Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**'ında **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman) :.....
Prof. Dr. Erhan Pişkin

Üye :.....
Prof. Dr. Ayla Çalımlı

Üye :.....
Prof. Dr. Tülin Kutsal

Üye :.....
Prof. Dr. Ali Tuncel

Üye :.....
Prof. Dr. Zakir Rzayev

ONAY

Bu tez ...../...../.....tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../.....

Prof.Dr. Ahmet R. Özdural
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

EŞ BOYUTLU, KATYONİK, FONKSİYONEL GRUP İÇEREN /İÇERMEYEN, MANYETİK YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE NÜKLEİK ASİT UYGULAMALARI

MONOSIZE, CATIONIC, FUNCTIONAL/NON-FUNCTIONAL GROUP CARRYING, MAGNETIC NANOPARTICLE SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND THEIR NUCLEIC ACID APPLICATIONS

GÜLDEM GÜVEN

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2005

EŞ BOYUTLU, KATYONİK, FONKSİYONEL GRUP İÇEREN / İÇERMEYEN, MANYETİK YÜKLÜ NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE NÜKLEİK ASİT UYGULAMALARI

Güldem Güven

ÖZ

Sunulan Doktora tez çalışmasının amacı katyonik (pozitif yüklü) monodispers fonksiyonel yük taşıyan veya taşımayan polimerik nanopartiküllerin ve aynı zamanda bunların manyetik yüklü formlarının plazmid DNA (pDNA) ile gen transferi ve izolasyonunda kullanımı için sentezlenmesi.

Birinci grup deneylerde, katyonik fonksiyonel gruplar taşımayan poli(stiren/*N*-[3-(dimetil amino) propil] metakrilamid/poli(etilenglikol) etil eter metakrilat) (poli(St/PEG-EEM/DMAPM)) nanopartiküller yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Kullanılan ana monomer stiren (St), katyonik monomer *N*-[3-(dimetil amino) propil] metakrilamid (DMAPM), emülsiyon ortamı stabilizasyonu da sağlayan monomer poli(etilenglikol) etil eter metakrilat (PEG-EEM), dağıtma ortamı (Su) ve başlatıcı 2,2'-azobis(2-metil propionamidin) dihidroklorür (V-50) miktarlarının partikül boy/boy dağılımlarına ve zeta potansiyeline (yüzey yüküne) olan etkileri incelenmiştir. Polimerizasyon sıcaklık ve süresinin, ortamın iyonik gücünün ve pH'sının lateks kararlılığına ve partikül boy/boy dağılımlarına olan etkileri araştırılmıştır. Ana monomer olan stiren yerine daha hidrofilik yapıda olan metil metakrilat kullanılmasının, lateks kararlılığına, partikül boy/boy dağılımına ve yüzey yüküne olan etkileri araştırılmıştır. Bu gruptaki çalışmalarda hemen hemen tüm parametrelerin partikül boy/boy dağılımında farklı ölçülerde etkin oldukları bulunmuştur. En küçük boyutlu katyonik partiküller (zeta potansiyeli: 56.2 mV) (ortalama çap: 75.1 nm) ve dar boy dağılımı ile (polidispersite indeksi, PI: 1.081) şu reçete ve koşullarda üretilmiştir: Su, St, DMAPM, PEG-EEM ve V-50 miktarları sırasıyla, 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml, ve 0.03 g, polimerizasyon sıcaklığı: 65°C; süresi; 24 saat, pH:2.5-3.0 dür. St yerine MMA ile üretilen lateksler daha az kararlıdır, partiküller daha büyük ve boy dağılımları daha geniştir.

İkinci grup deneyler de yine katyonik ancak bu kez fonksiyonel gruplar taşıyan polimerik nanopartiküller, PEG-EEM yerine, stabilizör monomer olarak polietilenglikol metakrilat (PEG-MA) kullanılarak üretilmiştir. Burada stabilizör miktarının, polimerizasyon sıcaklık ve süresinin partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkileri incelenmiştir. Bu nanopartiküller şu reçete ve koşullarda üretilmiştir: Su, St, DMAPM, PEG-MA ve V-50 derişimleri sırasıyla, 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml, ve 0.03 g, polimerizasyon sıcaklığı: 65°C; süresi; 24 saat, pH: 2.5-3.0 dür. Bu partiküllerin ortalama boyu 71.3 nm, PI: 1.110, ve a zeta potansiyeli 55.6 mV dur.

Birinci ve ikinci grup deneylerde üretilen nanopartiküllerin karakterizasyonu Zeta Sizer, Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (NMR), Elementel Analiz, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Jel Geçirgenlik Kromotogrofisi (GPC), Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve viskozimetri gibi yöntemlerle gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde ilerki çalışmalarda ayırma amacıyla kullanılabilecekleri düşünülerek manyetik yüklü nanopartiküller üretilmiştir. Bunun için önce nano boyutlu magnetit partiküller üretilmiştir. Bu partiküllerin boy, boy dağılımı ve zeta potansiyelleri sırasıyla 77 ve 130 nm, 1.236 ve 1.317, ve –48.5 ve -42.3 mV dur. Sonraki adımda bu partiküller ilk iki grupta uygulanan reçete ve koşullarda yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile kaplanmıştır. Burada üretilen manyetik yüklü poli(St/DMAPM/PEG-EEM)'in partikül boy/boy dağılımı ve zeta potansiyeli sırasıyla 155.7 nm ve 200.6 nm; PI: 1.355 ve PI: 1.141; 53.4 mV ve 47.6 mV dur. Manyetik yüklü poli(St/DMAPM/PEG-MA) için aynı değerler sırasıyla 89.3 nm ve 164.9 nm; PI: 1.617 ve PI: 1.105 ve 54.6 mV ve 50.9 mV dur. Partiküllerin karakterizasyonu Zeta Sizer, FTIR, Elektron Spin Rezonans (ESR) gibi yöntemlerle yapılmıştır.

Önceki basamaklarda üretimi gerçekleştirilen nanopartiküllerin ilk olarak genomik DNA (gDNA) ile etkileşimi incelenmiştir. Deneyler pH 3.0-10.0 aralığında değişik tamponlarda yapılmıştır. PH 3.0-8.0 aralığında oldukça yüksek etkileşim görülmüştür. Bu aralıkta nanopartiküle bağlanan DNA miktarı 204-215 mg gDNA/g

nanopartiküldür. Oluşan konjugatların boyları, pH 4.0-8.0 aralığında 111.4-256.8 nm dir.

Son grup deneylerde, ilk olarak partiküllerin HeLA hücrelerine olan toksisitesi incelenmiştir. Belli hücre sayısı için kullanılan partikül miktarına bağlı olarak, PEG-MA ile hazırlanan nanopartiküller (yaklaşık%16 toksisite), PEG-EEM (%19-26 civarında toksisite) ile hazırlananlara göre daha az toksiktir. Gen aktarımı deneyleri yeşil florasan protein (GFP) sentezleme genini taşıyan plazmid DNA (pDNA) ile yapılmıştır. Nanopartiküllerin bu pDNA ile konjugatları pH 7.4 de 0.15 M NaCl içinde oluşturulmuştur. Konjugatların boy/boy dağılımları ve yükleri Zeta Sizer ile belirlenmiştir. Konjugatların HeLa hücre hattı transfeksiyonu ve GFP ekspresyonu, HeLa hücre hattını kullanan hücre kültürlerinde incelenmiştir. GFP ekspresyonları, ilgili literatürde rapor edilen non-viral vektörlerin ulaştığı değerlerle kıyaslandığında, 72 saatte çok yüksek değerlere (yaklaşık %85-90) ulaşmıştır.

Anahtar Kelimeler: Katyonik, eşboyutlu, Stiren, polietilenglikol etil eter metakrilat, polietilenglikol metakrilat, dimetil amino propil metakrilat, V-50, emülsiyon polimerizasyonu, yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu, nanopartikül, manyetik, DNA, plazmid, HeLa

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

MONOSIZE, CATIONIC, FUNCTIONAL / NON-FUNCTIONAL GROUP CARRYING, MAGNETIC NANOPARTICLE SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND THEIR NUCLEIC ACID APPLICATIONS

Guldem Guven

ABSTRACT

The aim of this Ph.D. thesis is to synthesize cationic (positively charged), monodisperse nanoparticles, with or without surface functional groups and also their magnetically loaded forms for possible use in gene transfer with plasmid DNA (pDNA) and its isolation.

