-P(MEMA-GMA) ***Çap(nm)**	**% Değişim**
0,01 M PBS (25 °C)	332 (± 24)	33	464 (± 10)	15
0,01 M PBS (37 °C)	220 (± 26)		390 (± 20)	
Serum fizyolojik (25 °C)	410 (± 50)	28	298 (± 5)	2
Serum fizyolojik (37 °C)	294 (± 36)		296 (± 50)	

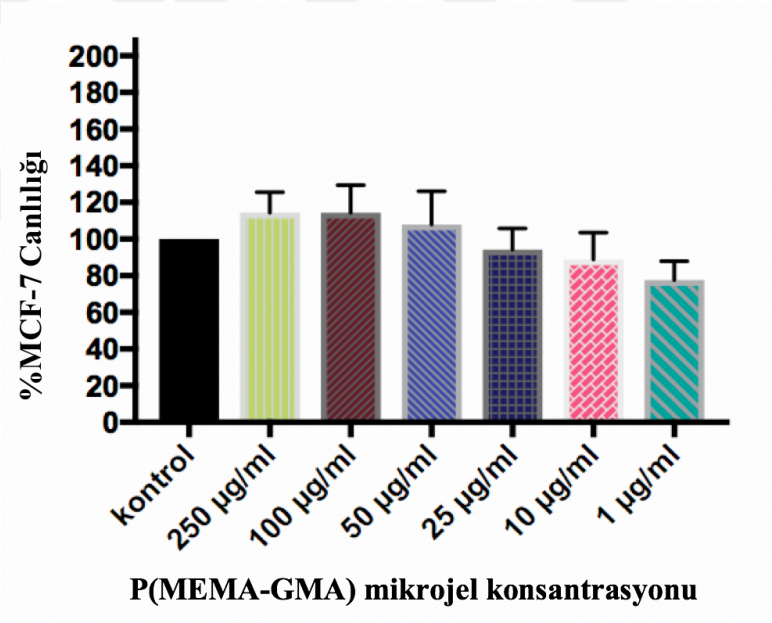
*Hidrodinamik çap (nm), DLS

Çizelge incelendiğinde görüleceği gibi 0,01 M PBS içerisinde dağıtılan P(MEMA-GMA) mikrojelin sıcaklık artışı ile hidrodinamik çapında meydana gelen değişim %33 değerinde DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojelde %15 değerine gerilemiştir. Serum fizyolojik içerisinde dağıtılan P(MEMA-GMA) mikrojelin sıcaklık artışında hidrodinamik çapında meydana gelen değişim %28 değerinden DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) lipozom-mikrojelde %2 seviyesine kadar gerilemiştir. Mikrojel içerisine hapsedilen lipozom sıcaklık duyarlılığını önemli seviyede düşürmüştür.

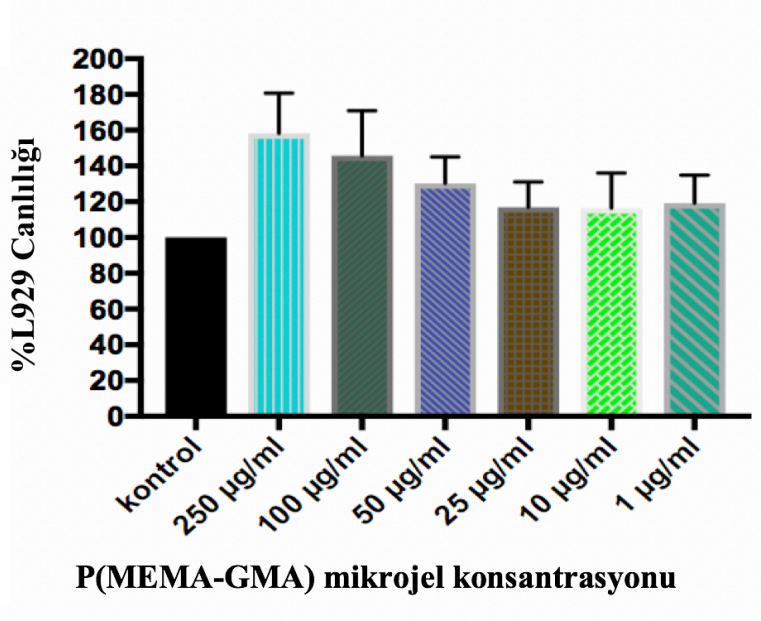
4.9. Toksisite Çalışmaları

4.9.1. P(MEMA-GMA) mikrojellerin toksikoloji çalışmaları

P(MEMA-GMA) mikrojellerin ilaç taşıyıcı sistemlerde *in-vitro* ve *in-vivo* taşıyıcı ve salım sistemi olarak kullanılacak olması nedeniyle sistemin farklı hücre hatlarında XTT toksikoloji çalışmaları yapılmıştır. İki farklı hücre hattı ile yürütülen çalışmalarda, fibroblast hücre hattı (L929) ve meme kanseri hücre hattı MCF-7 kullanılmıştır. Çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Biyolojik Sistemler Analiz Laboratuvarı/Hücre Kültür Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Söz konusu deneysel çalışmalar sekiz kez tekrarlanmış ve elde edilen absorbans ve standart sapma değerleri ile hesaplanan konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği Şekil 4.29 ve 4.30'da sunulmuştur.



Şekil 4.29. P(MEMA-GMA) mikrojelin MCF-7 hücre hattı üzerine toksisitesi



Şekil 4.30. P(MEMA-GMA) mikrojelin L929 hücre hattı üzerine toksisitesi

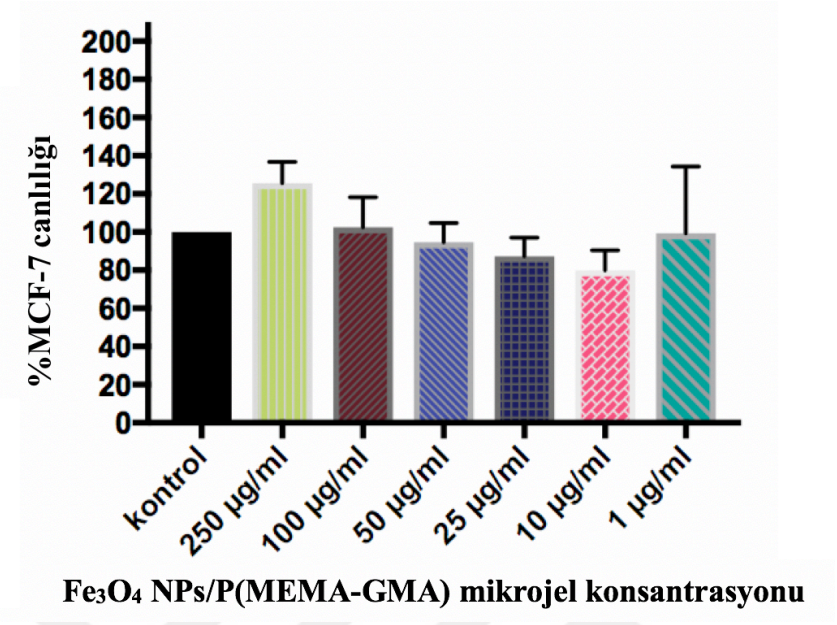
P(MEMA-GMA) mikrojelin MCF-7 ve L929 hücre hatları üzerine etkisi, iki sistem için de 250 µg/mL ile 1 µg/mL doz aralığında takip edilmiştir. Toksisite sonuçları incelendiğinde çalışmalarda sistemin toksisite değerlerinin kabul edilebilir değerin 100 µg/mL olduğu sonucuna varılabilir.

4.9.2. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sisteminin toksikoloji çalışmaları

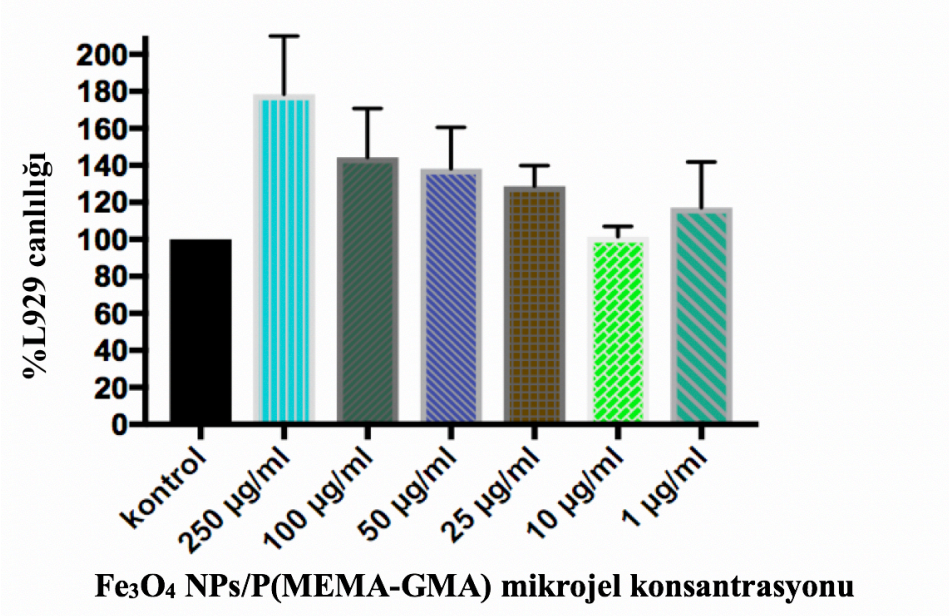
Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin ilaç taşıyıcı sistemlerde *in-vitro* ve *in-vivo* taşıyıcı ve salım sistemi olarak kullanılacak olması nedeniyle sistemin farklı hücre hatlarında XTT toksikoloji çalışmaları yapılmıştır. İki farklı hücre hattı ile yürütülen çalışmalarda MCF-7 ve L929 hücre hattları kullanılmıştır. Hacettepe Üniversitesi Biyolojik Sistemler Analiz Laboratuvarı/Hücre Kültür Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Söz konusu deneysel çalışmalar sekiz kez tekrarlanmış ve elde edilen absorbans değerleri ile hesaplanan konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği Şekil 4.31 ve 4.32'de sunulmuştur.

Şekil 4.31 ve Şekil 4.32'de MCF-7 ve L929 hücre hatları üzerine Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojelin sistemin XTT sonuçları incelendiğinde uygun dozun hem

MCF-7 hücreleri hemde L929 hücreleri için de için 100 µg/mL derişimde olduğu gözlenmiştir



Şekil 4.31. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojelin MCF-7 hücre hattı üzerine toksisitesi



Şekil 4.32. Fe_3O_4 manyetik NPs/P(MEMA-GMA) mikrojelin L929 hücre hattı üzerine toksisitesi

4.10. *İn-vitro* İlaç Salım Çalışmaları

4.10.1. P(MEMA-GMA) mikrojelden ilaç salımı

İlaç salım çalışmaları sıcaklık değişim etkisi 37 ºC ve 42 ºC sıcaklık değerlerinde 100 mL 0,01 M PBS içerisinde 100 rpm sabit karıştırma hızında çalışılmıştır. Çoklu çevre duyarlı mikrojelden 5-FU ilaç etken maddesinin salımı profiline sıcaklık değişiminin, iyon değişimini etkisi 37 ºC, 42 ºC sıcaklıklarda 100 mL PBS ve 37 ºC sıcaklıkta serum fizyolojik içerisinde 100 rpm sabit karıştırma hızında takip edilmiştir.

4.10.1.1. Sıcaklık değişiminin salım üzerine etkisi

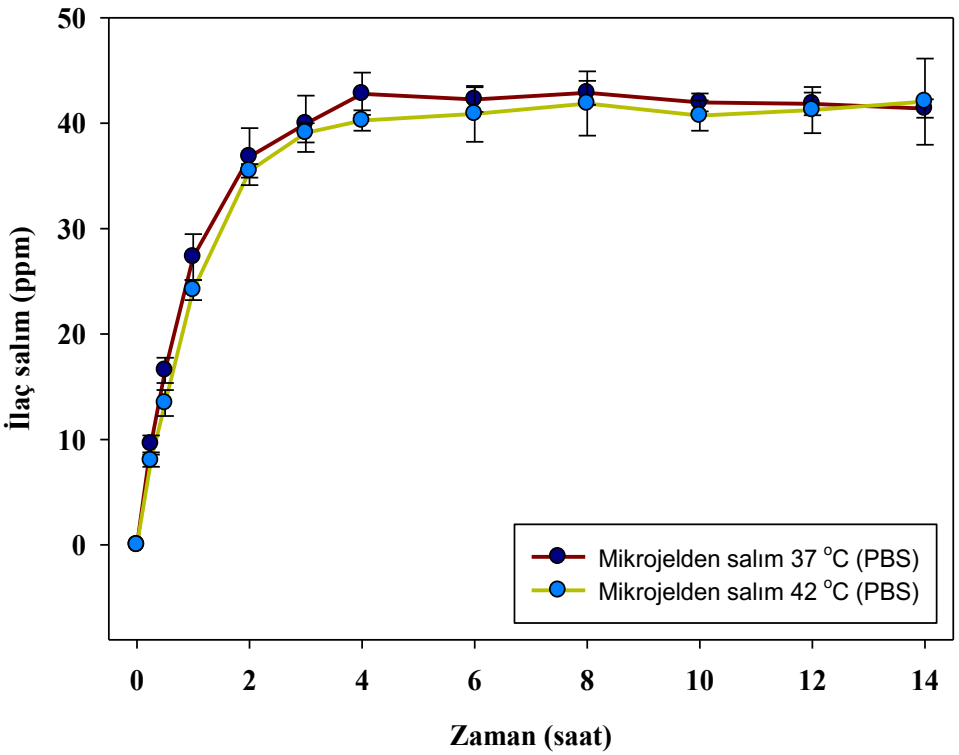
P(MEMA-GMA) mikrojelden 5-FU ilaç etken madde salımı ile ilgili yapılan çalışma 37 ºC ve 42 ºC sabit sıcaklıklarda HPLC kullanılarak yapılmıştır. Salım çalışması 3 tekrar yapılarak yürütülmüştür. İki faklı sıcaklık ile mikrojelden ilaç salımı ile ilgili HPLC ölçüm sonuçları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.33'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Sıcaklık değişimi ile P(MEMA-GMA) mikrojelden 5-FU ilaç etken maddenin salımı (sistem 50 ppm ilaç içermektedir)

Zaman	37 ºC (PBS)		42 ºC (PBS)	
(saat)	ppm(ort)	Standart sapma	ppm(ort)	Standart sapma
0	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	9,58	0,80	7,99	0,57
0,50	16,56	1,20	13,46	1,23
1,00	27,30	2,17	24,17	0,96
2,00	36,83	2,70	35,47	0,64
3,00	39,95	2,68	39,08	0,92
4,00	42,79	2,01	40,25	0,96
6,00	42,25	1,17	40,88	2,65
8,00	43,31	1,31	41,86	3,05
10,00	41,96	0,85	40,72	1,44
12,00	41,82	1,07	41,24	2,19
14,00	41,39	0,87	42,05	4,09

5-FU etken maddenin zamana bağlı salım grafiği incelendiğinde ilk 5 saat (300 dakika) ilaç salım artarak devam etmiş 5 saatten sonra salınan 5-FU miktarı değişmediği gözlenmiştir. Çevre şartları değişimine duyarlı P(MEMA-GMA) mikrojelden farklı

sıcaklıklarda ilaç salımı 37 ° C ve 42 ° C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta yapılmıştır. P(MEMA-GMA) mikrojelden iki farklı sıcaklıkta 5-FU ilaç etken madde salımı ile ilgili yapılan çalışmada Şekil 4.33'de görülebileceği gibi ilaç salım eğilimi birbirine benzerdir. Sıcaklık duyarlı P(MEMA-GMA) mikrojelin hidrodinamik yarıçapının sıcaklık artışı ile azaldığı daha önceki bölümlerde ortaya koyulmuştu. Şekil 4.33'de görülebileceği gibi sıcaklıkla hidrodinamik yarıçapı azalan sistem için ilaç salım profilinde ortaya çıkan sonuç beklenen bir eğilimdir. Hidrodinamik yarıçapı azalan mikrojellerin por genişlikleri azalmış dolayısıyla ilacın mikrojelden salım miktarı azalmıştır.