In the first goup of the experiments, cationic, non-functional, poly(styrene/N- [3-dimethylamino) propyl] methacrylamide/poly(ethyleneglycol) ethylether methacrylate) (poly(St/PEG-EEM/DMAPM)) nanoparticles were synthesized by emulsifier-free microemulsion polymerization. The effects of amount of the main monomer styrene (St), cationic comonomer *N*-[3-(dimethyl amino) propyl] methacrylamide (DMAPM), hydrophilic comonomer (which contributes also stabilization of the nanoparticle latexes) poly(ethyleneglycol) ethyl ether methacrylate (PEG-EEM), dispersion medium (Water) and cationic catalyst 2,2'-azobis(2-methyl propionamidine) dihydrochloride (V-50) on particle size/size distributions and zeta potential (surface charge) were investigated. The effect of polymerization temperature and time, ionic strength and pH of the medium on stability of latexes and particle size/size distribution were also examined. Another set of nanoparticles were produced using a more hydrophilic monomer, methyl methacrylate (MMA), instead of styrene as the main monomer. It was observed that almost all of the parameters mentioned above affected the particle size/size distribution and zeta potential, but with different extents. The smallest cationic particles (zeta potential: 56.2 mV) (average diameter: 75.1 nm) with a narrow size distribution (polydispersity index, PI: 1.081) were produced with the following recipe and the conditions: amount of water, St, DMAPM, PEG-EEM and V-50 respectively, 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml, and 0.03 g, polymerization temperature: 65°C; time; 24 hr, pH:2.5-3.0. The latexes produced with MMA instead of St were less stable, and particle sizes were larger and size distributions were broader.

In the second group of the experiments, again cationic nanoparticles but with surface functional groups were produced by using polyethyleneglycol methacrylate (PEG-MA), instead of PEG-EEM, as stabilizing monomer. Here, changes in particle size /size distribution and surface charge were examined with the changes in the amount of PEG-MA, polymerization temperature and time. In this group, the smallest nanoparticles were produced with the following recipe and conditions: Water, St, DMAPM, PEG-MA and V-50 amounts respectively, 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml, and 0.03 g, polymerization temperature: 65°C; time: 24 hr, pH:2.5-3.0. These nanoparticles have an average diameter of 71.3 nm, with a PI of 1.110, and a zeta potential of 55.6 mV.

The nanoparticles produced in the first and second group were characterized by means of Zeta Sizer, Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer (NMR), Elementel Analysis, Differential Scanning Calorimeter (DSC), Gel Permeation Chromatography (GPC), Atomic Force Microscope (AFM), Scanning Electron Microscope (SEM) and viscosimetry.

In the third part of the study, magnetically loaded nanoparticles were produced for possible applications in pDNA separation. In the first step, nano-sized magnetite particles were produced by a coprecipitation procedure. The average particle size, size distribution and zeta potential of the two different particles were 77 nm and 130 nm, PI:1.236 and PI:1.317, -48.5 mV and -42.3 mV. In the next step, these particles were coated with a polymeric layer again by emulsifier free microemulsion polymerization, in which the same recipe and conditions given in the first two group of studies mentioned above. Particle size/size distribution and zeta potential of the magnetically loaded poly(St/DMAPM/PEG-EEM) were 155.7 nm and 200.6 nm; PI: 1.355 and PI: 1.141; 53.4 mV and 47.6 mV, respectively. The same values for the magnetically loaded poly(St/DMAPM/PEG-MA) were 89.3 nm and 164.9 nm; PI: 1.617 and PI: 1.105 and 54.6 mV and 50.9 mV, respectively. Characterization of these particles were done by Zeta Sizer, FTIR, and Electron Spin Rezonans (ESR).

The interaction of the nanoparticles produced in the previous steps, with first genomic DNA (gDNA) was studied. These experiments were performed in

different buffer solutions in the pH range of 3.0-10.0. The interaction was quite high in the pH range of 3.0-8.0. In this pH range, the amount of DNA bound to the nanoparticles was about 204-215 mg gDNA/g nanoparticle. The average size of the gDNA-nanoparticles conjugates was in the range of 11.4-256.8 nm in pH range of 4.0-8.0.

In the last group of the experiments, firstly the toxicity of the particles on HeLA cells were investigated. The nanoparticles prepared with PEG-MA were less toxic (around 16%) then those ones prepared with PEG-EEM (about 19-26%) depending also the amount of nanoparticles used for certain number of cells. Gene transfer studies were performed by using a green floresence protein (GFP) expressing plasmid DNA (pDNA). Conjugates of nanoparticle with this pDNA were formed 0.15 M NaCl solution at pH 7.4. Particle size/size distribution and surface charge were determined by Zeta Sizer. HeLa cell line transfection and GFP expression of the conjugates were examined in the cell cultures using the HeLa cell line. The GFP expressions reached in 72 hr were very high (around 85-90%) comparing the gene expressions reached with the nonviral vectors reported in the related literature.

Keywords: Cationic, monosize, Styrene, polyethyleneglycol ethyl ether methacrylate, polyethyleneglycol methacylate, dimethyl amino propyl methacrylate, V-50, emulsion polymerization, emulsifier-free emulsion polymerization, nanoparticle, magnetic, DNA, plasmid, HeLa

Thesis Supervisor: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering.

TEŞEKKÜR

Bana kendisi ile çalışma fırsatı vererek önümde yeni ufuklar açan, bilgi ve tecrübesiyle yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Erhan Bişkin'e,

Tezime büyük katkıları olan, bilgi birikimini benimle paylaşarak tezimi yürütmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ali Tuncel'e,

Her zaman desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Zakir Rzaev'e,

Tez jürimde yer alarak tezimi tamamlamamda bana yardımcı olan, tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Ayla Çalımlı ve Prof. Dr. Tülin Kutsal'a,

Hücre kültürü çalışmalarını yapan ve bana destek olan Melisa Türkoğlu ve Murat Demirbilek'e,

Bilgi ve dostluklarıyla bana her zaman destek olan Sevil, Ceyhun ve Filiz'e,

Yardımlarını esirgemeyen diğer laboratuvar arkadaşlarım Oğuzhan, Bora, Tolga, Memed ve Cafer'e,

Her zaman büyük desteğini gördüğüm ve başarılarımı borçlu olduğum sevgili aileme,

Bana her türlü destek olan ve sabır gösteren sevgili eşime, çalışmalarımla birlikte büyüyen ve bana her zaman anlayış gösteren oğlum Berksu'ya,

Sonsuz Teşekkürler

Güldem Güven

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....i

ABSTRACT.....iv

TEŞEKKÜR.....vii

İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....viii

ŞEKİLLER DİZİNİ.....xiii

ÇİZELGELER DİZİNİ.....xvii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....xix

1. GİRİŞ.....1

2. TEMEL BİLGİLER.....4

2.1. Emülsiyon Polimerizasyonu.....4

2.1.1. Mikroemülsiyon Polimerizasyonu..... 7

2.1.1.1. Monomer/ Su Mikroemülsiyonları …….....7

2.1.1.2. Su/Monomer Mikroemülsiyonları.....8

2.1.1.3. Arayüzey Mikroemülsiyonları …….....9

2.1.2. Mikroemülsiyon Polimerizasyonunun Mekanizması ve Kinetiği….....10

2.1.2.1. Monomer Konsantrasyonunun Etkisi.....12

2.1.2.2. Başlatıcı Etkisi….....12

2.1.2.3. Sıcaklığın Etkisi…….. 13

2.1.2.4. Elektrolit Etkisi…….....14

2.1.2.5. Kullanılan Yüzey Aktif Maddeler.....14

2.1.3. Yüzey Aktif Madde İçermeyen Emülsiyon Polimerizasyonu……..15

2.1.4. Fonksiyonel Grup Eklenmesi……..……...19

2.2. Manyetik Partiküller.....……..20

2.2.1. Ferrosıvılar…….20

2.2.2. Manyetik Nanopartiküller.....21

2.2.3. Demir Oksitler...……22

2.2.4. Manyetit……..24

2.2.4.1. Manyetit Kristal Yapısı ve Manyetik Özellikleri……....24

2.2.4.2 Manyetit Kararlılığı ve Yüzey Kimyası ……..24

2.2.4.3. Manyetit Nanopartikülleri Sentezleme Metotları……..25

2.2.5. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküller…….....27

2.2.5.1. Polimer Partiküllerin Yüzeyine Manyetit Partiküllerin adsorpsiyonu….....27

2.2.5.2. Manyetit Partiküllerinin Polimerle Kaplanması……....28

2.3. Nükleik Asitler……29

2.3.1. Plazmid DNA……35

2.4. Gen Terapi……36

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....46

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 47

3.2. Katyonik Nanopartikül Üretimi……...48

3.2.1. Fonksiyonel Grup İçermeyen Nanopartikül.....48

3.2.2. Fonksiyonel Grup İçeren Nanopartikül…….….51

3.2.3. Manyetit Nanopartikül Sentezi……52

3.2.4. Fonksiyonel Grup İçeren ve İçermeyen Manyetik Nanopartikül Üretimi.....54

3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu……..55

3.3.1. Partikül Boy ve Boy Dağılımı……..…55

3.3.2. Yapı Analizi……58

3.3.3. Isıl Davranış……..58

3.3.4. Reaksiyon Verimi…….58

3.3.5. Molekül Ağırlığı…….59

3.3.6. Manyetik Özellik……60

3.4. Nanopartikül DNA Etkileşimi…….....61

3.4.1. Nanopartikül Genomik DNA Etkileşimi……..61

3.4.2. Nanopartikül Plazmid DNA Etkileşim……62

3.4.3. Hücre Kültürü Çalışması……62

3.4.4. Polimerlerin Floresan İşaretlenmesi

ve Hücrelere Transfeksiyonu…….....64

3.4.5. Plazmid DNA'nın Hazırlanması……..66

3.4.6. Nanopartiküllerin Toksisitesi .....……...68

3.4.7. Nanopartiküller ile Gen Aktarımı ve Expresyon.....69

4. SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI.....71

4.1. Fonksiyonel Grup İçermeyen Nanopartikül.....72

4.1.1. Toplam Monomer Dönüşümü.....74

4.1.2. Stiren Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve
Yüzey Yüküne Etkisi …….....76

4.1.3. DMAPM Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve
Yüzey Yüküne Etkisi 79

4.1.4. PEG-EEM Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve
Yüzey Yüküne Etkisi 80

4.1.5. V-50 Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve
Yüzey Yüküne Etkisi.....82

4.1.6. Su/Monomer Oranının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve
Yüzey Yüküne Etkisi.....84

4.1.7. pH'nın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi.....86
4.1.8. Tuz Derişiminin Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi ...89
4.1.9. Sıcaklığın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi.....93
4.1.10. Zamanın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi.....94
4.1.11. Ana monomer olarak Stiren Yerine Metil Metakrilat Kullanılması.....97
4.1.12. Fonksiyonel Grup İçermeyen Nanopartiküllerin Yapısal Analizi.....101
4.1.13. Termal Analiz.....110
4.1.14. Molekül Ağırlığı.....111
4.2 Fonksiyonel Grup İçeren Nanopartiküller.....115
4.2.1. Toplam Monomer Dönüşümü.....119
4.2.2. PEG-MA Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi.....119
4.2.3. Sıcaklığın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi.....121
4.2.4. Zamanın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi.....122
4.2.5. Fonksiyonel Grup İçermeyen Nanopartiküllerin Yapısal Analizi.....123
4.2.6. Termal Analiz.....128
4.2.7. Molekül Ağırlığı.....129
4.3. Manyetik Nanopartiküller.....130
4.3.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi.....131
4.3.2. Manyetik Nanopartikül Karakterizasyonu.....132
4.4. Nanopartikül Nükleik Asit Etkileşimi.....140
4.4.1. Nanopartikül Genomik DNA Etkileşimi.....141
4.4.2. Nanopartikül ile Hücreye Plazmid DNA Aktarımı.....144

4.4.2.1. Nanopartikül ile Plazmid DNA Etkileşimi.....146

4.4.2.2. Nanopartiküllerinin Toksisitesi.....149

4.4.2.3. Nanopartiküller ile Gen Aktarımı ve Ekspresyon.....151

5. SONUÇLAR.....159

6. KAYNAKLAR.....162

ÖZGEÇMİŞ.....181

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Manyetitin ters spinal kristal yapısı.....24

Şekil 2.2. Su/yağ mikroemülsiyonu ile manyetit sentezi.....26

Şekil 2.3. Nükleik asitlerdeki baz grupları.....31

Şekil 2.4. DNA ve RNA' daki nükleotidler
(a) Deoksiribo nükleotid; ve (b) Ribonükleotid.....32

Şekil 2.5. DNA' da çift sarmal yapı ve bazların eşleşmesi ile
kurulan hidrojen bağ köprüleri.....34

Şekil 2.6. Gen terapi.....36

Şekil 2.7. Polikatyonik polimer ile plazmid DNA'nın kondanzesyonu.....39

Şekil 2.8. Polimer/plazmid kompleksinin hücre içine girişi ve transkripsiyonu.....44

Şekil 3.1. Nanopartikül üretiminde kullanılan deney düzeneği……..49

Şekil 3.2. Manyetit üretiminde kullanılan deney düzeneği…….53

Şekil 3.3. Adsorpsiyon deney düzeneği.....62

Şekil 3.4. Hücre kültür laboratuvarı fotoğrafları: a) hücre kültürünün yapıldığı alan
b) hücrelerin izlendiği floresan ataçmanlı inverted mikroskop.....65

Şekil 3.5. Bu çalışmada kullanılan PEGFP-N3 plazmid DNA'nın gen haritası.....66

Şekil 3.6. Plazmid DNA saflaştırma basamakları…….....67

Şekil 4.1. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin molekül yapısı.....72

Şekil 4.2. EEM7'ye ait atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüsü.....73

Şekil 4.3. Zeta Sizer'da elde edilen bir ölçümün cihazın yazıcısından
alınan çıktısının görüntüsü.....77

Şekil 4.4. Beslemedeki St miktarının partikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....78

Şekil 4.5. Beslemedeki DMAPM miktarının partikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....79

Şekil 4.6. Beslemedeki PEG-EEM miktarının partikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....81

Şekil 4.7. Beslemedeki V-50 miktarının partikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....83

Şekil 4.8. Beslemedeki su/monomer oranının partikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....84

Şekil 4.9. Elde edilen en küçük partikül'e (EEM17) ait AFM görüntüsü
ve "derinlik profili".....86

Şekil 4.10. Ortam pH'sının nanopartikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....87

Şekil 4.11. Ortam pH'ının nanopartikül yüzey yüküne etkisi: İletkenlik ölçümleri ile
Zeta Sizer ölçümlerinin sonuçlarının karşılaştırılması.....89

Şekil 4.12. Tuz (NaCl) derişiminin nanopartikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....90

Şekil 4.13. Ortam Tuz (NaCl) derişiminin nanopartikül yüzey yüküne etkisi:
İletkenlik ölçümleri ile Zeta Sizer ölçümlerinin sonuçlarının
karşılaştırılması.....92

Şekil 4.14. Polimerizasyon sıcaklığının partikül boy/boy dağılımı
ve yüzey yüküne etkisi.....93

Şekil 4.15. Polimerizasyon zamanının toplam dönüşüme etkisi.....95

Şekil 4.16. Reaksiyon zamanının partikül boyuna etkisi.....96

Şekil 4.17. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin FTIR spektrumu.....103

Şekil 4.18. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin değişik monomer ve komonomer miktarları için elde edilen FTIR spektrumları 105

Şekil 4.19. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu.....106

Şekil 4.20. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin DSC termogramı.....110

Şekil 4.21. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin intrinsik viskozite $[\eta]_{in}$ değerinin belirlenmesi.....113

Şekil 4.22. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin kimyasal yapısı.....115

Şekil 4.23. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerinin değişik reaksiyon sıcaklıklarında SEM görüntüleri (a) 60°C (b) 65°C.....117

Şekil 4.24. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerinin AFM görüntüleri.....118

Şekil 4.25. Polimerizasyon sıcaklığının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.....121

Şekil 4.26. Polimerizasyon zamanının toplam dönüşüme etkisi.....123

Şekil 4.27. Reaksiyon zamanının partikül boyuna etkisi.....124

Şekil 4.28. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerine ait FTIR spektrumu.....125

Şekil 4.29. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu ve terpolimerin kimyasal formülü.....127

Şekil 4.30. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin DSC Termogramı.....128

Şekil 4.31. ESR spektrumları: (a) manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM) nanopartikül (200.6 nm); manyetit nanopartikülü (130 nm); ve (c) manyetik yüklü (b) olmayan poli(St/PEG-EEM/DMAPM) nanopartikül (75.1 nm).....135

Şekil 4.32. ESR spektrumları: (a) manyetik yüklü poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartikül (164.9 nm); b) manyetit nanopartikülü (130 nm); ve (c) manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartikül (71.3 nm).....136

Şekil 4.33. Nanopartiküllerin FTIR spektrumlarına aitörnekler: (a) Manyetik yüklü poli(St/PEG-MA/DMAPM); (b) Manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM); (c) manyetit (Fe_3O_4); (d) Manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-EEM/DMAPM); (e) Manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-MA/DMAPM).....139

Şekil 4.34. Değişik pH değerlerinde gDNA-nanopartikül etkileşimi.....140

Şekil 4.35. Örnek AFM görüntüleri (a) PEG-MA70 nanopartikülleri; ve (b) PEG-MA70/pDNA konjugatı.....148

Şekil 4.36. Kültür kabında tek tabaka oluşturmuş HeLa hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü.....154

Şekil 4.37. Kültür kabında tek tabaka oluşturmuş HeLa hücrelerine partikül aktarımı: (a) Işık mikroskobu ve (b) Floresan Mikroskobu.....156

Şekil 4.38. Kültür kabında tek tabaka oluşturmuş HeLa hücrelerinde gen ekspresyonu: (a) Işık mikroskobu ve (b) Floresan mikroskobu.....158

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Geçiş metalleri ve metal oksitlerin manyetik özellikleri.....22

Çizelge 2.2. Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri.....23

Çizelge 2.3. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri.....23

Çizelge 2.4. Pürin ve Pürimidin bazları.....30

Çizelge 2.5. RNA ve DNA arasındaki farklılıklar.....32

Çizelge 2.6. Gen Aktarımında kullanılan vektörlerin avantaj ve dezavantajları.....43

Çizelge 3.1. Polimerizasyon reçeteleri.....50

Çizelge 3.2. MMA kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait reçeteler……51

Çizelge 3.3. PEG-MA içeren terpolimere ait yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu reçetesi.....52