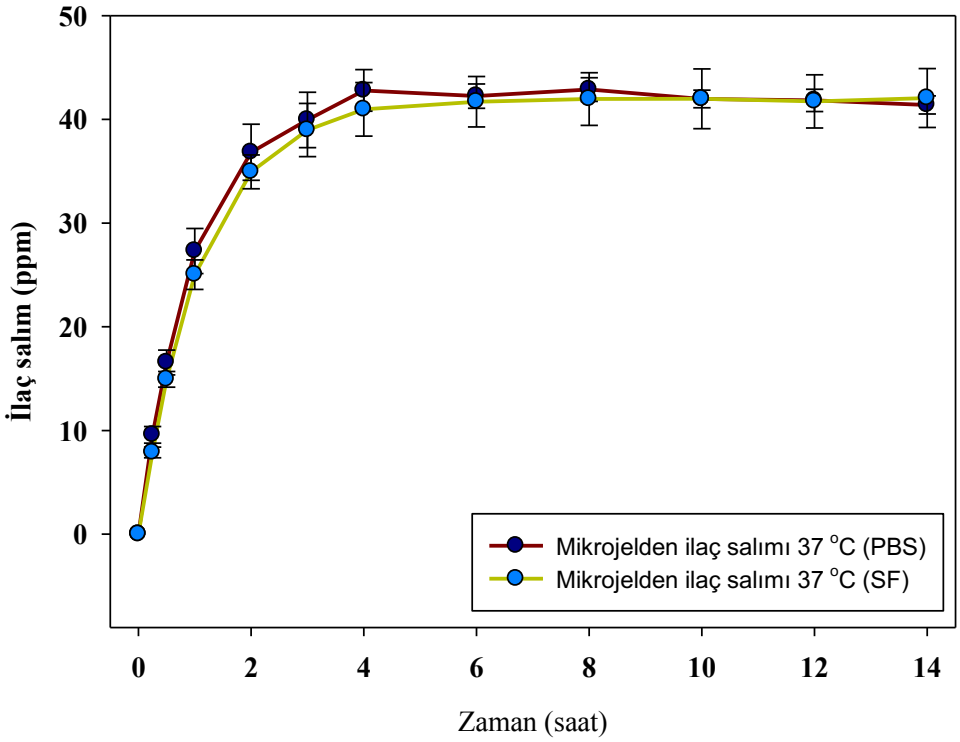
Şekil 4.33. P(MEMA-GMA) mikrojelden 37 ºC ve 42 ºC sabit sıcaklıkta 5-FU salımı (PBS)

4.10.1.2. Salım çözeltisi değişiminin salım üzerine etkisi

Teorik olarak 50 ppm ilaç içeren P(MEMA-GMA) mikrojelden 5-FU ilaç etken maddesinin salımı ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada farklı salım ortamlarında 37 ° C sıcaklıkta yapılan çalışmalardır. Salım ortamı olarak PBS ve serum fizyolojik (SF) kullanılmıştır. Fosfat tampon (PBS) ve serum fizyolojik (SF) çözeltileri içerisinde ilaç salım ile ilgili HPLC ölçüm sonuçları Çizelge 4.8 ve Şekil 4.34'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Salım ortam değişikliği ile P(MEMA-GMA) mikrojelden 5-FU ilaç etken maddenin salımı

Zaman	37 ºC (PBS)		37 ºC (SF)	
(saat)	ppm(ort)	Standart sapma	ppm(ort)	Standart sapma
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	9,58	0,80	7,88	0,51
0,50	16,56	1,20	14,93	0,76
1,00	27,30	2,17	25,02	1,42
2,00	36,83	2,70	34,93	1,63
3,00	39,95	2,68	38,97	2,57
4,00	42,79	2,01	40,97	2,58
6,00	42,25	1,17	41,69	2,43
8,00	43,31	1,31	41,96	2,55
10,00	41,96	0,85	41,99	2,88
12,00	41,82	1,07	41,73	2,56
14,00	41,39	0,87	42,05	2,88



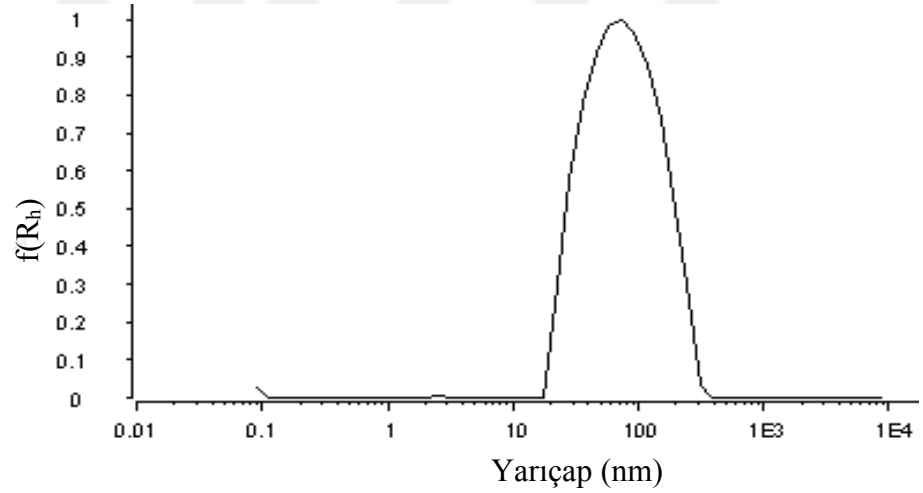
Şekil 4.34. P(MEMA-GMA) mikrojelden içerisinde PBS ve SF 5-FU salımı (37 ºC)

PBS ve SF olmak üzere iki farklı salım ortamında P(MEMA-GMA) mikrojelden 5-FU ilaç etken maddenin salımına dair yapılan çalışma sonuçları Şekil 4.34'de verildiği gibidir. Çoklu çevre duyarlı P(MEMA-GMA) mikrojel farklı tuz iyonları içeren iki ortamda aynı salım eğimi göstermiştir. P(MEMA-GMA) mikrojel çözeltideki iyon değişiminden etkilenmekte fakat 5-FU ilaç etken maddenin salımı üzerine etki göstermemektedir. İlaç

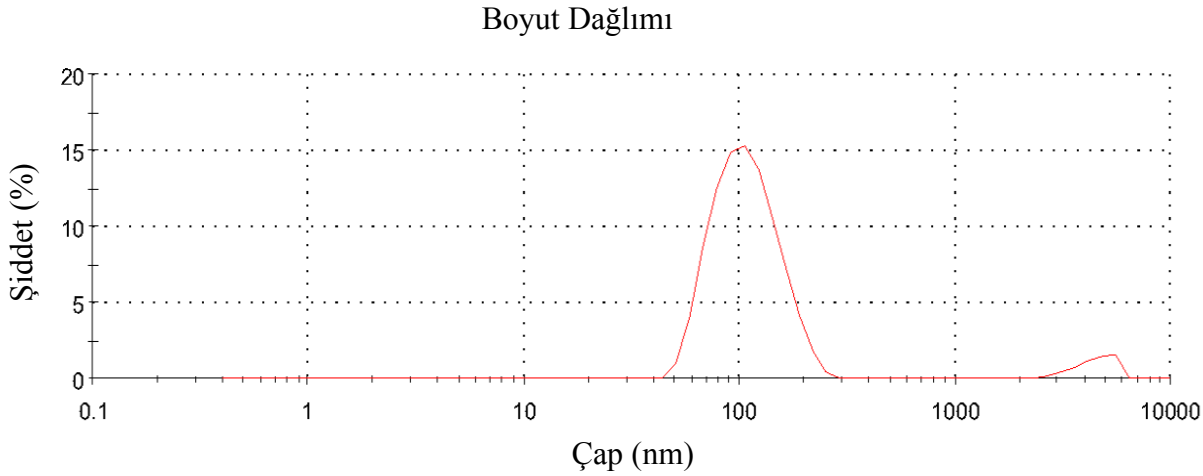
etken madde içermeyen lipozom/mikrojel sistemlerin PBS ve NaCl derişimi değişimine etkisi ile benzer eğilim gösterdiği ortaya koyulmuştur.

4.10.2. İlaç etken madde 5-FU yüklü DPPC lipozomun boyut dağılım analiz çalışmaları

5-FU yüklü DPPC lipozomun boyut analizi 100 nm ve 50 nm polikarbonat membran filtreden geçirildikten sonra DLS ve Zetasizer ile belirlenmiştir. Yapısal karakterizasyonu TEM ile görüntülenmiştir. 100 nm polikarbonat membran filtreden geçirilen 5-FU yüklü DPPC lipozomun CGS-3 goniometer ile incelenen sulu dispersiyonunda hidrodinamik yarıçapı DLS sonuçlarına göre 71,50 nm olarak, partikül dağılımı (PDI) değeri 0,28 olarak kaydedilmiştir. İlgili sonuçlar Şekil 4.35 ve Şekil 4.36'da verilmiştir.

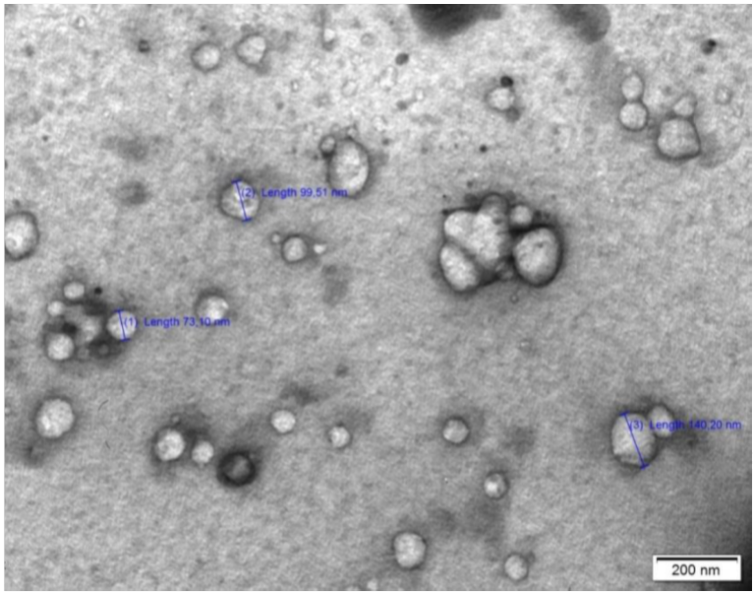


Şekil 4.35. 5-FU yüklü DPPC lipozoma ait DLS analizi (100 nm polikarbonat membran filtreden sonra)



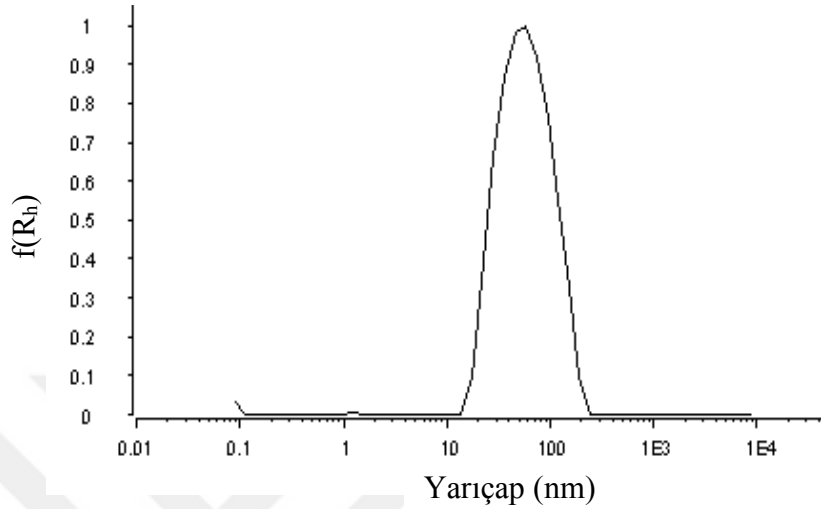
Şekil 4.36. 5-FU yüklü DPPC lipozoma ait Zetasizer analizi (100 nm polikarbonat membran filtreden sonra)

100 nm polikarbonat membran filtreden geçirilen 5-FU yüklü DPPC lipozomun 12 tekrar ile Zetasizer ile incelenen sulu dispersiyonunda hidrodinamik çapı 109,6 nm olarak partikül dağılımı olan PDI değeri 0,23 boyut standart sapma değeri 38,2 nm olarak kaydedilmiştir. Lipozomun yapısal karakterizasyonu TEM kullanarak aydınlatılmıştır. İlgili görüntü Şekil 4.37'de verilmiştir.



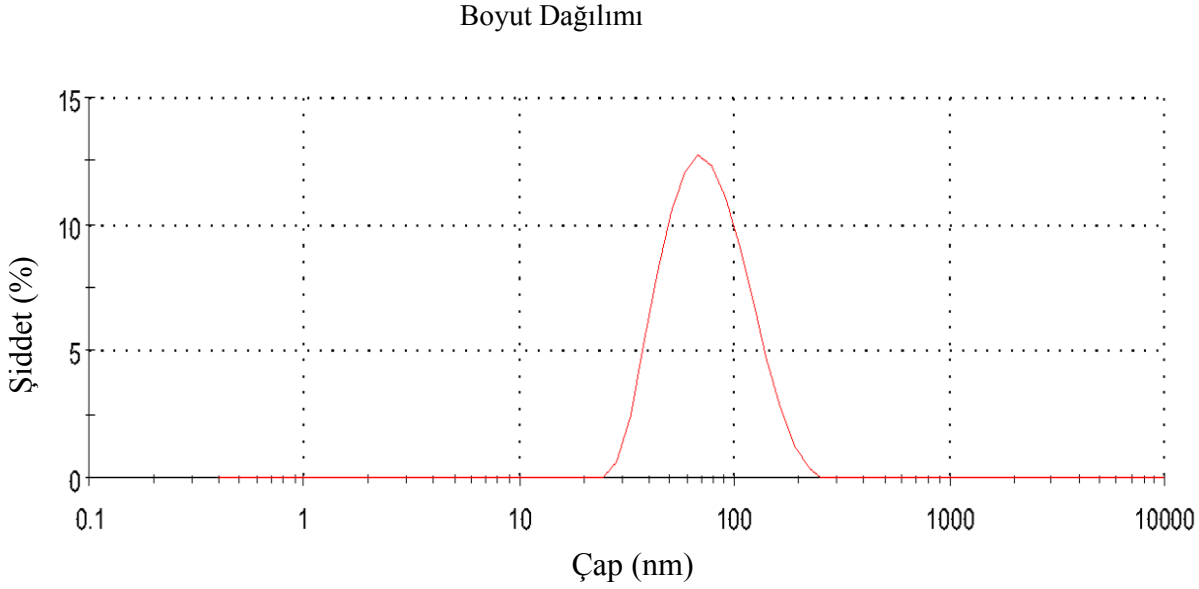
Şekil 4.37. 5-FU yüklü DPPC lipozomun TEM görüntüleri (60 kV- 100 nm polikarbonat membran filtreden sonra)

50 nm polikarbonat membran filtreden geçirilen 5-FU yüklü DPPC lipozoma ait boyut ve boyut dağılımı DLS ile belirlenmiştir (Şekil 4.38). DLS sonucuna göre boyut 54,6 nm boyut dağılımı PDI 0,24 olarak belirlenmiştir.

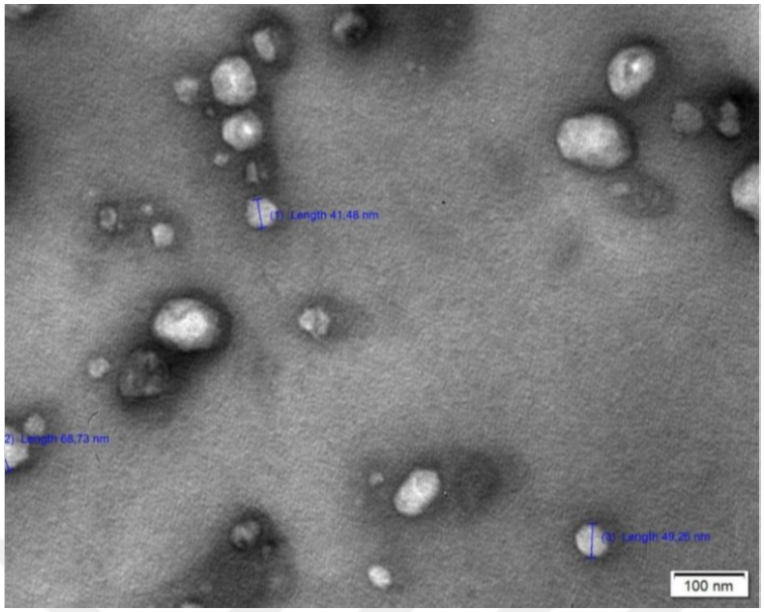


Şekil 4.38. 5-FU yüklü DPPC lipozoma ait DLS analizi (50 nm polikarbonat membran filtreden sonra)

Şekil 40' da görülen Zetasizer analizine göre, 50 nm polikarbonat membran filtreden geçirilen 5-FU yüklü DPPC lipozomun boyut 67 nm, boyut dağılımı PDI 0,16 olarak ve boyut standart sapma 35,34 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.39. 5-FU yüklü DPPC lipozoma ait Zetasizer analizi (50 nm polikarbonat membran filtreden sonra)

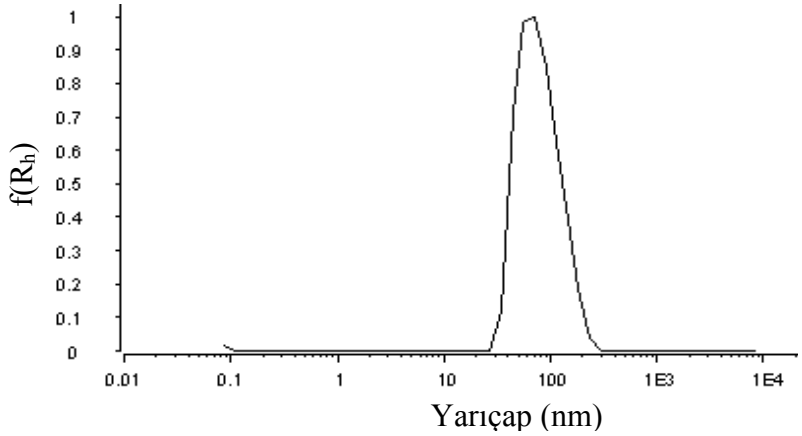


Şekil 4.40. 5-FU yüklü DPPC lipozoma ait TEM görüntüleri (100 kV, 50 nm polikarbonat membran filtreden sonra)

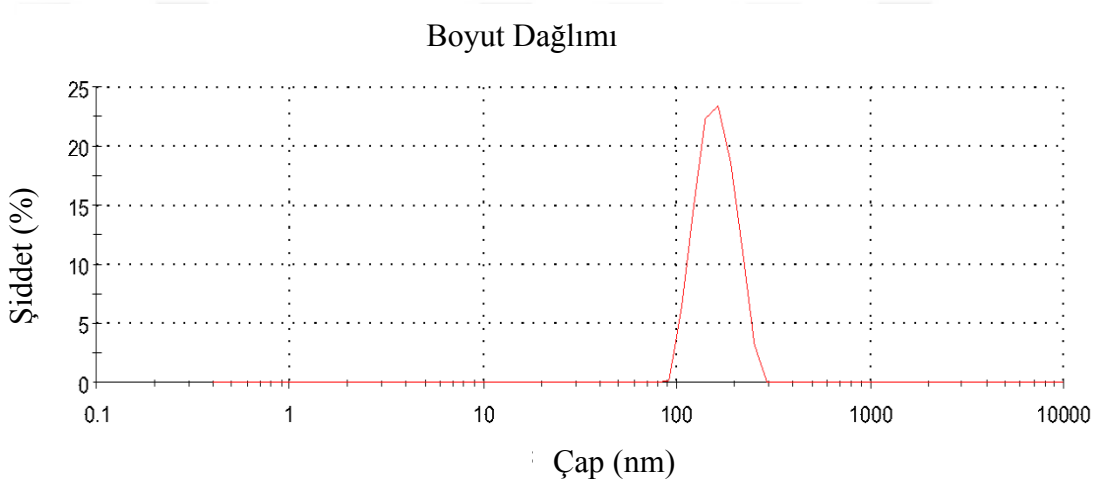
İlaç etken madde 5-FU yüklü DPPC lipozoma ait DLS, Zetasizer ve TEM görüntüleri incelendiğinde 100 nm polikarbonat membran filtreden sonra 50 nm polikarbonat membran filtreden geçirilen lipozomlar monodispers dağılıma sahip şekilde hazırlanabilmiştir.