Çizelge 3.4. HeLa hücrelerinin kültür koşulları……63

Çizelge 3.5. Plazmid adsorpsiyon tampon çözeltileri……..68

Çizelge 4.1. Farklı reçetelerle hazırlanan poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerine.....75

Çizelge 4.2. St yerine MMA kullanılarak yüzey aktif madde içermeyen polimerizasyonların reçeteleri.....98

Çizelge 4.3. St yerine MMA kullanılarak yüzey aktif madde içermeyen polimerizasyonların Zeta Sizer ile elde edilen toplu sonuçları.....99

Çizelge 4.4. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.....102

Çizelge 4.5. Monomerlere ait reaktiflik oranları.....108

Çizelge 4.6. ^{1}H-NMR spektrumundan hesaplanan kopolimer içerikleri.....109

Çizelge 4.7. Terpolimere ait elementel analiz sonuçları.....110

Çizelge 4.8. Farklı reçetelerle hazırlanan poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerine ait toplam dönüşüm miktarları.....119

Çizelge 4.9. PEG-MA miktarının nanopartikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.....120

Çizelge 4.10. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler..... 126

Çizelge 4.11. Üretilen nanopartiküllere ait Zeta Sizer'da elde edilen boy/boy dağılımı ve yüzey yükü..... 133

Çizelge 4.12. Manyetit ve manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerin ESR spektroskopik özellikleri.....138

Çizelge 4.13. Nanopartikül ve DNA-nanopartikül konjugatlarının değişik tamponlardaki davranışlarına ait Zeta Sizer ölçümlerinden alınan sonuçlar.....141

Çizelge 4.14. Partikül/DNA konjugatına ait Zeta Sizer ölçümleri.....145

Çizelge 4.15. Nanopartiküllerin toksisitesi.....150

Çizelge 4.16. HeLa hücrelerine partikül aktarımı ve GFP-pDNA konjugatının GFP ekspresyonu.....155

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DMAPM	Dimetilamino propilmetakrilamid
ESR	Elektron Spin Rezonans
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
g	Spektroskopik yarılma çarpanı
Hr	Rezonans alanı
KPS	Potasyum per sülfat
MMA	Metilmetakrilat
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans Spektrometresi
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG-EEM	polietilenglikol etileter metakrilat
PEG-MA	Polietilenglikol metakrilat
St	Stiren
Tc	Kristalleşme sıcaklığı
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
Tm	Erime sıcaklığı
TMAOH	Tetrametil amonyumhidroksit
V-50	2-2'-Azobis (2-amidinopropan)dihidroklorit
ΔH	Yarı eğri genişliği

1. GİRİŞ

Genetik modifikasyonlarda ve özellikle gen terapisinde hedef hücrelerin gen aktarımı söz konusudur (Cannon ve Anderson, 2000). Genetik bilgi genellikle özel olarak tasarlanmış dairesel plazmid DNA (pDNA) yüklenir. pDNa, yalnızca istenilen proteinin sentezlenmesi için gerekli bilgiyi taşıyan genetik bilgiyi (özel nükleotid dizisini) değil, fonksiyonel olabilmesi için birden fazla genetik bilgi bölgesini taşır. Tasarlanan ve sentezlenen pDNA, uygulama için yeterli miktara çıkmak üzere mikroorganizmalara (*E.Coli*, vb.) aktarılır, mikroorganizma çoğaltılarak miktarı arttırılır ve mikroorganizmadan ayrılarak saflaştırılır. Sonraki adım bu saf pDNA'nın hedef hücrelere aktarılmasıdır. pDNA negatif yüklüdür, kendisi ile aynı yükteki hücre membranını geçemez, bunun için öncelikle hücre içine taşınması gerekir. Taşıyıcının hücre içine alınmasını ve genellikle endozom içine giren pDNA nın buradan kurtulmasını ve degrede olmadan hücre sıvısına girmesini sağlamalıdır. Buradan hücre çekirdeğine giren pDNA'nın tercihen genomik DNA'ya entegre olması ve böylece hücrenin istenilen proteini sentezler duruma getirmesi beklenir. Vücuttaki hedef hücrelere genetik materyalin yollanmasıyla, gen terapi düzgün çalışan gen fonksiyonlarını korumayı, bozuk genlerin fonksiyonlarını baskılamayı yada geliştirmeyi, son olarakta bazı genlerin fizyolojik fonksiyonlarını tamamen değiştirmeyi amaçlamaktadır

Gen taşıyıcı sistemler iki kategoriye ayrılır: (1) viral sistemler ve (2) nonviral sistemler (Lemarchand ve ark., 1992; Harris ve Lemoine, 1996; Miller ve Vile, 1995, Roe ve ark., 1993; Abdallah ve ark., 1995). Genlerin viral vektörler aracılığıyla aktarılmasının en etkin yöntem olduğu ispatlanmıştır. Bununla birlikte, potansiyel toksisite, mutagenez ve karsinogenez viral vektörlerin kullanımını önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Katyonik lipidler, lipozomlar, polipeptidler, yüzey aktif maddeler, katyonik suda çözünen polimerler, vb. nonviral vektörler olarak değerlendirilmiştir (Mc Allister ve ark., 2002). Bunlar içerisinde katyonik polimerler en çok kullanılanlardır. Polikatyonlar pozitif yüklü olup, negatif yüklü pDNA çift sarmalı ile elektrostatik etkileşmeyle birleşir, onu sıkıştırıp kondanse ederek küçük ve pozitif yüklü partiküller oluşmasını sağlarlar. Nonviral vektör-pDNA kondensatları çubuk, küre hatta disk şeklinde olabilir. Bu yapıların boyutları polikatyon türüne, polikatyon/DNA oranına ve esas olarak kondanzesyon kinetiğini

etkileyen çevresel koşullar, pH, iyonik şiddet, sıcaklık, vb. bağlı olarak değişmektedir. Hem kondensat boyu hem de yükü (pozitif) pDNA'nın hücre içine alınmasında, endozomdan emniyetli bir şekilde kurtulmasında önemlidir. Polikatyonların pozitif yükleri nedeniyle hücre geçirgenliğini artırarak yapının hücre içine girişini sağladıkları önemle vurgulanması gereken bir konudur. Ancak fazla pozitif yük hücre membranın bozulmasına neden olduğu için sonuç olarak toksik etki yapacağı da not edilmelidir. Ayrıca endozom içinde polikatyonların protonlanabilme özelliği sayesinde endozomdan plazmid DNA'nın sağlam olarak çıkması ve endonükleazlardan korunması sağlanır (Zuber ve ark., 2001; Luo ve ark., 2000; Blessing ve Ark., 1998; Xu ve ark., 1999; Duguid ve ark., 1998; Truong-Lee ve ark.,1999; Liu ve ark., 2001; Lim ve ark., 2001).

Grubumuzda bir süredir devam eden çalışmalarda suda çözünen akıllı polimerik taşıyıcıların başarılı nonviral vektörler olarak kullanılabilecekleri gösterilmiştir (Dinçer ve ark., 2002, 2005; Türk ve ark., 2004, 2005). Sunulan tez de ise polimerik nanopartiküllerin bu amaçla kullanılıp kullanılamayacakları araştırılmıştır. Bunun için hem fonsiyonel hem de fonksiyonel gruplar taşımayan nanopartiküllerin sentezi amaçlanmıştır. Uygulanan yöntem yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonudur. Daha önceki çalışmalarımızda farklı amaçlar için polimerik nanopartiküllerin üretiminde kullanılmıştır (Arda ve ark., 2001, Özer ve ark, 2000, 2001, David ve ark., 2002, Koçum ve ark., 2000, Güven ve ark., 2004, Babaç ve ark., 2004). Bu tez kapsamında pDNA ile etkileşimin sağlanması için katyonik nanopartiküllerin üretimi amaçlanmıştır. Ana monomer olarak stiren (St) ve metilmetakrilat (MMA), katyonik partikül üretimini sağlamak için komonomer olarak dimetilaminopropil metakrilamid (DMAPM), mikroemülsiyon stabilizasyonunu sağlamak ve partikül yüzeylerine partikülün hücre içine girmesini de sağlayacağı düşünülen polietilenglikol etiletermetakrilat (PEG-EEM), katyonik başlatıcı olarak, 2,2'-azobis(2-metil propionamidin) dihidroklorür (V-50) kullanılmıştır. Yüzeye hidroksil fonksiyonel gruplar kazandırmak amacıyla paralel çalışmalarda PEG-EEM yerine, polietilenglikol metakrilat (PEG-MA) kullanılmıştır. Farklı reçeteler ve koşullar uygulanarak çeşitli nanopartiküller üretilmiştir. Çeşitli parametrelerin esas olarak partikül boy ve boy dağılımına ve yüzey yüküne etkileri araştırılmış ve en küçük boyutlu dar boy dağılımlı (monodispers) ve pozitif yüklü nanopartikül üretimi için reçete ve koşullar optimize edilmiştir. Nanopartiküller

paralel çalışmalarda, ileriki uygulamalarda pDNA saflaştırılmasında da kullanılabilecekleri düşünülerek manyetik olarak yüklenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin önce genomik DNA (gDNA) daha sonra pDNA ile etkileşimleri incelenmiş ve HeLa hücre hatlarının kullanıldığı hücre kültür çalışmalarında transfeksiyon, gen ekspresyonu ve toksisitesi incelenmiştir.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. EMÜLSİYON POLİMERİZASYONU