4.10.3. 5-FU yüklü DPPC lipozom kullanılarak sentezlenen P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin boyut ve boyut dağılım analizi

5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin boyut ve boyut dağılım CGS-3 goniometer ve Zetasizer ile belirlenmiştir. 5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin boyut ve boyut dağılımı CGS-3 goniometer ile, sulu dispersiyonunda hidrodinamik yarıçapı 74,5 nm olarak partikül dağılımı olan PDI değeri 0,13 olarak kaydedilmiştir (bakınız Şekil 4.41).



Şekil 4.41. 5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemi



Şekil 4.42. 5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemi (Zetasizer)

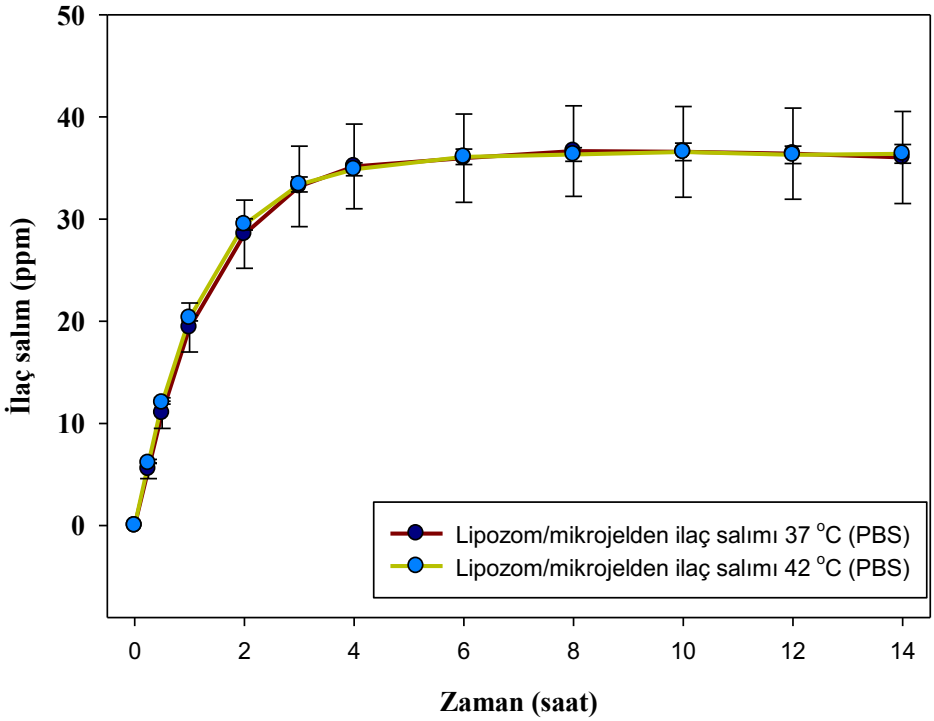
5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin çap ölçümü 12 tekrar ile Zetasizer ile ölçüldüğünde, sulu dispersiyonunda hidrodinamik çapı Şekil 4.42'de verildiği gibi162,5 nm olarak partikül dağılımı olan PDI değeri 0,03 olarak, boyut standart sapma değeri ise 36,5 nm olarak kaydedilmiştir. Sentezlenen 5-FU yüklü DPPC lipozomun içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin 12 saat ve 24 saat sonrasında MCF-7 hücreleri üzerine etki çalışması yapılmıştır.

4.10.4. 5-FU yüklü DPPC lipozom içeren P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı

Teorik olarak 50 ppm ilaç içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salım çalışmaları 37 ºC ve 42 ºC sıcaklıklarında 0,01 M PBS tampon çözeltisi içerisinde yürütülmüştür. HPLC analiz sonuçlarına ait veriler Çizelge 4.9 ve Şekil 4.43'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı sıcaklıklarda DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 5-FU ilaç etken maddenin salımı

37 ºC (PBS)			**42 ºC (PBS)**	
Zaman(saat)	**ppm(ort)**	**Standart sapma**	**ppm(ort)**	**Standart sapma**
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	5,53	0,94	6,110	0,03
0,50	11,01	1,50	12,03	0,14
1,00	19,39	2,39	20,31	0,28
2,00	28,52	3,33	29,47	0,54
3,00	33,20	3,94	33,40	0,73
4,00	35,16	4,15	34,87	0,63
6,00	35,96	4,32	36,09	0,76
8,00	36,65	4,43	36,32	0,67
10,00	36,58	4,43	36,57	0,86
12,00	36,41	4,46	36,29	0,85
14,00	36,03	4,51	36,38	0,92



Şekil 4.43. DPPC lipozom-P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden farklı sıcaklıklarda PBS içerisinde 5-FU salımı

DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden iki farklı sıcaklıkta yapılan salım 5-FU ilaç etken madde salım çalışmaları sonuçlarına ait HPLC sonuçları incelendiğinde iki sıcaklık değerinde de salımın aynı değerlerde olduğu görülmektedir.

Lipozom katkısı ile P(MEMA-GMA) mikrojelin çevre şartlarının değişmesinin salım üzerine etkisi incelendiğinde sıcaklık değişiminin salım üzerine etkili olmadığı sonucu gözlenmiştir

4.10.5. 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı

P(MEMA-GMA) mikrojelden ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 5-FU ilaç etken maddesinin farklı sıcaklıklarda 0,01 M PBS içerisinde salımına dair çalışmalar yapılmıştır.

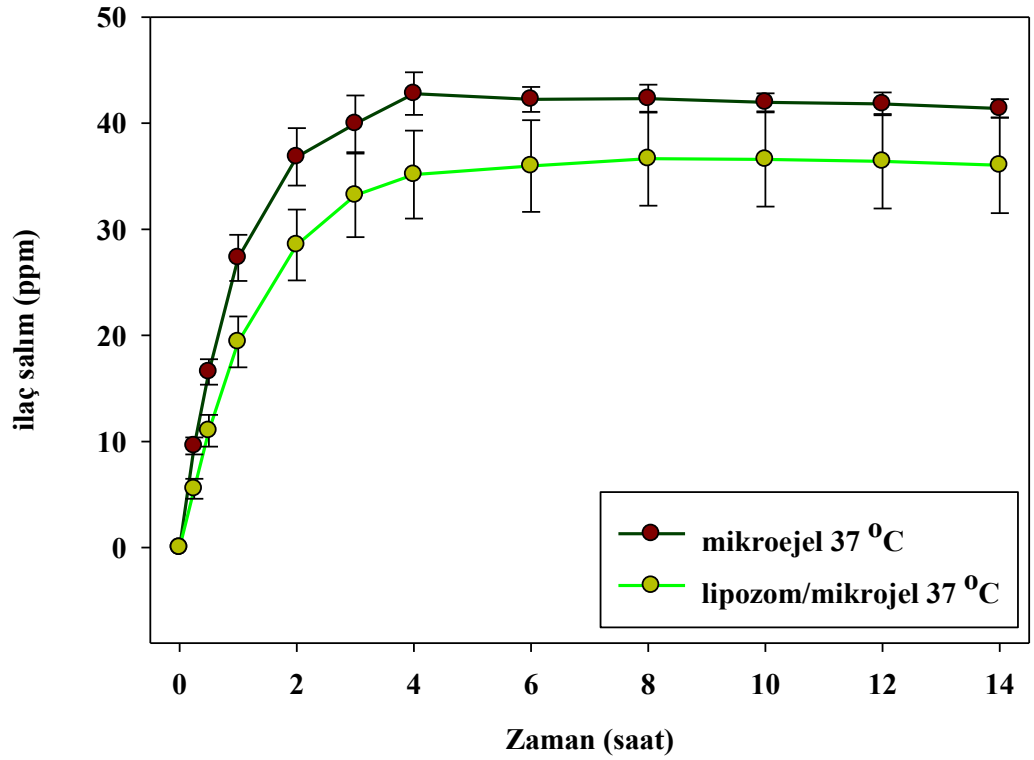
4.10.5.1. 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı (37 ºC)

37 ºC sıcaklıkta 0,01 M PBS içerisinde 5-FU ilaç etken maddenin P(MEMA-GMA) mikrojelden ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden salımı ile ilgili yapılan çalışmada, etken maddenin sistemden salımına ait HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.10 ve Şekil 4.44'de verilmiştir. Sistem teorik olarak 50 ppm 5-FU içermektedir.

Çizelge 4.10. 37 ºC sıcaklıkta P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 5-FU ilaç etken maddenin salımı

Mikrojelden ilaç salamı, 37 ºC (PBS)			**Lipozom/mikrojel ilaç salamı, 37 ºC (PBS)**		
Zaman (Saat)	**ppm(ort)**	**Standart sapma**	**Zaman (saat)**	**ppm(ort)**	**Standart sapma**
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	9,58	0,80	0,25	5,53	0,94
0,50	16,56	1,20	0,50	11,01	1,50
1,00	27,30	2,17	1,00	19,39	2,39
2,00	36,83	2,70	2,00	28,52	3,33
3,00	39,95	2,68	3,00	33,20	3,94
4,00	42,79	2,01	4,00	35,16	4,15
6,00	42,24	1,17	6,00	35,96	4,32
8,00	42,92	1,02	8,00	36,65	4,43
10,00	41,96	0,85	10,00	36,58	4,43
12,00	41,82	1,07	12,00	36,41	4,46
14,00	41,39	0,87	14,00	36,03	4,51

5-FU ilaç etken madde içeren P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımına ait grafik Şekil 4.44'de verildiği gibidir. P(MEMA-GMA) mikrojelden ilaç salımı ile DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı karşılaştırıldığı zaman görüleceği gibi ilaç salım hızı lipozom katkılı sistemde yavaşlamıştır. P(MEMA-GMA) mikrojelden ilacın maksimum salıma çıkma süresi 4 saat iken DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımının maksimum seviyeye çıkma süresi 8 saat civarındadır.



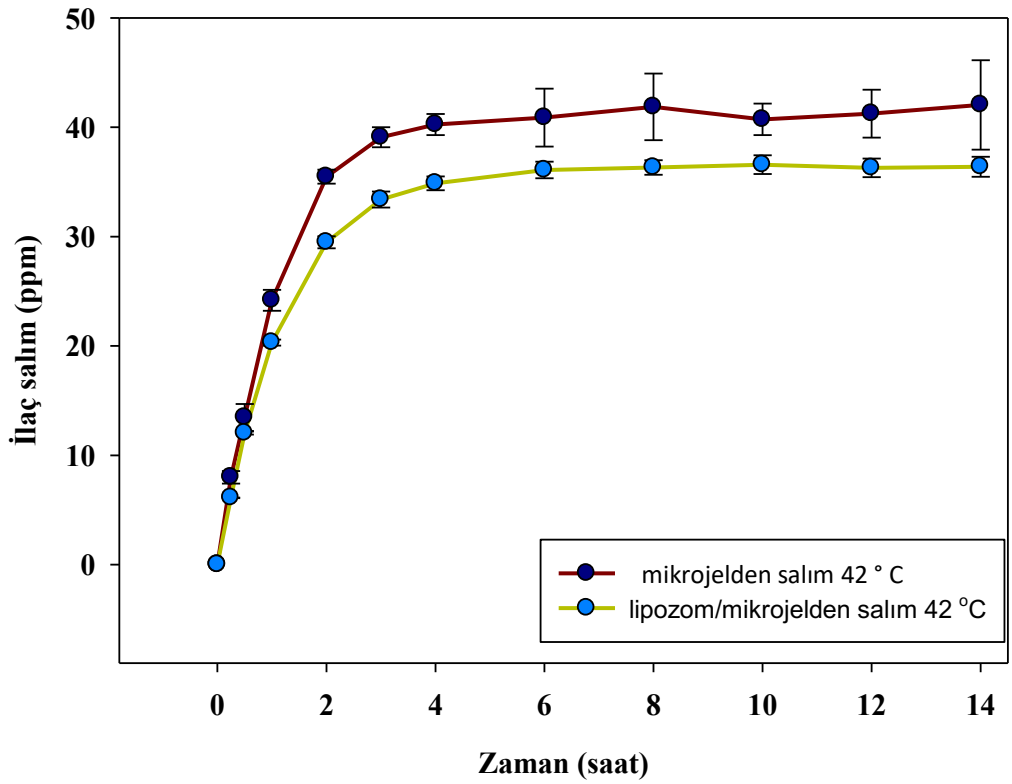
Şekil 4.44. (MEMA-GMA) mikrojelden ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojelden PBS içinde ilaç salımı (37 ºC)

4.10.5.2. 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı (42 ºC)

42 ºC sıcaklıkta 0,01 M PBS içerisinde 5-FU ilaç etken maddenin P(MEMA-GMA) mikrojelden ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden salımı ile ilgili yapılan çalışmada, etken maddenin sistemden salımına ait HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.13 ve Şekil 4.45'de verilmiştir. Sistem teorik olarak 50 ppm ilaç içermektedir.

Çizelge 4.11. 42 ºC sıcaklıkta P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 5-FU ilaç etken maddenin salımı

Mikrojelden ilaç salımı 42 ºC (PBS)			Lipozom/mikrojel ilaç salım 42 ^{0}C (PBS)		
Zaman (saat)	ppm(ort)	Standart sapma	Zaman (saat)	ppm(ort)	Standart sapma
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	7,99	0,57	0,25	6,11	0,03
0,50	13,46	1,23	0,50	12,03	0,14
1,00	24,17	0,96	1,00	20,31	0,28
2,00	35,47	0,64	2,00	29,47	0,54
3,00	39,08	0,92	3,00	33,40	0,73
4,00	40,25	0,96	4,00	34,87	0,63
6,00	40,88	2,65	6,00	36,09	0,76
8,00	41,86	3,05	8,00	36,32	0,67
10,00	40,72	1,44	10,00	36,38	0,92
12,00	41,24	2,19	12,00	36,28	0,50
14,00	42,05	4,09	14,00	36,42	0,64



Şekil 4.45. P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojelden PBS içinde ilaç salımı (42 ºC)

42 ºC sıcaklıkta 0,01 M PBS tampon içerisinde, 5-FU ilaç etken maddenin P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden salımına

ait grafik Şekil 4.45'de verildiği gibidir. P(MEMA-GMA) mikrojelden ilaç salımı ile DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımı karşılaştırıldığında salım hızının 42 ºC sıcaklıkta paralel olduğu görülmüştür. P(MEMA-GMA) mikrojelden ilacın maksimum salıma süresi ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden ilaç salımının maksimum seviyeye çıkma süresi 6 saat civarındadır. Salım profillerinde ortaya çıkan bu benzerlik sıcaklık artışı ile hidrodinamik yarıçapı azalan P(MEMA-GMA) mikrojel için beklendiği gibidir. Hidrodinamik yarıçapı azalan P(MEMA-GMA) mikrojelin por büyüklükleri azalmış ve salım bu sebepten dolayı yavaşlamıştır. Ayrıca DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin sıcaklık değişiminden etkilenmediği de daha önceki bölümlerde not edilmiştir.

4.11. Meme Kanseri Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemlerin *In-Vivo* Kullanılması

CD1 dişi farelere $10*10^6$ MCF-7 hücre enjekte edildikten sonra elde edilen 100-150 mm^3 boyutundaki tümörler sahip fareler;

1) Kontrol grubu
2) Serbest 5-FU ile tedavi edilen grup
3) DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem enjekte edilen grup
4) Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem grubu
5) 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem gruplarına ayırılmıştır.

Tedavi sürecinin ardından dokuları RT-PCR kullanılarak m-RNA seviyesinde analiz edilmiştir. Ayrıca tümör dokuların patalojik değerlendirilmesi ve immünohistokimyasal boyama yöntemi ile analizi de yine bu tez kapsamında değerlendirilmiştir.

Tamamlanan doktora tez kapsamında maddi destek sağlanan TÜBİTAK ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje önerisi sırasında kullanılması planlanan ve etik kurulu raporunda 48 CD-1 fareye ikişer kez MCF-7 enjeksiyonu yapılmıştır. $10x10^6$ MCF-7 meme kanser hücresi 100 μL PBS içerisinde 3. ve 6. meme bölgesine (sağ ve sol arka bacağa) enjekte edildikten sonra farklı boyutlarda meme tümörü oluşturulabilmiştir.

100-150 mm^3 boyutunda meme kanser tümörü oluşan tümör dokularına ait tedavi öncesi görüntüler aşağıda verilen Şekil 4.46'de verilmiştir. Ayrıca CD-1 dişi nude farelerde tedavi sırasında manyetik alan Şekil 4. 47'da gösterildiği gibi uygulanmıştır.