Günümüzde biyoteknoloji, biyomühendislik ve mikroelektronik alanlarındaki bir çok uygulamada kontrollü boyut ve yüzey özelliklerinden dolayı polimer mikro tanecikleri kullanılmaktadır. Aynı biçimde lateks partikül üretiminde kullanılan polimerizasyon yöntemleri süspansiyon, şişmiş emülsiyon, dispersiyon polimerizasyonları ve bunların modifiye formlarıdır (Tuncel ve Çiçek, 1997). Süspansiyon polimerizasyonu genellikle partikül boyutu 50-1000 μm aralığındaki partiküllerin üretiminde tercih edilen bir yöntemdir. Monomer tanecikleri polimerizasyon sırasında ortamda bulunan stabilizör varlığında ve yağda çözünür başlatıcılar kullanılarak mikron boyutlu partiküllere dönüşür. Geniş boy dağılımı gösteren lateksler elde edilir. Geniş boy dağılımının sebebi ise oluşan topaklaşma ve mekanik homojenizasyonun oluşturduğu kalıtsal boy dağılımıdır. Emülsiyon prosesleri genellikle 0.05-1.5 μm aralığında uniform polimerik partiküllerin üretiminde kullanılan bir yöntemdir. Şişmiş emülsiyon yöntemi Ugelstad tarafından (Ugelstad ve ark., 1980; 1982) 2-100 μm aralığında uniform polimer partikülleri sentezlemek amacıyla geliştirilmiştir. Bu yöntem birkaç şişme basamağından sonra bunu takip eden polimerizasyonlar ile partikül boyutunun artırılması ancak monodispersitenin sabit tutulması esasına dayanır. Dispersiyon polimerizasyonu ise 0.1-10 μm boyutunda uniform partiküllerin üretiminde kullanılan bir yöntemdir.

Tez kapsamında kullanılan polimerizasyon yöntemi emülsiyon polimerizasyonudur. Emülsiyon polimerizasyonu sürekli üretimlerde oldukça elverişli bir yöntemdir. Reaktanların ve oluşan ürünlerin sıvı formda olması pompalardan yada borulardan kolaylıkla taşınabilmesine olanak vermektedir. Emülsiyon ortamının genellikle su olması nedeniyle, pahalı çözücüler kullanılması yada ortamdan çözücünün uzaklaştırılması gibi problemler ortadan direk olarak kalkmıştır. Yüksek polimerizasyon hızlarında yüksek molekül ağırlıklı ürünler elde etmek mümkündür. Boy dağılımını gösteren “coefficient of variation” (cv) genellikle %1 civarındadır. Polimerizasyon sonrası elde edilen lateks filtreleme yada kurutma işlemleri ile katı forma getirilebilir. İdeal bir emülsiyon polimerizasyonu sisteminin ana elementleri suda çözünmeyen monomer, serbest

radikal başlatıcı ve su'dur. Seçilen başlatıcıya bağlı olarak geniş bir sıcaklık aralığında (0-80°C) polimerizasyonlar gerçekleştirilebilir. Polimerizasyon ortamındaki ısı transferi ve karıştırma diğer polimerizasyon yöntemlerine (çözelti yada süspansiyon) göre daha kolaydır.

Yüzey aktif maddenin su içindeki konsantrasyonu krtik seviyeyi geçtiği zaman agregatlar oluşur. Misel olarak adlandırılan bu agregatlar 100 civarında yüzey aktif molekül içerir. Miseller kolloidal boyutlardadır ve genellikle kullanılan yüzey aktif madde konsantrasyonlarında yaklaşık 10^{16}-10^{18} misel/ml aqua faz bulunmaktadır. Yeni önerilen bir mekanizmaya göre suda çözünür serbest başlatıcılardan oluşan birincil radikaller ilk önce su fazı içinde bulunan çözünür monomer molekülleriyle etkileşirler. Daha apolar ve daha düşük molekül ağırlıklı oligomerler oluşur. Bu oligomer radikalleri apolar yapıları nedeniyle monomer ile şişmiş miseller tarafından adsorplanırlar (Fitch ve Tsai, 1971; Namura ve ark., 1975; Chen ve Piirma, 1980).

Oligomerik radikaller miseller içindeki herbir monomer molekülüyle reaksiyona girerek bir ucunda iyon radikali bulunan kısa polimer zincirleri oluşturur. Diğer basamakta miseller içinde polimerizasyon çok hızlı bir şekilde devam eder ve lateks partikülleri büyümeye başlar. Yüzey aktif madde büyüyen lateks partiküllerin yüzeyine adsorplanır. Eğer yüzey aktif madde konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun altına inerse aktive olmayan miseller tamamen ortadan kaybolur. Bu genellikle monomer dönüşümleri %10-20'yi geçtiği zaman olur. Artan monomer dönüşümleriyle birlikte polimerizasyon hızı da artar. Bu aralıktan sonra hiçbir yeni partikül oluşumu olmaz. Daha sonraki basamakta partikül oluşturan miseller içindeki monomer konsantrasyonu, monomer damlacıklarından difüzyon yoluyla gelen monomer nedeniyle sabit kalır. Böylece polimerizasyon hızı da sabit kalır. ~%60 dönüşümde, aqua fazdaki monomer damlacıkları yok olur. Bu noktadan sonra partikül oluşturan miseller içindeki azalan monomer konsantrasyonu nedeniyle polimerizasyon hızı da düşer. Son basamakta polimerizasyon reaksiyonu sonlanır. İyon-monomer serbest radikalleri diğer serbest radikallerle reaksiyona girer. Uniform polimer mikrokürelerin kararlı aqua dispersiyonları elde edilir.

Monomer/su mikroemülsiyonları sahip oldukları özelliklere göre makroemülsiyon, miniemülsiyon ve mikroemülsiyon olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Adlarından da anlaşıldığı gibi bu üç grup emülsiyon arasındaki temel fark sistem içerisinde yer alan damlacıkların (dağıtma ortamında monomer damlacıkları) büyüklüğüdür. İkinci önemli fark ise bu emülsiyonların kararlığıdır. Burada "kararlılık" emülsiyonun fark edilir bir bozulmaya uğramasına kadar geçen süreyi tanımlamaktadır. Emülsiyonun bozulması ile orijinal emülsiyondaki damlacıkların büyüklüğü artmaktadır.

Makroemülsiyon diğerlerine göre daha büyük monomer damlacıklarına (1-100 μm) sahiptir ve bu damlacıkların kararlılığı dakikalarla sınırlıdır. Eğer emülsiyon sistemi iyi karıştırılmıyorsa faz ayrımı çok hızlı olur. Damlacık boyutu sistem bileşenleri (monomer, stabilizör, monomer/su faz oranı) ile karıştırma özelliklerine (karıştırma hızı, karıştırıcı türü) bağlıdır. Diğer yandan mikroemülsiyonlar, 10 ile 100 nm arasında değişen damlacık boyutu ile termodinamik olarak kararlı bir yapıya sahiptir. Bu emülsiyon türünü hazırlayabilmek için bağıl olarak daha fazla miktarda emülsiyon yapıcı madde karışımı kullanılır. Bu karışım genelde, iyonik emülsiyon yapıcı madde (sodyum dodesil sülfat, SDS) ve kısa zincirli alkollerden (pentanol) hazırlanır.

Miniemülsiyonlar damlacık boyutu ve emülsiyon kararlılığı bakımından makroemülsiyonlar ve mikroemülsiyonlar arasında yer alır. 50-500 nm arasında değişen damlacık boyutuna sahip olan miniemülsiyonların kararlılığı günler kadar kısa olabileceği gibi aylar kadar uzun da olabilir. Bu damlacıklar genellikle iyonik emülsiyon yapıcı madde (SDS) ile yardımcı emülsiyon yapıcı maddenin bileşimi ile elde edilir. Yardımcı emülsiyon yapıcı madde olarak son yıllarda genellikle uzun zincirli alkan (hekzan) veya alkol (hekzadekanol) kullanılmaktadır. Yardımcı emülsiyon yapıcı madde miniemülsiyon polimerizasyonunda iki görev üstlenir. Bunlardan ilki; emülsiyon yapıcı madde ile birleşip monomer-su ara yüzeyini düzenleyerek damlacık yüzeyinde damlacıkların birbirleriyle birleşmelerini engelleyen bir barikat oluşturmak, ikincisi; düşük su çözünürlüğüne sahip olması nedeniyle, değişik boyut ve bileşimdeki damlacıklar arasında denge kurarak, küçük damlacıklardan büyük damlacıklara monomer transferini önlemektedir.

2.1.1. Mikroemülsiyon Polimerizasyonu

Mikroemülsiyon polimerizasyonunda genellikle 50 nm den daha küçük partiküller ("nanopartiküller") içeren lateksler elde edilir. Bu yöntemde hızlı polimerizasyon reaksiyonlarıyla yüksek molekül ağırlıklarına (birkaç milyon mertebesinde) ulaşılır. Partikül boyu nedeniyle mikroemülsiyon lateksleri, emülsiyon ve miniemülsiyonun tersine şeffaf ve uçuk mavimsi renktedir. Bu latekslerin kontrollü çapraz bağlama yöntemleri ile gözenekli katılara da dönüştürülmesi mümkündür (Candau, 1987; 1992).