Şekil 4.46. Tedavi öncesi MCF-7 ile oluşturulan tümör dokusu



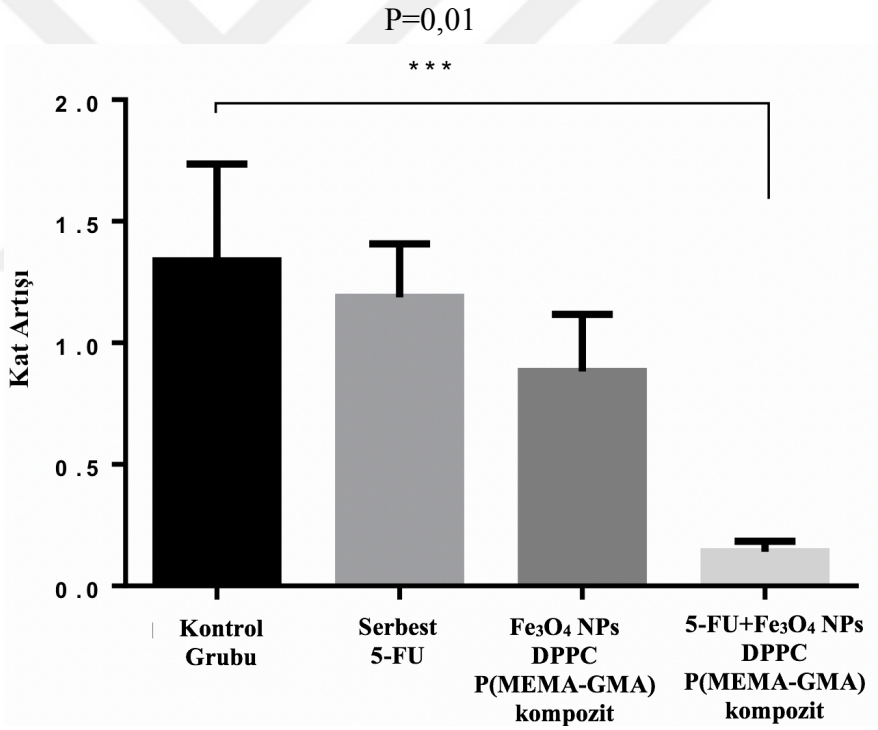
Şekil 4.47. İlaç etken madde 5-FU içeren ve içermeyen manyetik Fe_3O_4 manyetik nanopartikül içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin CD-1 farelere enjeksiyonundan sonra uygulanan manyetik alan

4.11.1. RT-PCR analiz sonuçları

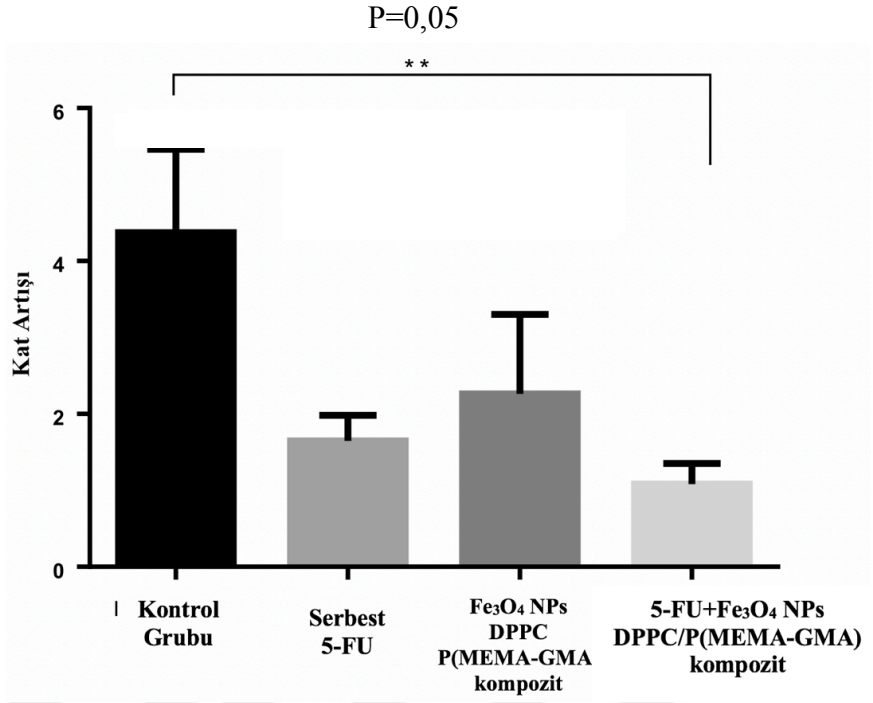
Kontrol grubu, serbest 5-FU ile tedavi edilen grup, DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem enjekte edilen grup, Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem grubu ve 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem gruplarına ayırılarak tedavi edilen CD-1 dişi farelerden 14 gün sonra alınan dokularda kullanılarak TS, östrojen, progesteron, EGFR, β-aktin (referans gen olarak kullanılmıştır) mRNA düzeyleri, dual label (Taqman prob) kullanılarak Roche nano lightcycler ile ölçülmüştür. RT-PCR çalışmaları üç kez tekrarlanarak yapılmıştır. RT-PCR ile yapılan çalışma sonuçları istatistiksel olarak ifade edilmiştir.

RT-PCR kullanarak oluşturulan meme kanser dokusunun mRNA profile ile ilgili sonuçlarda G1 olarak adlandırılan Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem ve G2 olarak adlandırılan 5 mg/kg/va içeren 5-FU içeren Fe_3O_4 manyatik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) sistem ile tedavi edilin dişi fare tümörlerinden 14 gün sonra alınan dokuları analiz RT-PCR ile analiz edilmiştir. Sistemin mRNA düzeylerinde meydana gelen kat azalış miktarı karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ($p<0.05$).

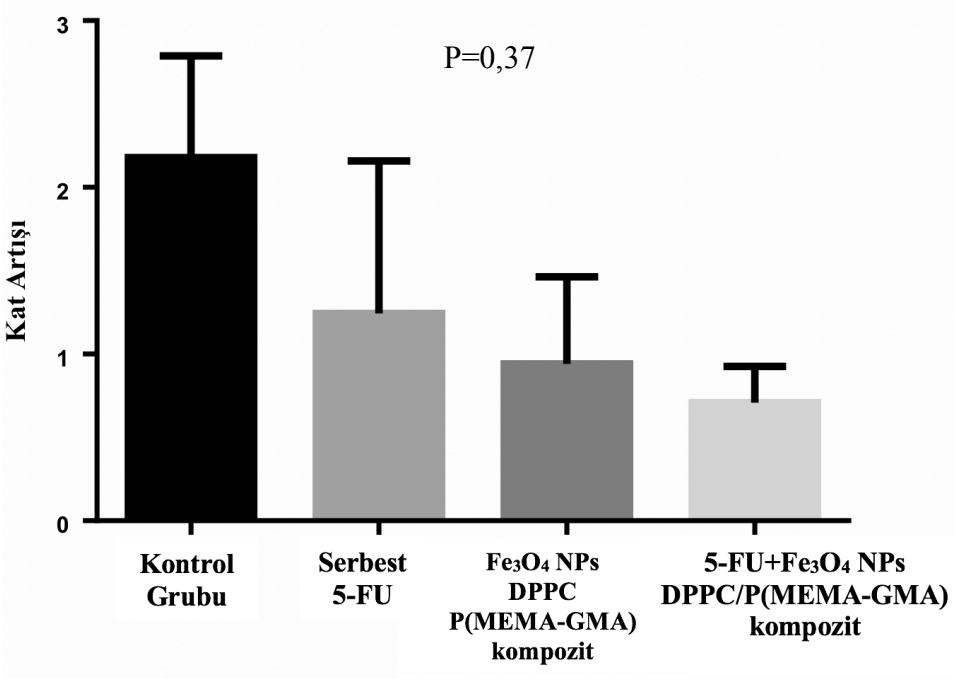
5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) sistem ile Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem enjekte edilen CD-1 nude farelerin meme tümör dokuların mRNA sonuçları Şekil 4.48, Şekil 4.51 aralığında verilmiştir.



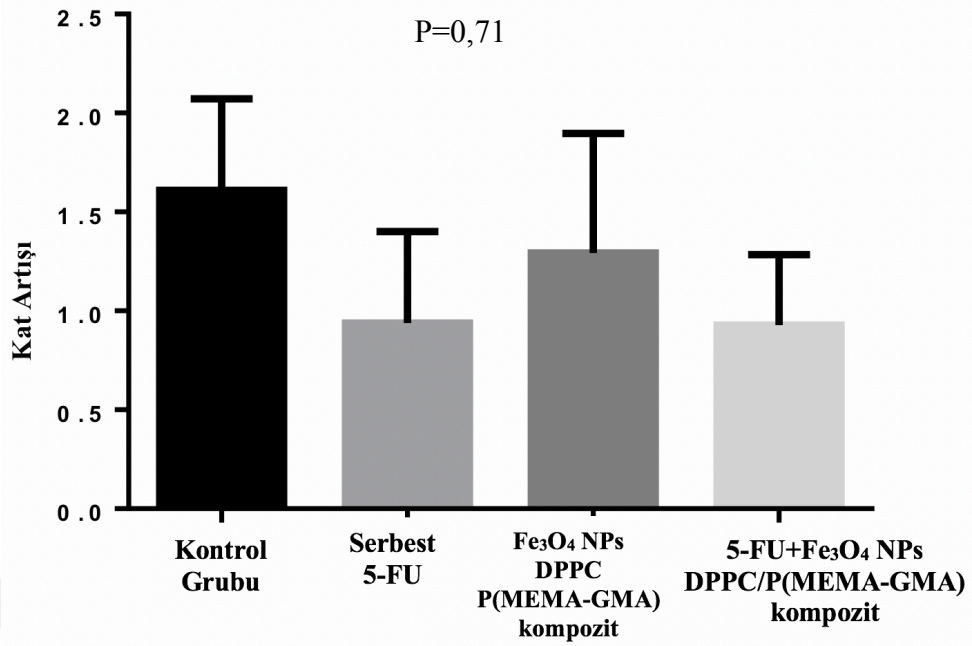
Şekil 4.48. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem TS reseptör mRNA ifadesi



Şekil 4.49. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem PR reseptör mRNA ifadesi



Şekil 4.50. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem EGFR reseptör mRNA ifadesi

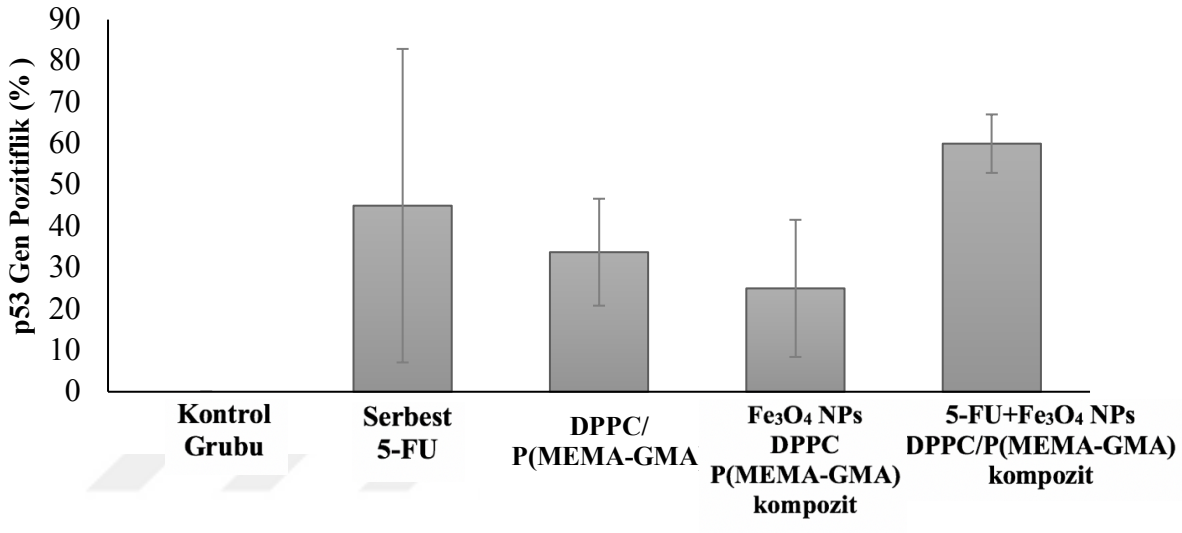


Şekil 4.51. Kontrol Grubu, Serbest 5-FU, Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ER reseptör mRNA ifadesi

Şekil 4.48'de görülebileceği gibi TS enzim reseptörünün mRNA düzeyinde Fe_3O_4 mantetik nanopartikül ile ilaç salımı gerçekleştirildiğinde kontrol grubuna kıyasla oldukça anlamlı bir azalış ortaya çıkmıştır. Şekil 4.49'da görülebileceği gibi PR reseptör mRNA düzeyinde de anlamlı bir azalış olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Aynı çalışma Şekil 4.50'de gösterildiği gibi EGRF resöptör için ve Şekil 4.51'de verildiği gibi ER resöptör için mRNA kat artış düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı bir azalmanın olmadığı belirlenmiştir. Aynı zamanda Şekil 4.48, Şekil 4.49, Şekil 4.50 ve Şekil 4.51'de görülebileceği gibi ilaç içermeyen Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin de TS, PR, EGRF ve ER resöptörlerin mRNA düzeyinde azalışa sebep olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kontrollü ilaç salım sistemi olan 5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin ilaç salım sistemi olarak kullanılması ile meme kanser tümörü tedavisinde kullanılan 5-FU ilacın etkinliğini arttırdığı söylenebilir.

4.11.2. Patolojik immünohistokimyasal boyama sonuçları

Patolojik immünohistokimya sonuçları ise p53, PR, ER ve Cerb-B2 reseptör miktarları analiz edilmiştir. Bu çalışmada bahsedilen reseptörler için uygun antibadiler kullanılarak ışık mikroskopu altında boyama sonuçları ifadelenmiştir. Çalışma sonuçlarının matematiksel ifadesi Şekil 4.52' de verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.12'de ER, PR ve Cerb-B2 reseptörleri için tüm deney gruplarına ait sonuçlar verilmitir.



Şekil 4.52. p53 gen reseptörü immünohistokimyasal boyama sonucu

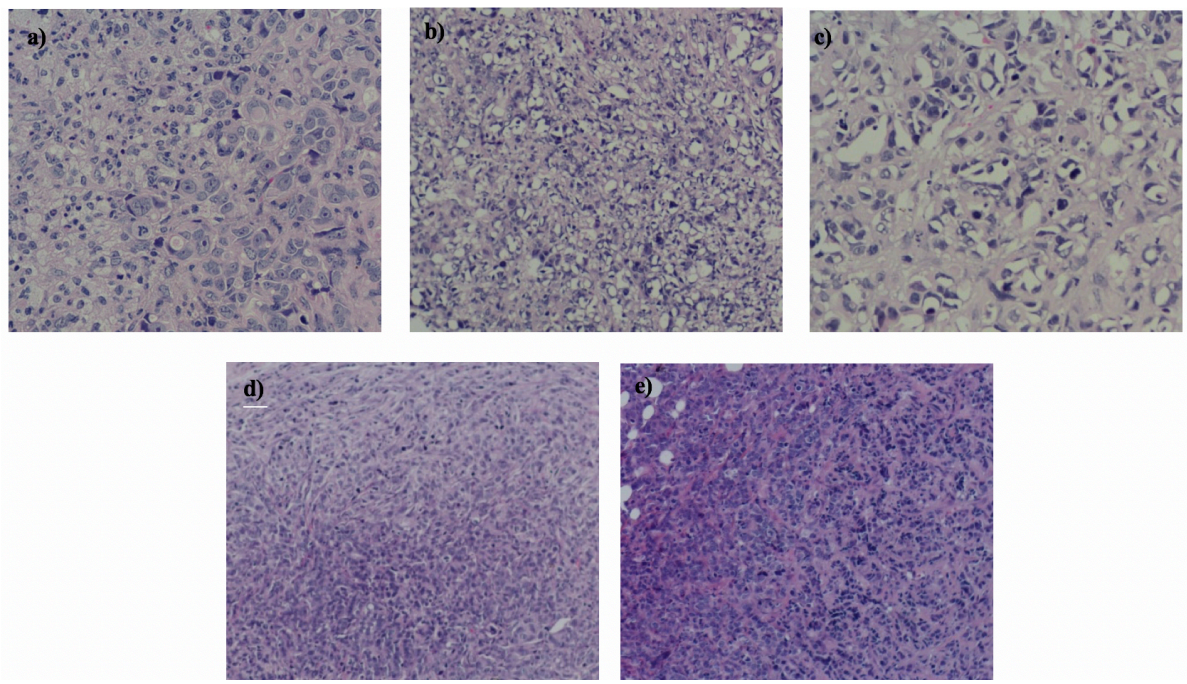
Çizelge 4.12. Kontrol grubu, serbest 5-FU, DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem, Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC/P(MEMA-GMA) sistemin patoloji sonuçları

Gruplar	% ER	%PR	% c-erb-B2 ya da HER2
Kontrol	100 Pozitif	70 Pozitif	Skor-0
Serbest 5-FU	100 Pozitif	60 Pozitif	Skor-0
DPPC/P(MEMA-GMA)	100 Pozitif	Negatif	Skor-0
Fe_3O_4 NPs DPPC/P(MEMA-GMA)	70 Pozitif	Negatif	Skor-0
5-FU yüklü Fe_3O_4 NPs DPPC/P(MEMA-GMA)	100 Pozitif	10 Pozitif	Skor-0

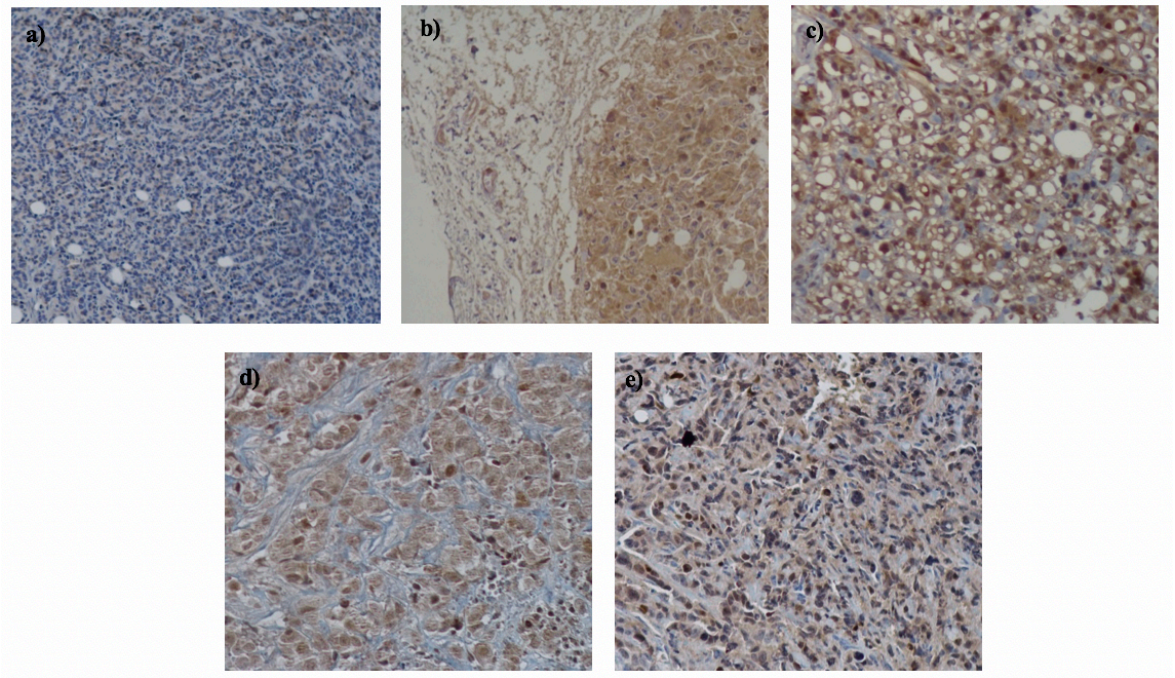
Yukarıda verilen Çizelge 4.12 incelendiğinde ER yüzdesi hemen hemen tüm gruplarda pozitif, PR yüzdesi değişken ve Cerb-B2 yüzdesi negatif çıkmıştır. Meme kanser hücrelerinin yüzey reseptörü olan, insan epidermal büyüme reseptörü (Cerb-B2 ya da HER2 olarak adlandırılır) için skor değerinin 0 çıkması MCF-7 hücrelerinin yüzeyinde bulunan insan epidermal büyüme hücresinin aşırı dozda çoğalmadığı anlamına gelir.