Mikroemülsiyon lateksleri termodinamikçe kararlı, optik olarak geçirgen dispersiyonlardır ve polimerik partiküller, dağıtma ortamı (örneğin su) ve yüzey aktif maddeler içerirler. Elde edilen kararlılık, çok düşük arayüzey geriliminden kaynaklanır. Çoğu kez, düşük ara yüzey gerilimini sağlamak için bir yardımcı yüzey aktif madde (örneğin alkoller) eklenmesi gerekir. Bu husus aslında mikroemülsiyonun dezavantajı olarak kabul edilir. Burada, emülsiyona göre çok daha fazla yüzey aktif madde kullanılır ki bu da ara yüzeyin kirlenmesine yol açar.
Mikroemülsiyon polimerizasyonunda genelde suda çözünmeyen veya az çözünen monomerler su ortamında dağıtılır. Suda çözünen monomerler için bunun tersi yani monomerin bir apolar organik fazda dağıtılması söz konusudur. Burada yüzey aktif maddenin türü ve miktarı önemlidir. Monomer türüne göre çeşitli yüzey aktif maddeler karıştırılarak, termodinamik olarak kararlı mikroemülsiyonlar kolaylıkla oluşturmak ve bunlara uygun başlatıcılar (suda veya organik fazda, monomerde çözünen) kullanılarak nanopartikül lateksleri üretmek mümkündür (Friberg ve Bothorel,1986).

2.1.1.1. Monomer/ Su Mikroemülsiyonları

İlk olarak monomer/su mikroemülsiyonuyla metil metakrilat (MMA) ve metil akrilatı MA) polimerleştirmek 1980 yılında denenmiştir (Stoffer ve Bone, 1980). Fakat polimerizasyon sırasında faz ayrımı nedeniyle başarı sağlanamamıştır. Daha sonra çok az miktarda stireni (%1.9), %1.9 setilmetil amonyum bromür (CTAB) ve yaklaşık %1 hekzanol ile stabilize etmişler ve monomer /su mikroemülsiyonu ile polimerleştirme gerçekleştirilmiştir (Atik ve Thomas, 1981). Düşük stiren içeriği daha sonra, ağırlıkça %6-10 sodyum dodesil sülfat (SDS) ve çok az miktarda 1-

pentanol kullanılarak ağırlıkça %3-6'ya çıkarılmıştır. Ayrıca stiren ve/veya MMA mikroemülsiyon polimerizasyonu, UV laser başlatıcı, foto-redoks polimerizasyonu ve Raman spektroskopisi kullanılarak incelenmiştir (Holderoff, 1990; Feng ve ark., 1990).

Bu sistemlerde kararlı polistiren (PS) mikrolateksler üretmek için yüzey aktif stiren içerikli monomer/su mikroemülsiyonlarda faz ayrımı veya polimerin çökmesi görülmüştür. Sonuç lateksin kararlılığı, polimer ve yardımcı yüzey aktif madde uyuşmazlığı olarak yorumlanmıştır (Gan ve ark., 1983). Mikroemülsiyon reçetelerinde yardımcı yüzey aktif madde olarak kullanılan alkoller polimeri çözmezken, monomer için çözücü oldukları not edilmelidir.

Monomer/su mikroemülsiyon polimerizasyonunu yardımcı yüzey aktif madde kullanılmayan sistemde çalışmak daha az karışıktır. Son yıllarda çalışılan birçok MMA veya stiren mikroemülsiyonlarında dodesiltrimetilamonyum bromür (DTAB) (Perez-Luna ve ark., 1990; Rodriguez-Guadarrama ve ark., 1993), setilmetilamonyum bromür (CTAB) (Gan ve ark., 1993; Antonietti ve ark., 1991), setiltrimetilamonyum klorür (STAC) ve oksidesiltrimetilamonyum klorür (OTAC) gibi katyonik yüzey aktif maddeler kullanılmıştır.

2.1.1.2 Su/Monomer Mikroemülsiyonları

Akrilamid (AM), akrilik asit (AAc), 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) ve üreformaldehit (UF) gibi suda çözünür monomerler, su/monomer mikroemülsiyonlarında polimerleştirilebilir. Bu suda-çözünür monomerler, su/monomer mikroemülsiyonun misel çözünürlük kapasitesini artırarak yardımcı yüzey aktif madde rolü oynarlar. Bu tür mikroemülsiyonlarda sürekli faz organik bir çözeltidir ve yüzey aktif maddeler de bu organik çözeltide çözünür ve misel yapısını bu çözeltide oluştururlar.

Bu mikroemülsiyonlar, genellikle çift zincirli iyonik olmayan yüzey aktif madde AOT ile stabilize edilirler. Su/monomer mikroemülsiyonlarında en çok araştırılan monomer akrilamid (AAm)'tir. Çünkü homopolimeri geniş uyguluma alanına sahiptir (Thomas ve ark., 1985). AOT ters mikroemülsiyonları, şeffaftır ve mavimsi mikrolateksler oluşturmak için yüksek yüzey aktif madde /monomer (>2.5) oranı gerektirir. Eğer AOT miktarı oldukça düşük ise, şeffaf mikroemülsiyonlar

polimerizasyon sırasında bulanık lateksler haline gelir. AIBN ile başlatılmış AOT/su/AM/toluen sisteminde, her bir lateks partikül (d: 40 nm) milyon mertebesine varan yüksek molekül ağırlıklı tek polimer zinciri içerir. Bu yüksek molekül ağırlığı, AOT-AAm sisteminde sürekli partikül çekirdeklenmesine bağlanmaktadır (Candau,1985).

Su/monomer mikroemülsiyonlar, polimerleşebilen yüzey aktif maddeler (SAAS veya PUD) yardımcı yüzey aktif madde (AAm veya HEMA) ve yağ (MMA sürekli faz içinde) olarak formülize edilebilir. %10-20 ağırlıkça su içeriğiyle, bu tür su/monomer mikroemülsiyonları ile, mikroporöz yapıda, şeffaf polimerik malzemeler hazırlanır. İlave olarak, bu sistemlerde, mikroemülsiyonların kararlılığını sağlamak için çapraz bağlayıcılar (EGDMA gibi) kullanılabilir.

2.1.1.3. Arayüzey Mikroemülsiyonları

Arayüzey mikroemülsiyonları için, organik ve su fazları birbirleriyle iç içedir ve yüzey aktif madde moleküllerinin çoğu monomer-su arayüzeyinde toplanmıştır. Bu polimerizasyon yöntemiyle, yüksek miktarlarda suda ve organik fazda çözünen monomerler kopolimerleştirilebilir.

İyonik olmayan arayüzey mikroemülsiyonlarının optimum formülasyonu, optimum HLB değerinde iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin karışımıyla başarılır. Örneğin; AM veya AM-sodyum akrilat, kararlı lateksler oluşturmak amacıyla (%14-25 ağırlıkça), ara faz mikroemülsiyonu ile kopolimerleştirilebilir (Holtzscherer ve ark., 1988; Candau, 1987). Ayrıca suda çözünen AM, arayüzey akışkanlığını sağlamak üzere yardımcı yüzey aktif maddeyi organik faza transfer ederek, yüzey aktif maddenin suda çözünürlüğünü azaltabilir. Böylece, arayüzey mikroemülsiyon oluşmasını sağlar.

Polimerleşen organik faz içeren arayüzey mikroemülsiyonu için (örneğin; stiren veya MMA), polimerizasyon sonucunda poröz katı malzemeler elde edilebilir (Palani ve ark.,1993; Gan ve ark., 1996). Bazı arayüzey mikroemülsiyonlarına uygun polimerleşebilen yüzey aktif madde ve/veya yardımcı yüzey aktif madde katılımı ile, su dışında tüm bileşenlerin polimerizasyonuyla polimerik yapılar elde edilmiştir (Gan ve ark., 1996).

En çok kullanılan, polimerleşebilen yüzey aktif maddeler AAc ve HEMA'dır. Çalışılan bazı polimerleşebilen yüzey aktif maddeler, PUD, SAAS, akrilamidoundekanoat, sodyum11-(N-etilakrilamido)undekanoat (SEAAU) ve metakriloyloksundesil bütilmetilamonyum bromür (MBDB)' dir. PUD dışında bu yüzey aktif maddeler oldukça reaktiftir ve kolaylıkla yüksek molekül ağırlıklarına ulaşılabilir (Paleos ve ark., 1983).

Polimerleşebilen yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde dışında, polimerik poröz yapıyı uzatmak için arayüzey mikroemülsiyonu reçetesine etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcı olarak katılabilir. Bu tür arafaz mikroemülsiyonlarının polimerizasyon sonrası şeffaf katı polimerik yapılar oluşturdukları not edilmelidir.