Bu çalışmada ayrıca p53 isimli kanser oluşumunu engelleyici bir reseptörün de analizi yapılmıştır. p53 geni immün sistemde kanser önleyici bir gendir. Eksikliği ya da yapısının bozulması kanser hücrelerinin daha hızlı çoğalmasına yol açmaktadır. İkinci grupta p53 geninin artış göstermesi dokunun tedaviye yanıt verdiğini göstermektedir.

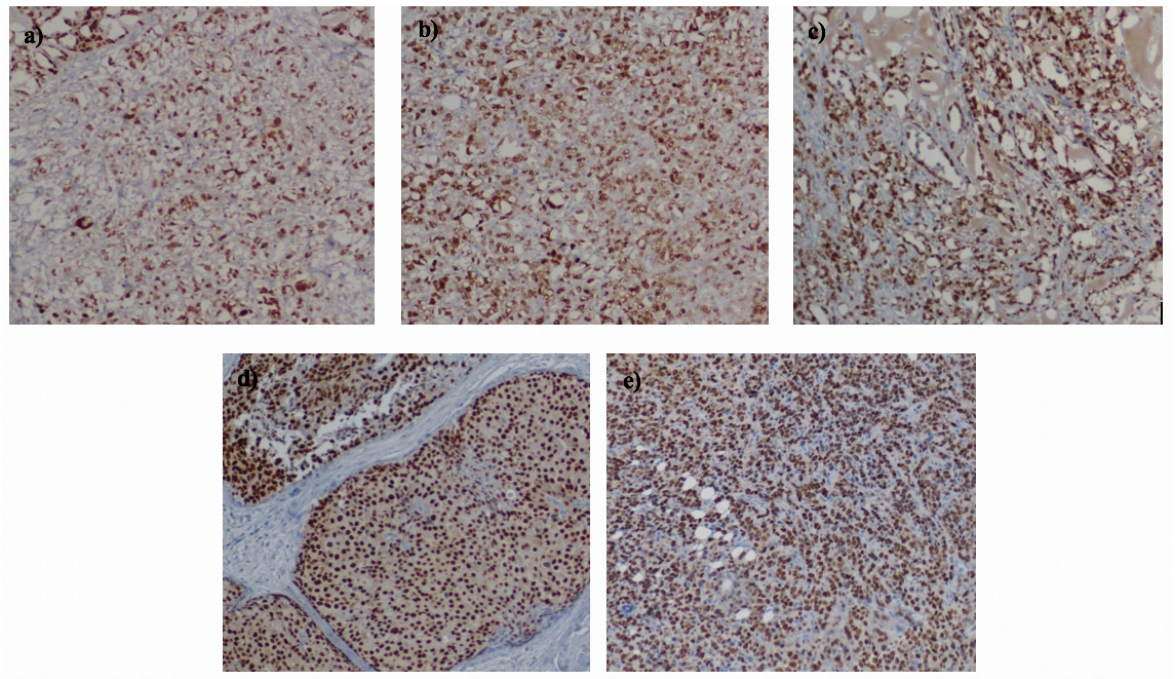
Meme tümör dokularının immünohistokimyasal boyama ile elde edilen görüntüler aşağıdaki Şekil 4.56 ve 4.57'de verilmiştir. Meme tümör dokularında immünohistokimyasal boyama ile incelenen ER, PR, p53 ve Cerb-B2 gen görüntüleri Şekil 4.53, Şekil 4.58'de verilmiştir.



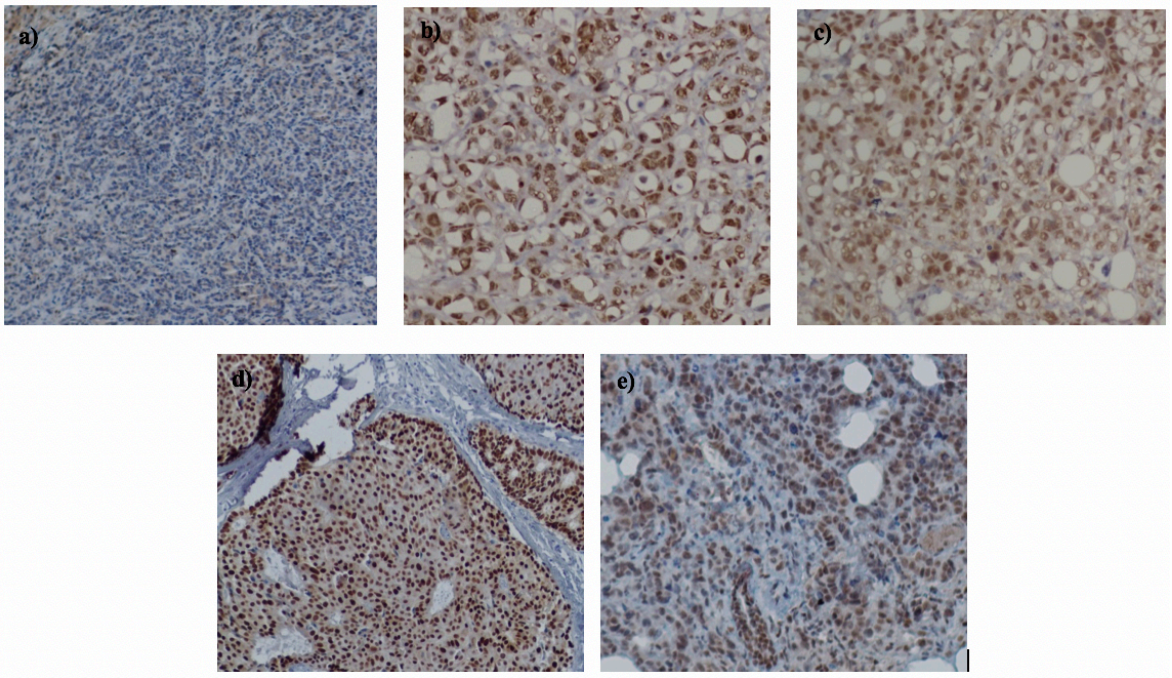
Şekil 4.53. Meme dokuya komşu tümöral dokular (H&Ex10); a) Kontrol grubu, b) DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem, c) Serbest 5-FU, d) Fe_3O_4 içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem, e) Fe_3O_4 içeren 5-FU yüklü DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem



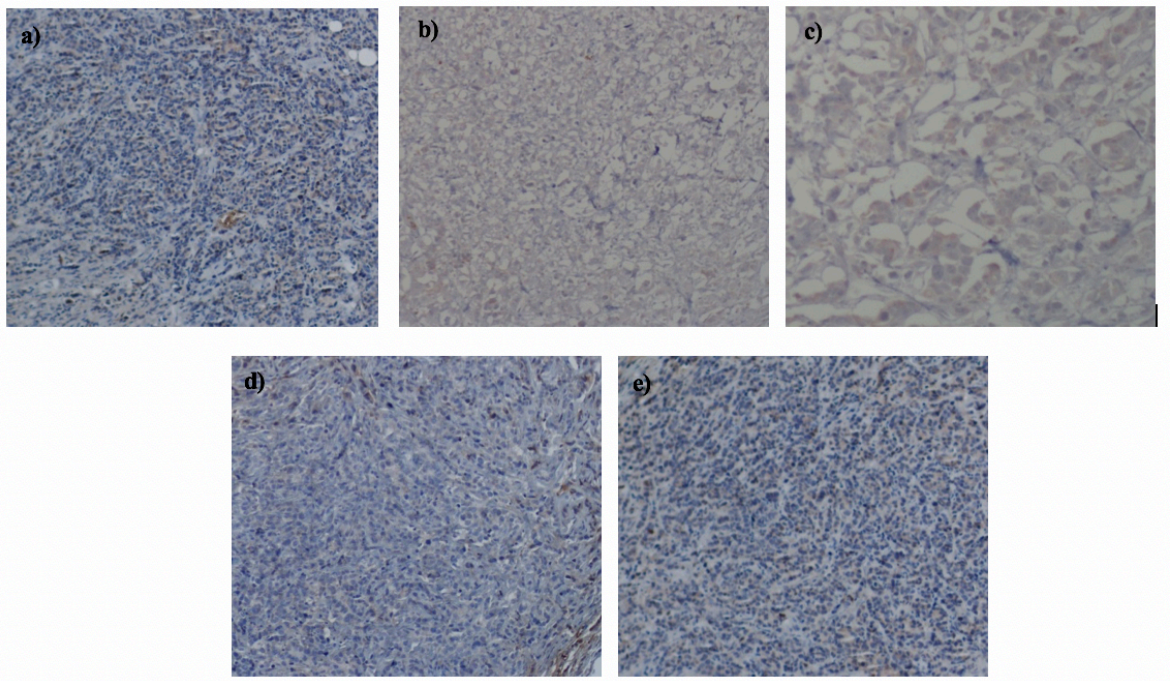
Şekil 4.54. Tümör dokuları p53 gen reseptör pozitifliği (p53 x20); a) Kontrol grubu (%0), b) DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel (%30 +), c) Serbest 5-FU (%45 +), d) Fe_3O_4 içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%25 +), e) Fe_3O_4 içeren 5-FU yüklü DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%60 +)



Şekil 4.55. Tümör dokuları ER (östrojen)reseptör pozitifliği (ER x10); a) Kontrol grubu (%100 +), b) DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel (%100 +), c) Serbest 5-FU (%100 +), d) Fe_3O_4 içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%70 +), e) Fe_3O_4 içeren 5-FU yüklü DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%100 +)



Şekil 4.56. Tümör dokuları PR (progesteron) reseptör pozitifliği (ER x10); a) Kontrol grubu (%70 +), b) DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel (%60 +), c) Serbest 5-FU (%0), d) Fe_3O_4 içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%0 e) Fe_3O_4 içeren 5-FU yüklü DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%10 +)



Şekil 4.57. Tümör dokuları Cerb-B2 reseptör negatifliği (Cerb-B2 x10); a) Kontrol grubu (%0), b) DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel (%0), c) Serbest 5-FU (%0), d) Fe_3O_4 içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%0 e) Fe_3O_4 içeren 5-FU yüklü DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem (%0)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mikrojellerin sentez, karakterizasyon ve uygulama alanlarının geliştirilmesi amacı ile hazırlanan bu tez kapsamında, PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimer stabilizörü ATRP yöntemi ile sentezlenmiş ve polimerin karakterizasyonu GPC ve ^{1}H-NMR kullanılarak aydınlatılmıştır. PEG_{113}-*b*-$PMEMA_{10}$ blok kopolimeri stabilizör olarak kullanılarak sulu ortamda P(MEMA-GMA) mikrojel sentezlenmiştir. Mikrojellerin çevre duyarlılık ve ilaç taşıyıcı ve salım sistemi olarak kullanılabildiği çalışılmıştır. GMA otoçapraz bağlayıcı, tepkime sıcaklığı ve karıştırma hızı gibi değişkenler ile hedeflenen kontrollü salım sistemine en uygun şekilde geliştirilmiştir. Sentezlenen mikrojellerin sulu dispersiyonların boyut analizi dinamik ışık saçılımı (DLS) ile yapılmıştır. Mikrojellerin yapısal karakterizasyonu geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile yapılmıştır. P(MEMA-GMA) mikrojelin içerisinde Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve analizi TEM, SEM-EDX ile gerçekleştirilmiştir.

P(MEMA-GMA) mikrojel içerisinde boyutları yaklaşık 10-15 nm olan AuNPs başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve TEM aracılığı ile görüntülenmiştir. Gram pozitif ve gram negatif *Bacillus cereus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, Enterococus feacalis, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhimirium, Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Candida albicans, Geotrichum candidum* bakteri ve mayalar üzerine bu AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojellerin antibakteriyel ilaç olan amoxicillin ve antifungal ilaç olan Ketokonazol kullanılarak yapılan karşılaştırmalı sonuçlarından, AuNPs/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin antibakteriyel etkinliğinin oldukça umut verici olduğu sonucuna varılmıştır.

Mikrojellerin farklı derişimlerde MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) ve L929 (fibroblast hücre hattı) üzerine toksik etkisi XTT ile incelenmiştir. Bu sonuçlar kullanılarak DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel, Fe_3O_4 manyetik nanopartikül içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 manyetik nanopartikül içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sitemler için *in-vivo* çalışmalarda kullanılacak doz 100 ppm (μg/mL) olarak belirlenmiştir.

Sentezlenen P(MEMA-GMA) mikrojellerin ilaç taşıyıcı ve salım sistem olarak kullanımları hedeflenmiştir. *In-vitro* salımlarda katı tümör bölgelerinde hızlı kanser hücresi çoğalmasını engelleyen 5-florourasil (5-FU) model ilaç etken madde kullanılmıştır. Mikrojellerin içerisine 5-FU ilaç etken madde yüklenmesi sırasında dondurularak kurutulan mikrojeller 1000 ppm 5-FU içeren 0,01 M PBS içerisinde oda sıcaklığında 24 saat inkübe edilmiştir. 5-FU yüklü P(MEMA-GMA) mikrojellerden ilaç salımı 37 ºC ve 42 ºC, 0,01 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) ve 37 ºC sıcaklıkta serum fizyolojik (SF) ile yapılmıştır. İki farklı sıcaklıkta yapılan salım çalışmasının sonuçlarına göre sıcaklık değişimi ile salım profilinde ilk 4 saatte bir değişim söz konusudur. Sıcaklık artışı ile mikrojelin por genişliği daralmış ve dolayısıyla ilacın mikrojelden salım miktarı da bu daralmaya bağlı olarak bir miktar azalmıştır. *In-vitro* salım çalışmaları yüksek basınç sıvı kromotografisi (HPLC) ile 266 nm sabit dalga boyunda UV-vis. spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Yine P(MEMA-GMA) mikrojelden ilaç salımının PBS ve SF içerisinde salım profili incelendiğinde, salımın aynı hızda olduğu görülmüştür. Böylece sistemin PBS ve SF içerisinde kararlılığını koruduğu ortaya konulmuştur.

İlaç taşıyıcı sistem olarak geliştirilen mikrojellerin hedefe yönlendirilmesi çalışmalarının ön çalışmaları olarak P(MEMA-GMA) mikrojel sistemlerin içerisinde Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Fe_3O_4 NPs/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem bünyesinde bulunan Fe_3O_4 nanopartiküllerin ebadı yaklaşık 10 nm olarak TEM/SEM ile ve Fe miktarı taramalı elektron mikroskopu (SEM) bağlantılı enerji dağılımı X-ışını spektroskopisi (EDX) ile belirlenmiştir.

Lipozom sentezinde 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) fosfolipit ve kolestrol kloroform dağıtılmış, ardından döner buharlaştırıcıda çözücü uzaklaştırılarak ince film oluşturulmuştur. Oluşturulan ince film lipit tabakası 0,01 M PBS tampon ile 65 °C sıcaklıkta ultrasonik banyoda hidrate edilmiş, hidrate edilen lipozomların stabilizasyonu arttırılmıştır. 65 °C sıcaklıkta 20 kez 100 nm 20 kez 50 nm polikarbonat membran filtre içeren mini-Extruder ile tek tabakalı lipozom hazırlanmıştır. Hazırlanan DPPC lipozomun boyutu DLS ile yaklaşık 100 nm olarak ölçülmüştür. Lipozomun yapısal karakterizasyonu TEM ile yapılmıştır. Etken madde 5-FU yüklü lipozom sentezinde bir önceki basamakta DPPC lipozom sentezinde anlatılan sistem tekrar edilmiş fakat lipozomun hidratasyon basamağında 0,01 M PBS tampon içerisinde 1000 ppm 5-FU etken çözülmüş

ve 65 °C sıcaklıkta hidratasyonun ardından 20 kez 100 nm 20 kez 50 nm polikarbonat membran filtre içeren mini-Extruder ile 5-FU yüklü tek tabakalı lipozom hazırlanmıştır. Lipozom/mikrojel kompozit sistemlerin sentezin 50 nm hazırlanan DPPC lipozomlar mikrojel sentezi sırasında tepkime ortamına ilave edilmiştir. Sentezlenen DPPC lipozom-P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemlerin boyut analizi DLS ölçümleri ile yapılmıştır. 5-FU yüklü lipozom, mikrojel sentezi sırasında tepkime ortamına ilave edilmiştir. 5-FU yüklü lipozom/mikrojel kompozit sistemden ilaç salımı 37 ºC, 42 ºC 0,01 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) ve 37 ºC serum fizyolojik içerisinde yapılmıştır. DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemden 37 ºC ve 42 ºC sıcaklıklardaki 5-FU ilaç etken maddesinin salım grafiği karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, ilacın her iki sıcaklıkta da aynı hızla salındığı ortaya çıkmıştır. Bu sonuç sistemin sıcaklık duyarlı olmadığı fakat salımın kararlı olduğu anlamına gelmektedir. P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden, 5-FU ilaç etken maddesinin *in-vitro* 37 °C sıcaklıkta salımı incelendiğinde lipozom/mikrojel sistemden ilaç etken maddesinin salımının mikrojelden ilaç etken maddesi salımında daha yavaş olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemin 5-FU ilaç etken maddesini daha kontrollü bir şekilde saldığı sonucuna ulaşılmıştır. 5-FU ilaç etken maddesinin P(MEMA-GMA) mikrojel ve DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistemden 42 °C sıcaklıkta salım grafiği incelendiğinde yine bu sıcaklıkta mikrojelin lipozom/mikrojel sistemden daha hızlı ilacı saldığı sonucuna varılmıştır. 5-FU yüklü lipozom/mikrojel sistemin hedefe yönlendirme çalışmasında kullanılması amacı ile, sistemin yüzeyinde Fe_3O_4 manyetik nanopartikül sentezi sağlanmıştır. Kompozit sistemden ilaç salımı 37 ºC, 42 ºC 0,01 M PBS ve 37 ºC serum fizyolojik içerisinde yapılmıştır. *In-vitro* salım çalışmaları HPLC ile 266 nm sabit dalga boyunda UV-vis. spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir.

DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem, Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem ve 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem kompozit sistem kullanılarak CD-1 dişi farelerde oluşturulan meme kanseri modeli tedavisi kontrol grubu ve serbest 5-FU uygulanması ile elde edilen sonuçlar RT-PCR ve patolojik olarak değerlendirilmiş ve aynı zamanda immünohistokimyasal boyama metodu ile dokular değerlendirilmiştir. RT-PCR sonuçlarına göre kontrol grubu olarak adlandırılan grupta TS reseptörün mRNA oranı beklendiği gibi 5-FU ilaç etken madde ile tedavi edilen gruptan yüksektir. Burada önemli

olan sonuç 5-FU ilaç etken maddesi içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem enjekte edilen CD-1 dişi farele/rde TS reseptör oranının nRNA düzeyi önemli derece azalmıştır. Ayrıca 5-FU ilaç etken maddesi içermeyen Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem enjekte edilen CD-1 dişi farelerde de TS reseptör mRNA oranı azalmıştır. PR resöptörü mRNA düzeyinde de istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlenmiştir. EFGR ve ER reseptör miktarı da 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem ile tedavi edilen farelerde azalmış fakat bu azalma istatistiksel olarak anlam ifade etmemiştir. Bu sonuçlara göre meme kanserinin önemli göstergelerinden olan östrojen, progesteron ve EFGR miktarı azalmış yani CD-1 dişi fareler tedaviye yanıt vermişlerdir.

İmminohistokimyasal boyama sonuçlarına göre ise kontrol grubu, serbest 5-FU, DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel, Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem ve 5-FU yüklü Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel sistem kompozit sistem kullanılan ile tedavi edilen grupların tümör dokularında, tümör oluşturulması sırasında kullanılan MCF-7 hücre hattından dolayı beklendiği gibi ER pozitif, PR pozitif ya da negatif, Cerb-B2 negatif skor göstermiştir. Tüm gruplarda tümör dokusunun oluştuğu patolojik olarak ortaya koyulmuştur. İmminohistokimyasal boyama metodu ile incelenen tüm gruplarda 5-FU ilaç etken maddenin meme kanseri etkisi sonucu ortaya çıkan önemli bir gen olan p53 geni incelenmiştir. Çıkan sonuçlara göre kontrol grubunda negatif (%0) olan p53 geni serbest 5-FU tedavi edilen grupta %45 değerinde belirlenmiştir. DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel ile tedavi edilen gruplarda da şaşırtıcı bir şekilde %30 civarında p53 gen reseptörüne rastlanmıştır. Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem enjekte edilen grupta p53 geni %25 dolayında, 5-FU yüklü Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem enjekte edilen grupta ise %60 değerine çıkmıştır. RT-PCR ile incelenen TS enzim reseptöründe belirlenen azalma ve immünohistokimyasal boyama ile incelenen p53 geninde belirlenen artma belirlenmiştir. Serbest ilaç ile 5-FU içeren Fe_3O_4 manyetik NPs/DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistem sistem enjekte edilen CD-1 farelerde TS ve p53 için ortaya çıkan sonuçlar ikili olarak değerlendirildiğinde çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlandığı ve Fe_3O_4 manyetik NPs içeren DPPC lipozom/P(MEMA-GMA) mikrojel kompozit sistemin ilaç taşıyıcı ve salım sistemi olarak kullanılabileceği

kanıtlamıştır. Aynı zamanda ilaç taşıyıcı sistemin 5-FU içermeyen şekliyle de tümör dokuyu etkilediği ve p53 geninin oluşma mekanizmasını tetiklediği sonucu da ortaya koyulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abalaka, M. E., Daniyan, S. Y., Adeyemo, D., Damisa, D., 2014, The Antibacterial Efficacy of Gold Nanoparticles Derived from Gomphrena celosioides and Prunus amygdalus (Almond) Leaves on Selected Bacterial Pathogens, Int. J. Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 8(4).

Adroher-Benitez, I., Ahualli, S., Martin-Molina, A., Quesada-Perez, M., Monchho-Jorda A., 2015, Role of steric interactions on the ionic permeation inside charged microgels: theory and simulations, Macromolecules 48(13): 4645-4656.

Agbugba, C. B., Hendriksen, B.A., Chowdhry, B.Z., Snowden, M.J., 1998, The redispersibility and physico-chemical properties of freeze-dried colloidal microgels, Colloid Surfaces A, 137(1-3): 155-164.

Ait-Oudhia, S., Mager, D.E., Straubinger, R.M., 2014, Application of pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis to the development of liposomal formulations for oncology." Pharmaceutics 6(1): 137-174.

Alarcon, C. D. H., Pennadam, S., Alexander, C., Stimuli responsive polymers for biomedical applications, Chem. Soc. Rev., 34(3): 276-285.

Amalvy, J. I., Wanless E.J. Michailidou, V., Armes, S.P., 2004, Synthesis and characterization of novel pH-responsive microgels based on tertiary amine methacrylates, Langmuir, 20(21): 8992-8999.

Almog, Y., Reich, S., Levy, M., 1982, Monodisperse polymeric spheres in the micron size range by a single step process, Poly. Int.,l 14(4): 131-136.

An, E., Jeong, C. B., Cha, C., Kim, D. H., Lee, H., Kong, H., Kim, J., Kim, J.W., 2012, Fabrication of microgel-in-liposome particles with improved water retention, Langmuir, 28(9): 4095-4101.

Anderson, M., Omri, A., 2008. The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations, Drug Delivery 11,2004(1): 33-39.

Arshady, R., 1992, Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey." Colloid and Polymer Sci., 270(8): 717-732.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Arias, J. L., Gallardo, V., Ruiz, M. A., Delgado, A. V., 2008, Magnetite/poly(alkylcyanoacrylate) (core/shell) nanoparticles as 5-Fluorouracil delivery systems for active targeting, Eur. J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics 69(1): 54-63.

Atobe, M., Okamoto, M., Fuchigami, T., Park, J.E., 2010, Selective hydrogenation by polymer-encapsulated platinum nanoparticles prepared by an easy single-step sonochemical synthesis, Ultrasonics Sonochemistry, 17(1): 26-29.

Awan, M. A., Dimonie, V. L., El-Aasser, 1996, Anionic dispersion polymerization of styrene. I. Investigation of parameters for preparation of uniform micron-size polystyrene particles with narrow molecular weight distribution, J. Poly. Sci. Part A 34(13): 2633-2649.

Bangham, A. D.,1980, Liposomes in biological systems, John Wiley and Sons: Chichester, 1980.

Bangham A. D., Standish. M. M., Watkins J. C., 1965, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipits, J. Mol. Biol., 13(1): 238-252.

Barreiro-Iglesias, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., 2003, Poly(acrylic acid) microgels (carbopol (R) 934)/surfactant interactions in aqueous media Part II: Ionic surfactants, Int. J. of Phar. 258(1-2): 179-191.

Barrett, K. E. J., 1975, Dispersion polymerization in organic media, Br. Polym., 5:259-271.

Berkel, v. K. Y., Hawker, C. J., 2010, Tailored composite polymer-metal nanoparticles by miniemulsion polymerization and thiol-ene functionalization, J. Poly. Sci. Part a-Polymer Chemistry 48(7): 1594-1606.

Bickford, L. R., Agollah, G., Yu, T.K., 2010, Silica-gold nanoshells as potential intraoperative molecular probes for HER2-overexpression in ex vivo breast tissue using near-infrared reflectance confocal microscopy, Breast Cancer Res. Tr., 120(3): 547-555.

Borase, H. P., Patil, C. D., Suryawansshi, R. K., Koli, S. H., Mohite, B. V., Benelli, G., Patil, S. V. 2017, Mechanistic approach for fabrication of gold nanoparticles by Nitzschia diatom and their antibacterial activity, Bioprocess and Biosystems Engineering, 40(10):1437-1446.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Brasch, U., Bucrhard, W., 1996, Preparation and solution properties of microhydrogels from poly(vinyl alcohol), Macromol. Chem. Phys., 197(1): 223-235.

Butun, V., Atay, A., Tuncer, C. Bas, Y., 2011, Novel multiresponsive microgels: synthesis and characterization studies, Langmuir, 27(20): 12657-12665.

Butun, V. Armes, S. P., Billingham, N.C: 2001, Synthesis and aqueous salutıion properties of near-monodisperse tertiary amine methacrylate homopolymer and diblock copolymers, Polymer, 42: 5993-6008.

Barenholz, Y., 2012, Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned." J. Control. Release 160(2): 117-134.

Cao, R.,Gu, Z., Patterson, D., Armitage, A., 2004, A recoverable enzymatic microgel based on biomolecular recognition, JACS, 126(3): 726-727.

Cern, A., Nativ-Roth, E., Goldblum, A., Barenholz, Y., 2014, Effect of solubilizing agents on mupirocin loading into and release from PEGylated nanoliposomes, J Pharm. Sci. 103(7): 2131-2138.

Chacko, A. M., Hood, E. D., Zern, B. J., Muzykantov, 2011, Targeted nanocarriers for imaging and therapy of vascular inflammation, Curr. Opin. Coll.Int. Sci. 16(3): 215-227.

Chan, K., Pelton, R., Zhang, J., 1999, On the Formation of Colloidally Dispersed Phase-Separated Poly(N-isopropylacrylamide), Langmuir, 15(11): 4018-4020.

Chen, T., Cao, Z., Guo, X., Nie, J., Xu, J., Fan, Z., Du, B., 2011, Preparation and characterization of thermosensitive organic-inorganic hybrid microgels with functional Fe_3O_4 nanoparticles as crosslinker, Polymer 52(1): 172-179.

Chern, C. S., 2006, Emulsion polymerization mechanism and kinetics, Prog. Poly. Sci., 31: 443-486.

Christodoulakis, K. E., Palioura, D., Anastasiadis, S.H., Vamvakaki, M., 2009, Metal nanocrystals embedded within polymeric nanostructures: effect of polymer-metal compound interactions, Top. Catalysis 52(4): 394-411.

Chiefari, J., Chong, Y. K., Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T. P. T., Mayadunne, R. T. A., Meijs, G. F., Moad, C. L., Rizzardo, E, Thang, S. H., 1998, Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT Process, Macromolecules, 31(16): 5559-5562.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Costa, E., Lloyd, M. M., Chopko, C., Aguiar-Ricardo, A., Hammond, P.T., 2012, Tuning smart microgel swelling and responsive behavior through strong and weak polyelectrolyte pair assembly, Langmuir 28(26): 10082-10090.

Daniel, M. C., Astruc, D., 2004, Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnolog, Chem. Rev., 104(1): 293-346.

Das, M., Mardyani, S., Chan, W. C. W., Kumacheva, E., 2006, Biofunctionalized pH-responsive microgels for cancer cell targeting: Rational design, Adv. Mater., 18(1): 80-83.

Delaittre, G., Save, M., Charleux, B., 2007, Nitroxide-mediated aqueous dispersion polymerization: from water- soluble macroalkoxyamine to thermosensitive nanogels, Macromol. Rapid Comm., 28(15): 1528-1533.

Dong, J., Zhou, J.,2013, Solvent-responsive behavior of polymer-brush-modified amphiphilic gold nanoparticles, Macromolecular Teory and Simulations, 22(3): 174–186.

Dongling, M., Guan, J., Normandin, F., Dénommée, S., Enright, G., Veres, T., Simard, B., 2006, Multifunctional nano-architecture for biomedical applications, Chemistry of Materials 18(7): 1920-1927.

Duracher, D. Elaissari, A., Pichot, C., 1999, Preparation of poly(N-isopropylmetacrylamide) latexes kinetics studies and characterization, J. Poly. Sci., 37(12): 1823-1999.

Dupin, D., rosselgong, J., Armes, S. P., 2007, Swelling kinetics for a pH-Induced latex-to-microgel transition, Langmuir 23(7): 4035-4041.

Eichenbaum, G. M., Kiser, P. F., Dobrynin, A. V., Simon, S. A., Needham, D., 1999, Investigation of the swelling response and loading of ionic microgels with drugs and proteins: The dependence on cross-link density, Macromolecules, 32(15): 4867-4878.

Elaissari, A., Mahdivian, A.R., 2011, Polimerization kinetics of mikrogel particles, Microgel suspensions fundemaltal and applications. Wiley-VCH. (Bölüm1): 2-37.

Elaïssari, F. M. P. (2006). "Effect of thiol-containing monomer on the preparation of temperature-sensitive hydrogel microspheres, Coll. Poly. Sci., 284(11): 1287-1292.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Elk, M. V., Lorenzato, C., Ozbakir, B., Oerlemans, C., Storma, G., Nijsen, F., Deckers, R.,

Eloy, J. O., Topan, J.F., Antonio, H., Barcellos, J. P. A., Chesca, D. L., Serafini, L. N., Tiezzi, D. G., Lee, R. J., Marchetti, J. M., 2016, Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy, Coll. Surface B: Biointerfaces 141: 74-82.

Felice, B., Prabhakaran, M. P., Rodríguez, A. P., Ramakrishn, S., 2014, Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective, Mater. Sci. Engineering C 41: 178-195.

Flory, P. J., 1953, Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press.

Gabizon, A., Martin. F., 1997, Polyethylene glycol-coated (Pegylated) liposomal doxorubicin." Drugs, 54: 15-21.

Garcia, G., MArquea, M., Cai, T., Rosario, R., Hu, Z., Gust, D., Hayes, M., Vail, S.A., Park, C.D., 2007, Photo, thermally, and pH-responsive microgels, Langmuir, 23(1): 224-229.

Ge, J., Neofytou, E., Cahill T. J., Beygui, R. E., Zare, 2012, Drug release from electric-field-responsive nanoparticles, Acs Nano, 6 (1): 227-233.

Gigli, M., Lotti, N., Gazzano, M., Siracusa, V., Finelli, L., Murani, A., Rosa, M. D., 2014, Biodegradable aliphatic copolyesters containing PEG-like sequences for sustainable food packaging applications, Poly. Degrad. Stabi., 105: 96-106.

Gupta, A. K., Curtis, A. S. G., 2004, Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: Interaction studies with human fibroblasts in culture, J. Mater. Sci-Mater. M., 15(4): 493-496.

Hashemi-Moghaddama, H., Kazemi-Bagsangani, S., Jamili, M., Zavareh, S., 2016, Evaluation of magnetic nanoparticles coated by 5-fluorouracil imprinted polymer for controlled drug delivery in mouse breast cancer model, Inter. J. Pharma., 497(1-2): 228-238.

Hanus, J., Ullrich, M., Dohnal, J., Singh, M., Stepanek, F., 2013, Remotely controlled diffusion from magnetic liposome microgels, Langmuir, 29(13): 4381-4387.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Heeres, J., Backx, L. J. J., Mostmans, J. H., Cutsem, J. V., 1979, Antimycotic imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent, J. Medicinal Chem., 22(3): 1003-1005.

He, J., Zhao, Y., 2011, Light-responsive polymer micelles, nano- and microgels based on the reversible photodimerization of coumarin. Dyes and Pigments, 89(3): 278-283.

Hendrickson, G. R., Lyon, L. A., 2009, Bioresponsive hydrogels for sensing applications, Soft Matter, 5(1): 29-35.

Hendrickson, G. R., Smith, M. H., South, A. B., Lyon, L. A., 2010, Design of Multiresponsive Hydrogel Particles and Assemblies, Adv. Funct. Mater., 20(11): 1697-1712.

Housni, A., Zhao, Y., 2010, Gold nanoparticles functionalized with block copolymers displaying either LCST or UCST thermosensitivity in aqueous solution, Langmuir 26(15): 12933-12939.

Holliday, D.L., Speirs, V., 2011, Choosing the right cell line for breast cancer research, Breast Cancer Res. 13(4): 215.

Hu, N., Yin, J. Y., Tang, O., Chen, Y., 2011, Comparative study of amphiphilic hyperbranched and linear polymer stabilized organo-soluble gold nanoparticles as efficient recyclable catalysts in the biphasic reduction of 4-Nitropheno, J. Poly. Sci. Part a-Polymer Chemistry 49(17): 3826-3834.

Hwang, K. J., Padki, M. M., Chow, D. D., Essien, H. E., Lai, J. Y., Beaumier, P. L., 1987, Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 901(1): 88-96.

Jeonga, E. S., Son, H. A., Kim, M. K., Park, K. H., Kay, S., Chae, P.S., Kim, J.W., 2014, Fabrication of monodisperse liposomes-in-microgel hybrid microparticles in capillary-based microfluidic devices, Coll. Surfaces B: Biointerfaces 123: 339-344.

Jennings, T., Strouse G., 2007, Past, present, and future of gold nanoparticles, Bio-Applications of Nanoparticles 620: 34-47.

Jochumab, F. D., Theato, P., 2013, Temperature- and light-responsive smart polymer materials, Chem. Society Rev. 42(17): 7468-7483.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jubya, K.A, Dwivedi, C., Kumar, M., Kota, S., Mirsa, H. S., Bajaj, P.N., 2012, Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study." Carbohydrate Polymers 89(3): 906-913

Karg, M., Hellweg, T., 2009, Smart inorganic/organic hybrid microgels: Synthesis and characterisation, J. Mater. Chem., 19(46): 8714-8727.

Kawaguch, S. Ito, K., 2005, Dispersion Polymerization, Adv. Poly., Sci 175: 299-328.

Kazakov, S., Levon, K., 2006, Liposome-nanogel structures for future pharmaceutical applications, Current Pharmaceutical Desing, 12(36): 4713-4728.

Kim, B.J., Fredrickson, H., Bang, J., Hawker, C.J., Kramer, E.J., 2009, tailoring core-shell polymer-coated nanoparticles as block copolymer surfactants, Macromolecules, 42(16): 6193-6201.

Kim, J., Jeong, S. Y., Kim, K. U., Ahn, Y. H., Quirk, R. P., 1996, Anionic dispersion polymerization. I. control of particle size, J. Poly. Sci. part A, 34(16): 3277-3288.

Kim, M. S., Lee, D. W., Park, K., Choi, E. J., Park, E. S., Kim, H. R., 2014), Temperature-triggered tumor-specific delivery of anticancer agents by cRGD-conjugated thermosensitive liposomes, Coll. Surf. B Biointerfaces, 116: 17-25.

Klinger, D., Landferter, K., 2012, Stimuli-responsive microgels for the loading and release of functional compounds: Fundamental concepts and applications, Polymer 53(23): 5209-5231.

Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z., Ho, R. J., 2014, Emerging research and clinical development trends of liposome and lipit nanoparticle drug delivery systems, J. Pharm. Sci., 103(1): 29-52.

Krishnan, R., Srinivasan, K. S. V., 2003, Controlled/“living” radical polymerization of glycidyl methacrylate at ambient temperature, Macromolecules, 36(6): 1769-1771.

Labib, M. E., Robertson, A.A. (1978). "Application of a diafiltration technique in latex studies." J. Coll. Int Sci., 67(3): 543-547.