2.1.2. Mikroemülsiyon Polimerizasyonunun Mekanizması ve Kinetiği

Emülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyon prosesleriyle sulu fazda dispersiyonla hızlı reaksiyon hızları ve yüksek molekül ağırlıklarına (10^5-10^6) ulaşmasına karşın, kinetik bazı yönlerden farklıdır.

Klasik emülsiyon polimerizasyonlarında, reaksiyon süresince 3 hız aralığı gözlenebilir. I. Aralıkta partiküller oluşur ve reaksiyona giren partiküllerin sayısı arttıkça, polimerizasyon hızı zamanla artar. Bu aralığın sonlanması misellerin yokolmasından ve büyüyen partiküllerin yüzeylerine yüzey aktif maddelerin adsorplanması sonucudur. Bu olay, %2-15 dönüşümleri arasında gerçekleşir.

II.aralık'da (gelişme basamağı), reaksiyon monomerce şişmiş polimerik partiküllerin içinde devam ederken, sulu fazdan monomer difüzyonuyla monomer konsantrasyonu polimerik partiküllerin içinde doygunluk değerine ulaşır. Sulu fazda monomer konsantrasyonu emilsifiye edilmiş damlacıklar tarafından dengelenir. Bu aralıkta, reaksiyon hızı çoğunlukla sabit kalır veya jel etkisinden dolayı çok hafifçe artar (Odian, 1981). Gelişme aralığı, tüm emülsifiye edilmiş monomer damlacıklarının tüketildiğinde sonlanır. III.Aralıkta'da (sonlanma basamağı), reaksiyon hızı düşer, çünkü reaksiyon, oluşan partiküllerde kalan monomerin tümü tüketilinceye kadar veya monomer-polimer karışımının camsı geçiş sıcaklığı (Tg), reaksiyon sıcaklığına eşit oluncaya kadar düşer.

Mikroemülsiyon polimerizasyonunda, yalnızca iki hız aralığı gözlenir (Guo ve ark., 1989; Gan ve ark., 1992; Full ve ark., 1992; Puig ve ark., 1993; Rodriguez-Guadarrama ve ark., 1993); çekirdeklenme ve büyüme. Bu iki aralık, polimerizasyon hızının (Rp) %15-25'e kadar dönüşüme artışı ve konsantrasyonunun büyüyen polimer partiküllerinde tüketilmesiyle azalmayı tanımlamaktadır. Bu olay, I.aralıkta partikül çekirdeklenmesi ve II.Aralıkta büyüme basamağı olarak isimlendirilir. I.Aralıkta polimerizasyon hızı zamanla artar, çünkü çoğalan birimlerin sayısı artar. Bu aralıkta, aktive edilmemiş damlacıkların monomerin difüzyonla transferi sayesinde, büyüyen partiküller içinde monomer konsantrasyonu sabit kalır. Bu çekirdeklenme basamağı, bütün mikroemülsiyon damlacıklarının polimerik partikül haline gelmesiyle veya monomerlerin monomerce şişmiş reaksiyon oluşturan partiküller içine difüzyonu ile sonlanır. Aktive edilmemiş damlacık bittiğinde, reaksiyon hızı doğrudan azalır. Klasik emülsiyon polimerizasyonunun tersine, mikroemülsiyon polimerizasyonunda sabit hız aralığı veya jel etkisi görülmez (Odian, 1981).

Bazı diğer araştırmacılarda sürekli faz çekirdeklenmesi mekanizması ile ilgilenmişlerdir (Gao ve ark., 1991; Bleger ve ark., 1994). Emülsiyon polimerizasyonunda, partikül oluşmasının misellerin sonlanması ile bittiğine inanılır. Oldukça fazla yüzey aktif madde konsantrasyonu nedeniyle mikroemülsiyon polimerizasyonunda, polimerizasyon sırasında partikül oluşumu devam eder. Guo ve arkadaşları hipotezlerini desteklemek için dönüşüm ile lateks içinde partikül sayısının arttığını göstermişlerdir. II. Aralık'da reaksiyonun ilk basamaklarında polimerizasyon hızının düşmesi, mikroemülsiyon damlacıklarında monomer korlarının polimerizasyon sırasında erken sonlanmasına bağlanmıştır. Polimer partiküllerinin yüksek monomer/polimer şişme oranından dolayı, polimerizasyon sırasında monomerlerin çoğu polimer partiküllerinin (I.Aralık'da üretilen) içinde bulunmaktadır.

Gerçek mekanizmanın oluşması böylece, suda çözünmez (stiren, bütil metakrilat) ve suda çok az çözünür (MMA, tetrahidrofurfuril metakrilat) için monomer/su mikroemülsiyon polimerizasyonunda gözlenen Aralık II genel bir kabul görmüştür (Perez-Luna ve ark., 1990; Gan ve ark., 1991, 1992, 1993; Full ve ark., 1992; Puig ve ark., 1993; Rodriguez-Guadarrama ve ark., 1993)

2.1.2.1.Monomer Konsantrasyonunun Etkisi

Emülsiyon polimerizasyonunda, monomerin çoğu emülsifiye edilmiş damlacık içindedir ve yalnızca monomer kaynağı olarak rol oynarlar. Bundan dolayı, başlangıç monomer konsantrasyonu düşüktür veya reaksiyon hızına etkisi yoktur. Mikroemülsiyon polimerizasyonunda, reaksiyon hızı ve dönüşüm, monomer konsantrasyonu arttıkça artar. Polimerizasyon hızındaki artış, monomer konsantrasyonunun artmasıyla mikroemülsiyon damlacık boyutlarının artmasından kaynaklanır. Polimerleşen mikroemülsiyon lateksler iki yıl kararlı kalabilirler. Lateksler düşük monomer içeriğinde mavimsi ve şeffaftırlar; fakat monomer konsantrasyonu arttıkça bulanıklıkları ve boyları artar. Yüksek monomer konsantrasyonunda ışığı geçirmez hale gelirler.

Sonuç lateksin, partikül boyutu ve molekül ağırlığı da başlangıç monomer konsantrasyonuna bağlı olduğu ve partikül boyutu mikroemülsiyon içindeki monomer konsantrasyonu ile arttığı gösterilmiştir.

2.1.2.2. Başlatıcı Etkisi

Mikroemülsiyon sistemlerinde polimerizasyon hızı başlatıcı tipi ve konsantrasyonuna ve yüzey aktif maddeye bağlıdır. Başlatıcı konsantrasyonu arttıkça, polimerizasyon hızı ve toplam dönüşüm artar. Bunun nedeni, serbest radikallerin şişmiş miseller içine olan akısının artmasıdır.

Guo ve arkadaşları suda çözünür ve monomerde çözünür başlatıcılar kullanarak stirenin SDS ve yardımcı emülsiyon yapıcı madde olarak pentanol kullanarak mikroemülsiyon polimerizasyonunu incelemişlerdir. Reaksiyon hızı ve toplam dönüşüm KPS ile AMBN'den daha yüksektir. Her iki başlatıcıyla da 20-30 nm boyutlarında kararlı, mavimsi lateksler elde etmişlerdir. En yüksek polimerizasyon hızı, KPS'nin 0.47, AMBN'nin 0.39 kuvvetiyle değişmektedir. Molekül ağırlıkları oldukça yüksek bulunmuştur ve sırasıyla KPS ve AMBN'nin -0.07 ve -0.55 kuvvetiyle değişmiştir. Ayrıca KPS ile AMBN'den daha uzun çekirdeklenme periyodu (aralık I) bulmuşlardır (Guo ve ark., 1989).

Gan ve arkadaşları bütil karbitolün yardımcı emülsiyon yapıcı madde olarak kullanıldığı SDS veya CTAB mikroemülsiyonlarını KPS ve AIBN ile başlatmışlardır.

Polimerizasyon hızının KPS'nin 0.47 kuvvetiyle, AIBN' nin 0.39 kuvvetiyle değiştiğini ve KPS ile uzun çekirdeklenme periyodunu yayınlamışlardır. Ayrıca SDS ile CTAB mikroemülsiyonlarından daha hızlı polimerizasyon olduğuna işaret etmişlerdir (Gan ve ark., 1992).

Benzer sonuçlar diğer mikroemülsiyon sistemlerinde de görülmüştür ve elektrostatik etkiye bağlanmıştır. Serbest negatif yüklü KPS radikalleri ile bromür iyonları etkileşmesinden dolayı yüzeydeki etkileşim önemlidir. SDS kullanıldığında, serbest KPS radikalleri damlacık tarafından itilir ve bu radikaller sulu faz içinde çözünmüş monomer moleküllerini etkili bir şekilde oligomerleştirir. Diğer taraftan, CTAB veya DTAB ile, damlacık serbest radikalleri kendisine çeker ve yüzeyde bir tabaka oluşturarak radikallerin polimerizasyonu başlatma etkinliğini azaltırlar. Bu elektrostatik etki, MMA mikroemülsiyon polimerizasyonunda DTAB veya AOT olarak yüzey aktif madde kullanıldığında, Rodriquez-Guadarrama tarafından da gözlemlenmiştir. DTAB kullanıldığında, KPS, AIBN veya V-50 başlatıcısı, pozitif yüklü serbest radikalleri oluşturur. AOT (negatif yüklü mikroemülsiyon damlacıkları oluşturur) ile KPS, V-50'den daha yüksek reaksiyon hızı ve dönüşüm gösterir.