Landfester, K., Wirjam, W., Antonietti, M., 2000, Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions, Macromolecules, 33(7): 2370-2376.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, M., Roch, A., Robic, C., Elst, L. V., Muller, R., N., 2008, Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications, Chemical Reviews 108(6): 2064-2110.

Lallya, S., Mackenzie, P., LeMaitre, C. L., Freemont, T. J. Saunders, B. R., 2007, Microgel particles containing methacrylic acid: pH-triggered swelling behaviour and potential for biomaterial application, J. Coll. Int. Sci., 316(2): 367-375.

Le Renard, P. E., Jordan, O., Faes, A., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Rufenacht, D., Bosman, F., Buchegger, F., Doelker, E., 2010, The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia, Biomaterials, 31(4); 681,705

Lee, M. K., Lim, S. J., Kim., C. K., 2007, Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipit nanoparticles, Biomaterials, 28(12): 2137-2146.

Li, D., Dunlap, J. R., Zhao, B., 2008, Thermosensitive water-dispersible hairy particle-supported Pd nanoparticles for catalysis of hydrogenation in an aqueous/organic biphasic system." Langmuir ,24(11): 5911-5918.

Li, H. F., Wu, C., Xia, M., Zhao, He, Z. Zhao, M. X., Hou, J., Li, R., Wei, L., Zhang, Li., 2015, Targeted and controlled drug delivery using a temperature and ultra-violet responsive liposome with excellent breast cancer suppressing ability, Roy. Soc. Chem. Advan., (5): 27630-27639.

Li, M., Liang, Z., Sun, X., Gong, T., Zhang, Z., 2014, A polymeric prodrug of 5-Fluorouracil-1-acetic Acid using a multi-hydroxyl polyethylene glycol derivative as the drug carrier, PLoS One, 9(11): e112888.

Liu, J, Huang, Y., Kumar, A., Tan, A., Jin, S., Mozhi, A., Liang X. J.,2013, pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy, Biotechnology Advances, 32(4): 693-710.

Liu , Q., Xu, Z., Finch, J. A., Egerton, R., 1998, A Novel Two-Step Silica-Coating Process for Engineering Magnetic Nanocomposites, Chemistry of Materials, 10(12): 3936-3940.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Liu, X. Y. Nothias, J. M., Scavone, A., Garfinkel, M., Millis, J. M., 2010, Biocompatibility investigation of polyethylene glycol and alginate-poly-l-lysine for islet encapsulation." American Society of Artificial Internal Organs Journal, 56(3): 241-245.

Li, X., Robinson, S. M., Gupta, A., Saha, K., Jiang, Z., Moyano, D. F., Sahar, A., Riyel, M. A, Rotello M. V., 2014, Functional Gold Nanoparticles as Potent Antimicrobial Agents against Multi-Drug-Resistant Bacteria, Acs Nano, 8(10): 10682-10686.

Liua, Y., Shao, Y. Lü, J., 2006, Preparation, properties and controlled release behaviors of pH-induced thermosensitive amphiphilic gels, Biomaterials 27(21): 4016-4024.

Longley, D. B., Harkin,D. P., Jonsthon, P.G., 2003, 5-Fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies, Nat. Rev. Cancer 3: 330-338.

Lopez, V. C., Handgraft, J., Snowden, M. J., 2005, The use of colloidal microgels as a (trans)dermal drug delivery system, Int.J. Pharm., 292(1-2): 137-147.

Loxley, A., Vincent, B., 1997, Equilibrium and kinetic aspects of the pH-dependent swelling of poly(2-vinylpyridine-co-styrene) microgels, Coll. Poly.Sci, 275(12): 1108-1114.

Lu, Y., Mei, Y., Ballauff, M., Drechsler, M., 2006, Thermosensitive core-shell particles as carriers for metal nanoparticles: Modulating the catalytic activity by the volume transition in networks, Abstracts of Papers of the American Chem. Society 231.

Lu, Y., Proch, S., Schrinner, M., Drechsler, M., Kempe, R., Ballauf, M., 2009, Thermosensitive core-shell microgel as a “nanoreactor” for catalytic active metal nanoparticles, J. Mater. Chem., 19(23): 3955-3961.

Lu, A.H, Salabas, E.L., Schüth, F, 2007, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application, Angew. Chem. Int. Edit, 46(8): 1222-1244.

McCann, J., Thaiboonrod, S., Ulijn, R. V., Saunders, B. R., 2014, Effects of crosslinker on the morphology and properties of microgels containing N-vinylformamide, glycidylmethacrylate and vinylamine, J. Coll. Int. Sci., 415: 151-158.

Man Li , Liang, Z., Sun, X., Gong, G., Zhang, Z., 2014, A polymeric prodrug of 5-Fluorouracil-1-acetic acid using a multi-hydroxyl polyethylene glycol derivative as the drug carrier, PLoS One, 9(11).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Manju, S., Malakozhundan, B., Vijayakumar, S., Shanthi, S., Jaishabanu, A., Ekambaram, P., Vaseeharan, B.,2016, Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of Nigella sativa essential oil coated gold nanoparticles, Microbial Pathogenesis, 91: 129-135.

Martínez-Meraa, I., Espinosa-Perqueira, M. E., Pérez-Hernándeza, R., Arenas-Alatorre, J., 2007, Synthesis of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles without surfactants at room temperature, Materials Letters, 61(23-24): 4447-4451.

Matyjaszewski, K. (1998). "Radical Nature of Cu-Catalyzed Controlled Radical Polymerizations (Atom Transfer Radical Polymerization)." Macromolecules 31(15): 4710-4717.

Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R., Janoff, A. S., 1986, Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembrane,s 858(1): 161-168.

McPhee, W., Tam, K. C., Pelton, R, 1973, Poly(N-isopropylacrylamide) Latices Prepared with Sodium Dodecyl Sulfate., J. Coll.Interf. Sci., 156(1): 24-30.

Milano, G., Chamorey, A. L., 2002, Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics, Chronobiol Int., 19(1): 177-189.

Mohan, Y. M., Lee, K., Premkumar, T., Geckeler, K. E., 2007, Hydrogel networks as nanoreactors: A novel approach to silver nanoparticles for antibacterial applications, Polymer, 48(1): 158-164.

Möller, M., Spatz, J. P., Roescher, A., 1996, Gold nanoparticles in micellar poly(styrene)-b-poly(ethylene oxide) films-size and interparticle distance control in monoparticulate films, Advan. Mater., 8(4): 337-340.

Murray, M. J. Snowden, M. J., 1995, The preparation, characterization and applications of colloidal microgels, Adv, Coll.Int. Sci., 54: 73-91.

Murthy, N., Xu, M., Schuck, S., Kunisawa, J., Shastri, N., Frechet, J. M. J., 2003, A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: Acid-degradable protein-loaded microgels, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100(9): 4995-5000.

Myers, D., 1999, Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications, Wiley-VCH., 214–252

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Naiyf, S., Bhakyaraj, K., Gopinath, K., Govindarajan, M., Kumuraguru, S., Mohan, S. Kaleeswarran, P., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Benelli, G, 2016, Gum-mediated fabrication of eco-friendly gold nanoparticles promoting cell division and pollen germination in plant cells, J. Cluster Sci., 28(1): 507-517.

Nayak, S., Lee, H., Chmielwski, J., Lyon, A., 2004), Folate-mediated cell targeting and cytotoxicity using thermoresponsive microgels, JACS, 126(33): 10258-10259.

Neu, H. C. ,1974, Antimicrobial Activity and Human Pharmacology of Amoxicillin, J. Infectious Diseases, 129 (Supplement_2): S123-S131.

Nimker, V., Jamal, H., Ghosh, P. C., Jain, S., Beotra, A., 2017, Liposomes: drug delivery system or possible doping agent, J. Drug Deliv. and Therapeutics 7(1).

Panayitou, M., Pöhner, C., Vandevyver, C., Wandrey, C., Hilbring, F. Freitag, R., 2007, Synthesis and characterisation of thermo-responsive poly(N,N '-diethylacrylamide) microgels, Reactive & Functional Polymers 67(9): 807-819.

Papahadjopoulosa, D., Vail, W.J., Jacobson, K., Poste, G., 1975, Cochleate lipit cylinders: formation by fusion of unilamellar lipit vesicles, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 394(3): 483-491.

Papell, S. S., 1965, Low viscosity magnetic fluids obtained by colloidal suspension of magnetic particles.

Park, H. Y., Lee, T. R., 2011, Thermo- and pH-responsive hydrogel-coated gold nanoparticles prepared from rationally designed surface-confined initiators, J. Nano. Res., 13(7): 2909-2919.

Park, T. G., Hoffman, A. S., 1993, Sodium chloride-induced phase-transition in nonionic poly(n-isopropylacrylamide) gel, Macromolecules, 26(19): 5045-5048.

Patten, T. E., Matyjaszewski, M., 1999, Copper(I)-Catalyzed Atom Transfer Radical Polymerization, JACS, 32(10): 895-903.

Pelton, R. H., Chibante, P., 1986, Preparation of aqueous lattices with N-isopropylacrylamide." Colloids and Surfaces 20(3): 247-256.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Pelton, R., 2000, Temperature-sensitive aqueous microgels." Adv. Coll. Int. Sci., 85(1): 1-33.

Penders, P., Stolzoff, M., Anderson, M., Webster, T. J., 2017, Shape-dependent antibacterial effects of non-cytotoxic gold nanoparticles, Int. J. Nanomedicine 12;2017: 2457-2468.

Phadtare, S., Kumar, A., Vinod, V. P., Dash, C., Palaskar, D. V., Rao, M., Shukla, G., Sivaram, S. Sastry, M., 2003, Direct assembly of gold nanoparticle "shells" on polyurethane microsphere "cores" and their application as enzyme immobilization templates, Chem. Mater. 15(10): 1944-1949.

Philip L., Ritger, N., Peppas A, 1986, A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices, J. Cont. Release, 5(1): 37-42.

Pich, A., Bhattacharya, S., Lu, Y., Boyko, V., Alder, H. J., 2004, Temperature-sensitive hybrid microgels with magnetic properties, Langmuir, 20(24): 10706-10711.

Raj, K., Maskowitz, R., 1990, Commercial applications of ferrofluids, J. Mang. Magnetic Mater., 85(1-3): 233-245.

Ratcliffe, L. P. D., Ryan, A., J., Armes, S. P., 2013, From a water-immiscible monomer to block copolymer nano-objects via a one-pot RAFT aqueous dispersion polymerization formulation." Macromolecules 46(3): 769-777.

Rahikkala, A., Aseyev, A., Tenhu, H., Kauppinen, E.I. Raula, J., 2015, Thermoresponsive nanoparticles of self-assembled block copolymers as potential carriers for drug delivery and diagnostics, Biomacromolecules, 16(9): 2750-2756.

Raymond M. Fuoss, H. Sadek., 1949, Mutual Interaction of Polyelectrolytes." Science 110(2865): 552-554.

Reddy, K. R., 2000, Controlled-release, pegylation, liposomal formulations: new mechanisms in the delivery of injectable drugs, The Annals of Pharmacotherapy, 34: 915-923.

Romeo, G., Fernandez-Nieves, A., Wyss, H. M., Acierno, D., Weitz, D., A., 2010, Temperature-Controlled Transitions Between Glass, Liquid, and Gel States in Dense p-NIPA Suspensions, Adv. Mater., 22(31): 3441-3445.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rumyantsev, A. M., Santer, S., Kramarenko, Y., 2014, Theory of Collapse and Overcharging of a Polyelectrolyte Microgel Induced by an Oppositely Charged Surfactant, Macromolecules, 47(15): 5388-5399.

Sacak, M. (1998). Polimer Kimyasına Giriç, A.Ü.F.F. Döner Sermaye işletmesi Yayınlar.

Samad, A., Sultana, Y., Aqil, 2007, Liposomal drug delivery systems: an update review, Current Drug , Delivery 4(4): 297-305.

Saunders, B. R. and B. Vincent (1999). "Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications." Adv. Coll. Int. Sci., 80(1): 1-25.

Saunders, B. R., Laajam, N., Daly, E., Teow, S., Hu, X. H., Stepro, R., 2009, Microgels: From responsive polymer colloids to biomaterials, Adv. Coll. Int. Sci., 147-48: 251-262.

Shan, J., Tenhu, H., 2007, Recent advances in polymer protected gold nanoparticles: synthesis, properties and applications, Chemical Communications, (44): 4580-4598.

Saleem, Q, Zhang, Z., Claudiu, C., Gradinaru, C., Macdonald, P. M., 2013, Liposome-coated hydrogel spheres: delivery vehicles with tandem release from distinct compartments, Langmuir, 29(47): 14603−14612.

Schacht, E., Nobels, M., Vansteenkiste, S., Demeester, J., Franssen, J., Lemahieu, A., 1993, Some aspects of the crosslinking of gelatin by dextran dialdehydes, Poly. Gels. Netw., 1(4): 213-224.

Schmid, G., 1992, Large Clusters and Colloids - Metals in the Embryonic State, Chem. Rev. 92(8): 1709-1727.

Schmid, G., Chi, L. H., 1998, Metal clusters and colloids." Advanced Materials 10(7): 515-526.

Shibayama, M., Tanaka, T., 1973, Volume Phase Transition and Related Phenomena of Polymer Gels, Advan. Poly. Sci., 109: 1-69.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sierra-Martin, B., Lietor-Santos J. J., Fernandez-Barbero, A., Nguyen, T. T., Fernandez-Nieves, A., 2011, Swelling thermodynamics of microgel particles, Microjel Suspansions Fundamentals and Applications. Wiley-VHC. 4.

Smith, C. E., Kong, H., 2014, Cross-linkable liposomes stabilize a magnetic resonance contrast-enhancing polymeric fastener, Langmuir 30(13): 3697-3704.

Stankovic, M., Tomar, J., Hiemstra, C., Steendam, R., Frijilink, H. W., Hinrichs, W. L., 2014, Tailored protein release from biodegradable poly(epsilon-caprolactone-PEG)-*b*-poly(epsilon-caprolactone) multiblock-copolymer implants, Eur. J. Pharm. Biopharm., 87(2): 329-337.

Stoeva, S. I., Huo, F., Lee, J. S., Mirkin, C. A., 2005, Three-Layer Composite Magnetic Nanoparticle Probes for DNA, JACS, 127(44): 15362-15363.

Stukel, J., Thompson, S., Simon, L., Willits,R., 2014, Polyethlyene glycol microgels to deliver bioactive nerve growth factor, J. Biomedical Mater. Research, 103(2): 604-613.

Suzuki, D., Kawaguchi, H., 2005, Modification of gold nanoparticle composite nanostructures using thermosensitive core-shell particles as a template, Langmuir, 21(18): 8175-8179.

Suzuki, D., Kawaguchi, H., 2005, Gold nanoparticle localization at the core surface by using thermosensitive core-shell particles as a template, Langmuir, 21(25): 12016-12024.

Szwarc, M., Levy, M., Milkovich, R., 1956, Polymerization initiated by elektron transfer to monomer. A new method of formation of block polymer, JACS, 78(11): 2656-2657

Tamura, M., Ichinohe, S., Tamura, A., Ikeda, Y., Nagasaki, Y, 2011, In vitro and in vivo characteristics of core–shell type nanogel particles: Optimization of core cross-linking density and surface poly(ethylene glycol) density in PEGylated nanogels, Acta Biomaterialia, 7: 3354-3361.

Teal, H. E., Hu, Z., Root, D. D., 2000, Native purification of biomolecules with temperature-mediated hydrophobic modulation liquid chromatography, Analytical Biochemistry, 283(2): 159-165.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Thomas, V., Namdeo, M., Mohan, Y. M., Bajpai, S. K., Bajpai, M., 2008, Review on polymer, hydrogel and microgel metal nanocomposites: A facile nanotechnological approach, J. Macromol. Sci. A., 45(1): 107-119.

Thompson, D. T., 2007, Using gold nanoparticles for catalysi, Nano Today, 2(4): 40-43.

Thorne, J. B., Vine, G. J., Snowden, M. J., 2011, Microgel applications and commercial considerations, Coll. Poly. Sci., 289(5-6): 625-646.

Torchilin, V. P., 2014, Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery, Nat. Rev. Drug Discov., 13(11): 813-827.

Tuncer, C., Samav, Y., Ulker, U., Baker, S.B., Butun, V., 2015, Multi-responsive microgel of a water-soluble monomer via emulsion polymerization, J. Appl.Poly. Sci., 132(24): 42072.

Vermonden, T., Hennink W., E., 2015, Alginate microgels loaded with temperature sensitive liposomes for magnetic resonance imageable drug release and microgel visualization, European Poly. J., 72: 620-731.

Vogelstein, B., Sur, S., Prives, C., 2010, p53 : the most frequently altered gene in human cancers, https://www.nature.com/scitable/topicpage/p53-the-most-frequently-altered-gene-in-14192717.

Volden, S., Kjoniksen, A. L., Zhu, K., Genzer, J., Nystrom, B., Glomm, W. R., 2010, Temperature-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles Coated with a Charged Diblock Copolymer and an Uncharged Triblock Copolymer, Acs Nano 4(2): 1187-1201.

Walker, J. P., Leech, A. M., 2013, Dynamic thermoresponsive nanoparticles for stabilization of enzymes at high temperatures (Patent).

Wang, H., Su, W., Wang, S., Wang, X., Liao, Z., Kang, C., Han, L., Chang, J., Wang, G., Pu, P., 2012, Smart multifunctional core-shell nanospheres with drug and gene co-loaded for enhancing the therapeutic effect in a rat intracranial tumor model, Nanoscale, 4(20): 6501-6508.

Wang, H., Su, W., Wang, S., Wang, X., Liao, Z., Kang, C., Han, L., Chang, J., Wang, G., Pu, P., 2014, Preparation of pH-responsive polymer core-shell nanospheres for delivery of hydrophobic antineoplastic drug ellipticine, Macromol Biosci.,14(2): 166-172.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wang, S., Luo, Y., Zengb, S., Luo, C., Zhiqing, L., Wang, Y., 2012, Dodecanol-poly(d,l-lactic acid)-*b*-poly (ethylene glycol)-folate (Dol-PLA-PEG-FA) nanoparticles: Evaluation of cell cytotoxicity and selecting capability in vitro, Coll.Surfaces B: Biointerfaces, 102: 130-135.

Wang, Y. M., Pan, C.Y., 1999, Study of yhe mechanism of the emulsifier-free emulsion polymerization of 4-vinylpyrimidine and styrene, Coll. Poly. Sci., 277(7): 658-665.

Wang, Z., Tan, B., Hussain, I., Schaeffer, N., Wyatt, M. F., Brust, M, Cooper, A. I., 2007, Design of polymeric stabilizers for size-controlled synthesis of monodisperse gold nanoparticles in water, Langmuir, 23(2): 885-895.

Watanabe, S., Ueno, K., Murata, M., Masuda, Y., 2006, Preparation of polystyrene-polyimide particles by dispersion polymerization of styrene using poly(amic acid) as a stabilizer, Poly. J., 38: 471-476.

Webster, O. W. Hertler, W. R., Sogah, D. Y., Farnham, W. B., RajanBabu, T. V., 1983, Group-transfer polymerization. 1. A new concept for addition polymerization with organosilicon initiators, JACS, 105(17): 5706-5708.

Wilkinson, M., Sherwood, R., Hearn, J., Goodall, A. R., 1979, The influence of residual styrene monomer, benzaldehyde, and microbial activity on the surface properties of polystyrene latices, The British Poly. J., 11(1): 1-6.

Wong, J. E., Diez-Pascual, A. M., Richtering, W., 2009, Layer-by-Layer Assembly of Polyelectrolyte Multilayers on Thermoresponsive P(NiPAM-co-MAA) Microgel: Effect of Ionic Strength and Molecular Weight, Macromolecules 42(4): 1229-1238.

Winterhalter, M., Lasic, D. D., 1993, Liposome stability and formation: Experimental parameters and theories on the size distribution, Chem. Physics of Lipits, 64: 35-43.

Wu, H., Zhu, L., Torchilin, V. P., 2013, pH-sensitive poly(histidine)-PEG/DSPE-PEG co-polymer micelles for cytosolic drug delivery, Biomaterials, 34: 1213-1222.

Wu, S., Dzubiella, J., Kaiser, J., Drechsler, M., Guo, X., Ballauff, M., Lu Y.,2012, Thermosensitive Au-PNIPA Yolk–Shell Nanoparticles with Tunable Selectivity for Catalysis, Angewandte Chemie International Edition 51(9):2229-2233.

Wu, X., Pelton, R. H., Hamielec, A. E., Woods, D. R., McPhee, 1994, The kinetics of poly(N-isopropylacrylamide) microgel latex formation, Coll. Poly. Sci., 272(4): 467-477.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wunder, S. Polzer, F., Lu, Y. Mei, Y., Ballauff, M., 2010, Kinetic Analysis of Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by Metallic Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes, J. Phys. Chem., 114(19): 8814-8820.

Xing, H., Tang, L., Yang, X., Hwang, K., Wang, W., Yin, Q., Wong, N.Y., Dobrucki, L.W., Yasui, N., Katzenellenbogen, J.A., Helferich, W.G., Cheng, J., Lu, Y., 2013, Selective delivery of an anticancer drug with aptamer-functionalized liposomes to breast cancer cells in vitro and in vivo, J. Mater. Chem. ,B 1(39): 5288-5297

Yang, Y., Li, J., Rong, H., Jaiang, L., 2006, A gold nanocomposite made soluble in both water and oil by the addition of a second adsorption layer of poly-N-vinyl-2-pyrrolidone on gold nanoparticles that have been made hydrophobic, Nanotechnology 17(2): 461-465.

Zha, L., Hu, J. Wang, C., Fu, S., Elaissari, Zhang, Y., 2002, Preparation and characterization of poly (N-isopropylacrylamide-co-dimethylaminoethyl methacrylate) microgel latexes, Colloid Polym. Sci., 280(1): 1-6.

Zhang, M., Li, X. H., Gong, Y. D., Zhao, N. M., Zhang, X. F., 2002, Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG, Biomaterials 23(13): 2641-2648.

Zhang, J., Cui, Z., Field, R., Moloney, M. G., Rimmer, S., Ye, H., 2015, Thermo-responsive microcarriers based on poly(N-isopropylacrylamide, Eur. Poly. J., 67: 346–364.

Zhang, J., Zou, Q., Li, X., Cheng, S., 2003, Soap-free cationic emulsion copolymerization of styrene and butyl acrylate with co-monomer in the presence of alcohols, J. Appl. Polym. Sci., 89(10): 2791-2797.

Zhang, M. C., Zhang, W. Q., 2008, Pd nanoparticles immobilized on pH-responsive and chelating nanospheres as an efficient and recyclable catalyst for Suzuki reaction in water, J. Phys. Chem., C 112(16): 6245-6252.

Zhao, Y. Tian, Y., Cui, Y., Liu, W., Ma, W., Jiang, X., 2010, Small Molecule-Capped Gold Nanoparticles as Potent Antibacterial Agents That Target Gram-Negative Bacteria, JACS, 132(35): 12349-12356.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhao, F., Du, Y. K., Xu, J. K, 2009, Dendritic-Shaped, Fractal Hybrid Nanogold Aggregates Mediated by Polymer/Surfactant Complexes on Mica Surfaces through the Salt-Induced Self-Assembly, Colloid Journal 71(1): 63-68.

Zhang, Z., Chan, J. M., Gu, F. X., Rhee, J. W., Wang, A. Z., Radovic-Moreno, A. F., Alexis, F., Langer, R., Farokhzad, O. C., 2008, Self-Assembled LipitPolymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform, Acs Nano, 2(8): 1696–1702.

Zharov, V. P., Mercer, K. E:, Galitovskaya, E. N., Smelter M. S., 2006, Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles, Biophysical Journal, 90(2):

Zheng, X., Lu, J. Deng, L., Xiong, Y., Chen, J., 2009, Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery, Int. J.Pharm., 366(1-2): 211-217.

Zsigmondy, R., 1914, Colloids and The Ultramicroscope.

ÖZGEÇMİŞ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi,
Polimer Araştırma Laboratuvarı. 26480- Eskişehir/Türkiye
GSM: +90 5424039938
damlaulker@gmail.com

Doğum Tarihi 16.03.1988

Yabancı Dil

İngilizce; İleri derecede

İş ve Öğrenim Deneyimi

2010 yılından bu yana Eskişehir Osmangazi Üniversitesi bünyesinde bulunan Polimer Araştırma Laboratuvarında, Prof. Dr. Vural Bütün'ün danışmanlığında çeşitli projelerde görev aldım. Bu süre zarfında nano boyutlu partiküllerin sentezinde sıklıkla kullanılan emülsiyon polimerizasyonu, dispersiyon polimerizasyonu ve süspansiyon polimerizasyonu gibi heterojen polimerleşme teknikleri üzerine çalışmalar yaptım. Çağımızın önemli çalışma alanlarında biri olan stabilizör sentezi için gerekli polimerizasyon tekniklerinden serbest radikal polimerizasyonu, atom transfer radikal polimerizasyonu ve grup transfer polimerizasyonu gibi homojen teknikleri kullanarak özgün homo ya da blok polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu alanlarında çalışmalar yürüttüm. Ayrıca elde edilen polimer, mikro-nanojel ve latekslerin karakterizasyonunda proton NMR spektrumlarının alınması ve yorumlanmasında, dinamik ışık saçılımı cihazı (DLS), statik ışık saçılımı cihazı (SLS), TDA/DTA termal karakterizasyon, zetapotansiyometresi, yüzey gerilim ölçer, UV-vis spektrofotometresi, IR spektrofotometresi, jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), viskozimetre-densitometre kombinasyonlu sistem, liyofilizatör, süper santrifüj, refraktometre, SEM ve TEM cihazlarının kullanımında önemli deneyime sahip olup, bu cihazların çoğu için kullanma sertifikasına sahibim. 2010 yılında "*Yüzeyaktif Suda Çözünebilir (Ko)Polimerlerin Sentezi ve Metal Nanopartikül Sentezinde Kullanımları"* başlıklı üniversite destekli projede çalıştım. Proje çerçevesinde suda çözünen polimerlerin sentezi karakterizasyonu ve bu polimerler bünyesinde altın, gümüş, platin nanopartiküllerin sentezi, bu polimerik nanopartiküllerin katalitik aktiviteleri ve anti-mikrobiyal etkinlikleri

ile ilgili çalışmaları sürdürdüm. 111T974 kodlu "*Yeni Tip Çevre Duyarlı Mikrojel Bünyesinde Metalik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Katalitik Uygulamaları"* başlıklı TÜBİTAK projesinde tam burslu olarak çalıştım. Bu proje kapsamında sentezlenen, boyutları 100-300 nm aralığında değişen mikrojellerin pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu gibi çevresel etkilere duyarlılıkları ve karakterizasyon çalışmalarını, bu mikrojeller yüzeyinde manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezi ve dış etki ile partiküllerin hedeflendirilmesi üzerine çalışmalar yaptım.

Aynı zamanda yine boyutları 100-300 nm arasında değişen mikrojellerin içerisinde altın, gümüş ve platin nanopartiküllerin (9-12 nm) sentezini ve karakterizasyon çalışmalarını yaptıktan sonra yine bu malzemeler ile çeşitli organik reaksiyonların katalitik aktiviteleri ve 13 farklı gram pozitif ve gram negatif bakteriler ve maya üzerine etkinlik çalışmalarını gerçekleştirdim.

Doktora tez çalışması TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı içerisinde bulunan 'Sağlık' alanının alt bilimi/teknoloji konularıyla ilgili olarak "biyomalzemelerin geliştirilmesi" kapsamına giren biyomalzeme üretimi ve uygulamaları kapsamında desteklenmektedir. Ayrıca tez çalışması TÜBİTAK 1002 Hızlı destek programı ve ESOGÜ BAP C-1 projesi çerçevesinde desteklenmiştir. Bu çalışmada ilaç etken maddesinin salım çalışmaları in-vitro olarak yapılmıştır. Ardından ilaç etken madde içeren taşıyıcı sistemin meme kanser bölgesine yönlendirilmesi ve tedavi etkinlik çalışmaları in-vivo olarak sürdürülmüştür.

Yurtdışı araştırma programı kapsamında Northeastern Üniversitesi-BOSTON/ABD Farmasötik Biyoteknoloji ve Nanotıp Merkezi'nde Prof. Dr. Vladimir Torchilin gözetiminde yapılan çalışmalarda, hürce kültürü oluşturulması ve amaç doğrultusunda tedavi çalışmalarında gözlem ve uygulama imkânı buldum. Doktora tez çalışmaları kapsamında hazırlanan lipozom ve/veya lipozom/polimerik sistemlerin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine etkinliği çalışmalarında yer aldım. Yine bu dönemde Northeastern Üniversitesi, Farmasötik Biyoteknoloji ve Nanotıp Merkezi bünyesinde yürütülen projelerde de çalışma imkânım ortaya çıktı.

Proje Deneyimleri

TÜBİTAK tarafından finansal desteği sağlanan projeler kapsamında örnek hazırlama, karakterizasyon ve uygulama çalışmalarında sorumlu araştırmacı olarak görev aldım.

1) **04.2012- 04.2014; 1001 programı kapsamında;** Yeni Tip Çevre Duyarlı Mikrojel Bünyesinde Metalik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Katalitik Uygulamaları (186000 TL)
2) **208.2015- 08.2016;** 1002- Hızlı Destek Programı kapsamında Çevre Duyalı Mikrojellerin Sentez, Karakterizasyon ve Uygulama Alanı (Mikrojel-Lipozom Biyomalzeme Geliştirme)

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler komisyonluğunca finansal desteği sağlanan projeler kapsamında örnek hazırlama, karakterizasyon ve uygulama çalışmalarında sorumlu araştırmacı olarak görev aldım.

3) **03.2011- 03.2013;** Yüzeyaktif suda çözünebilir (ko)polimerlerin sentezi ve metal nanopartikül sentezinde kullanımları (97000,00 TL)
4) **06.2013- 01.2016;** Yeni Bir Mikrojel-Hidrojel Soft Kompozit Sistem ve Uygulama Çalışmaları (99924,00 TL)
5) **03.2016-01.2018;** İlaç Etken Maddesi İçeren ve Manyetik Nanopartikül ile Hedeflenebilen Çevre Duyarlı Mikrojel-Lipozom Bazlı Biyomalzemelerin Meme Kanseri Tedavisi Uygulama Çalışmaları (99924,00 TL)

TÜBİTAK Burs Durumu

1) **04.2012 -04.2014; 1001 programı kapsamında;** Yeni Tip Çevre Duyarlı Mikrojel Bünyesinde Metalik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Katalitik Uygulamaları
2) **10.2014- 03.2017; 2211-C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı;** Çevre Duyarlı Mikrojellerin Sentez, Karakterizasyon Ve Uygulama Alanları Mikrojel-Lipozom Biyomalzemelerin Geliştirilmesi
3) **02.2017-05.2017 2214-C Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (doktora öğrencileri için)** Northeastern Üniversitesi, Farmasötik Biyoteknoloji ve Nanotıp Merkezi'nde Prof. Dr. Vladimir Torchilin gözetiminde "Stimule-sensitive System for Drug Delivery in Cancer" başlıklı doktora sırası araştırma bursu

Hakemli Dergi Yayınları

1) Ulker D., Tuncer C., Baker S.B., Toptas Y., Cabuk A., Butun V. 'An antibacterial composite system based on multi-responsive microgels hosting monodisperse gold nanopareticles', Journal of Polymer Research, 2017, 24:169
2) C. Tuncer, Y. Samav, D. Ulker, Ş.B. Baker, V. Butun, "Multi-Responsive Microgel of a Water-Soluble Monomer via Emulsion Polymerization" Journal of Applied Polymer Science, 2015, 132:24
3) G. Kocak, D. Ülker, C. Tuncer, S. B. Baker, V. Bütün "Use of Sulfobetaine-Based Block Copolymer as Stabilizer in Silver Nanoparticle Production and Catalytic Activity Studies" Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2018, 18:4

Uluslararası Kongre ve Toplantılar

1) D. Ülker, I.Barut, E. Sener, V. Bütün, "In-vitro Controlled Release of 5-FU Drug from a Stimuli-Responsive Microgel/Liposome Biomaterials at Different Temperature", 11th International Conference and Expo on Nano Sci. and Moleculer Tech. 22/10/2016 (sözlü sunum)
2) V. Bütün, G. Koçak, D. Ülker, C. Tuncer Ş. B. Baker, "Metal Nanoparticle Stabilization via Block Coplymers" 2th Edition Nanotech Dubai 2015, 16-18/03/2015 (sözlü sunum)
3) D. Ülker, I.Barut, E. Sener, V. Bütün, "Stimuli-Responsive Microgel/liposome Hybrid Biomaterials for Controlled and Targeted Drug Release Appliications" 11th Int. Conference and Expo on Nano Sci. and Mol. Tech. 22/10/2016 ***(en iyi poster ödülü)***
4) D. Ülker, V. Bütün, "In-vitro Application Studies of Breast Cancer Treatment Beads on Drug Loaded Stimuli-Responsive Microgel/Liposome Biomaterials Covered with Magnetic Nanoparticles which Provides a Way to Carry All System on a Target" 46th IUPAC, MBM-P-012, Istanbul, 17-2113/07/2016 (poster sunumu)
5) D. Ülker, G. Koçak, Ş. B. Baker, D. Erkmen, C. Tuncer, Y. Samav, V. Bütün, "Synthesis of Double-Hydrophilic Water Soluble Block Copolymers and Their Usage in the Synthesis of Metal Nanoparticles", 44th IUPAC, P-0641 130, Istanbul, 13/08/2013 (poster sunumu)
6) D. Ülker, C. Tuncer, Ş. B. Baker, A. Cabuk, V. Bütün, "All in One Multi-Responsive Microgels", 44th IUPAC, P-0711 2011, Istanbul, 13/08/2013 (poster sunumu)

7) C. Tuncer, Y. Samav, D. Ulker, S. B. Baker, A. Cabuk, V. Bütün, A Novel Multi-Responsive Microgels: Synthesis And Characterization Studies, Sitges (near Barcelona) Spain, 21-23/05/2013 (poster sunumu)
8) Ş. B. Baker, D. Ülker, V. Bütün, "Polyamphoteric Hydrogels As Controlled Drug Releasing Systems", 44.IUPAC, P-0642 1305, Istanbul, 13/08/2013

Ulusal Kongre ve Toplantılar

1) D. Ülker, C. Tuncer, Ş. B. Baker, Y. Toptaş, A. Çabuk, V. Bütün "Antibacterial Activity of Multi-Responsive Microgels-Gold Nanometal Hybrid System" IIIth Composite material symposium, 6-7/11/2015 (Sözlü Sunum)
2) D. Ülker, C. Tuncer, Ş. B. Baker, Y. Toptaş, A. Çabuk and V. Bütün "Catalytıc And Antıbacterıal Actıvıty Of Multı-Responsıve Mıcrogels", CLP14-079, Antalya, 1-4/05 2014 (Poster sunumu)
3) D. Ülker, G. Koçak, Ş. B. Baker, V. Bütün, "Synthesis of AB, ABC Type, Surface-Active Water Soluble Polymers and Their Usage in the Synthesis of Metalic Nanoparticle", 26.National Chemistry Congress**,** PP-TR-018, Mugla/Turkey, 2/10/2012 (Poster sunumu)

Kişisel yetenekler-kullandığı cihazlar

1) TETRA Teknolojik Sistemler LTD. ŞTİ. Seiko (SII) ExStar 6000 serisi TG/DTA Cihazı Çalışma Prensipleri, Kullanımı ve Uygulamaları Eğitim Sertifikası 5-6.06.2013
2) TETRA Teknolojik Sistemler LTD. ŞTİ., PerkinElmer Lambda 35 Model UV-VIS Spektrometre Cihazı Çalışma Prensipleri, Kullanımı Ve Uygulamaları Eğitim Sertifikası-21.22.2013
3) Anton Paar Ölçüm Aletleri Tic.Ltd.Şti., Viskozimetre ve Yoğunlukölçer Cihazı Kullanma Eğitimi-05.06.2013
4) Anton Paar Ölçüm Aletleri Tic.Ltd.Şti., DLS/SLS ölçümlerinde kullanılan Malvern marka CGS3 model Goniometre Kullanma Eğitimi- 05.06.2013
5) Atomika Teknik Cihazlar İnş.Tic.Ltd.Şti., DN/DC Ölçümü, Optilab Marka REX Model Refraktometre Cihazı Kullanım Sertifikası
6) Atomika Teknik Cihazlar İnş.Tic.Ltd.Şti., Zeta Potansiyel Ölçümü ve DLS ölçümü, Zatesizer NanoZS Model Cihazı Kullanım Sertifikası