Diğer bir etki de, CTAB veya DTAB'in bromür iyonları ve SO_4^{2-} serbest radikalleri arasındaki zincir transfer reaksiyonlarından kaynaklanır. Bu reaksiyonda, bromür iyonları SO_4^{2-} serbest iyonlarını yakalar ve reaksiyonu yavaşlatır.

2.1.2.3. Sıcaklığın Etkisi

Mikroemülsiyon polimerizasyonu hızına sıcaklığın etkisi, suda çözünen veya monomerde çözünen başlatıcılarla stiren ve MMA için çalışılmıştır (Guo ve ark., 1989; Gan ve ark.,1992). Toplam dönüşüm de sıcaklığın armasıyla artar. Bunun nedeni sıcaklıkla makromoleküllerin hareketi, özellikle reaksiyon veren damlacıklardaki polimer monomer karışımının camsı geçiş sıcaklığı üzerinde reaksiyon sıcaklığı ile artmasıdır. AIBN ile başlatılmış stirenin CTAB veya SDS mikroemülsiyon polimerizasyonunda Arrhenius eğrilerinden aktivasyon enerjileri sırasıyla 49 ve 54 kJ/mol, KPS ile 92 ve 88 kJ/mol olarak bulunmuştur. MMA'nın mikroemülsiyon polimerizasyonu için, KPS ve AIBN için aktivasyon enerjileri sırasıyla 56 ve 43 kJ/mol olarak bulunmuştur. Bu değerler AIBN ile MMA'nın yığın polimerizasyonu için belirtilen değerden (83.7 kJ/mol) küçüktür. Sonuçta elde

edilen latesler sıcaklığa (ve başlatıcı konsantrasyonuna) bağlı olarak mavimsi-şeffaflıktan opak görünüme gider. Çok düşük reaksiyon sıcaklıklarından dolayı oldukça opak örnekler sentezlenmiştir.

2.1.2.4. Elektrolit Etkisi

Emülsiyon polimerizasyonunda inorganik elektrolitlerin etkisi karmaşıktır ve elektrolit konsantrasyonuna, doğasına ve türüne bağımlıdır. Genellikle, elektrolitler sulu çözeltinin iyonik gücünü (veya pH'sını ayarlamak için) artırmak için eklenir ve bunun sonucunda ortalama partikül boyutu ve boyut dağılımı artar. Ayrıca elektrolit eklenmesi reaksiyon sırasında emülsiyonun kararlılığını bozar. Elektrolit eklenmesinin mikroemülsiyon polimerizasyonu kinetiği üzerinde etkisi son zamanlarda çalışılmıştır. Elektrolit eklenmesi su/monomer/yüzey aktif madde sistemlerinin faz davranışını önemli ölçüde etkiler. Genellikle tuzlar su ve yüzey aktif madde arasında çözünürlüğü azaltır, tek faz mikroemülsiyon bölgelerini daraltır ve sıvı kristalin faz oluşmasını engeller. Çekirdeklenmiş emülsiyon polimerizasyonu için serbest radikallerin polimer partikülleri içine girişlerininsulu fazda monomer konsantrasyonuna bağımlı olduğunu kanıtlanmıştır. Böylece mikroemülsiyon polimerizasyonunda tuz ilavesiyle reaksiyon hızının azalması, elektrolit eklenmesi sonucu monomer çözünürlüğünün düşmesi ve böylece serbest Radikallerin polimerik partiküllere giriş hızının azalması olarak açıklanabilir. Bu etki gözlenen polimerizasyon hızında önemli bir azalış yaratır. Polimerizasyon hızının düşmesinin diğer bir açıklaması da, miseller (pozitif yüklü) ile serbest radikaller (negatif yüklü) arasındaki elektrostatik etkileşmedir. Çünkü polimerizasyonun azalış hızı, şişmiş miseller üzerindeki görünür pozitif yükteki azalış ile paraleldir. Negatif yüklü radikallerin giriş hızı, mikroemülsiyon yüzey potansiyelinin düşmesiyle biraz azaltılabilir. Ancak polimerizasyon hızı, pozitif yüklü serbest radikaller üreten suda çözünür başlatıcı (V-50) ile de tuz konsantrasyonu artıkça azalır. Burada elektrostatik etkiler çok önemli değildir.

2.1.2.5. Kullanılan Yüzey Aktif Maddeler

Literatürde tanımlanan mikroemülsiyonların büyük bölümü kırılgan SDS/pentanol veya katyonik DTAB veya CTAB sistemleri üzerinedir. Aşağıdaki özelliklere sahip,

mikroemülsiyon yapabilecek yeni yüzey aktif maddeleri bulma çabaları devam etmektedir.

- Daha küçük lateksler sentezini gerçekleştirecek ,
- Ara yüzeyleri stabilize etmek için daha etkili çalışılacak,
- Toksik olmayacak ve biyobozunur olacak,
- İstenen fonksiyonel grupları olan monomerlerin mikroemülsiyonunu gerçekleştirecek.

Mikroemülsiyon polimerizasyonunda suda çözünür monomerler için genellikle sodyum bis(etil hekzil) sülfosüksinat (AOT) kullanılmıştır. Kaler, Texter ve ark. KPS başlatıcı kullanarak tetrahidrofurfuril metakrilatın mikroemülsiyonunu AOT ile gerçekleştirmişlerdir. Ancak elde edilen polimerik lateksler oldukça geniş boy dağılımına sahip oldukları gözlenmiştir (Kaler ve ark., 1992).

Diğer ilginç bir olasılık da, farklı yüzey aktif maddelerin karıştırılmasıyla hazırlanan mikroemülsiyonlardır. Literatürde yapılan çalışmalarda stiren/su mikroemülsiyonunu oluşturmak için SDS ile birlikte %20 karşıt yüklü CTAB eklenmiştir (Antonitte ve ark., 1995). Yüksek yüzey etkinliği sağlayan benzer bir yüzey aktif madde sınıfı, hidrofilik ve hidrofobik gruplar taşıyan amfilik monomerlerin oligomerleridir. Alkil- poli(etilen oksitler) veya benzentonyum klorür ile çalışmalar yapılmıştır. Benzentonyum klorür, düşük yüzey aktif madde konsantrasyonunda küçük boyutlu mikroemülsiyonları çok etkili bir şekilde kararlı halde tutar fakat çok küçük boyutlu polimerik lateksler için uygun değildir.Bunun dışında, benzer stabilizör etkinliği, büyük miktarlarda polar uç gruplar taşıyan yüzey aktif madde moleküllerinin küçük mikrodamlacık oluşturma yeteneğinden kaynaklanabilir. Bu amaçla, CTAB sistemi, yüzey aktif maddenin polar tarafına iki etilen oksit grubu sokulmasıyla modifiye edilmiştir. C16-türevli grubun çözünürlük limitinden dolayı, tetradesildietanolaminin (TDEA) pozitif yüklü üç türevinin davranışı incelenmiştir. Bu türevlerin tamamı su içinde stirenin mikroemülsiyonunu oluşturmuşlardır.

2.1.3. Yüzey Aktif Madde İçermeyen Emülsiyon Polimerizasyonu

Yüzey aktif madde kullanmadan yapılan emülsiyon polimerizasyonudur (Goodwin ve ark., 1978; Sang ve Poehlein, 1989). Partiküller sürekli fazda büyüyen

makroradikallerin çökmesiyle oluşur. Başlangıçta oluşan çekirdek diğerleriyle çarpışarak daha büyük partiküller oluşturur. Eğer peroksidik başlatıcılar kullanıldıysa, çöken polimer zincirleri kovalent olarak bağlanmış negatif yüklü sülfat grupları içerir. Oluşan partiküller kendi negatif yükleri tarafından stabilize edilirler.

Bir başka kinetik modele göre, büyüyen makroradikaller sahip oldukları başlatıcıdan gelen hidrofilik uç grubu ve hidrofobik zincirler nedeniyle polimerizasyonun başlangıç basamaklarında misel yapısı oluşturabilirler (Goodwin ve ark., 1973). Daha sonra klasik emülsiyon polimerizasyonu mekanizmasında olduğu gibi polimerizasyon misel yapısı içinde devam etmektedir. Oluşan çekirdek sayısı daha az olmakla birlikte, oluşan partikül boyutları konvansiyonel emülsiyon yöntemiyle elde edilenlerden daha büyüktür. Ortalama partikül boyutu 0.5-1.5 μm aralığındadır. Bununla birlikte, düşük sayıda partikül oluştuğu için polimerizasyon hızları aynı şartlarda yapılan konvansiyonel emülsiyon polimerizasyonuna göre daha yavaştır.

Polimerizasyon sıcaklığının ve başlatıcı konsantrasyonunun artmasıyla oluşan partikül sayısı ve polimerizasyon hızı artar, fakat ortalama partikül boyutu azalır. Fakat başlatıcı konsantrasyonunun artmasıyla, ortalama boyutun artmasını da ilgilendiren sürekli fazın iyonik gücü artmaktadır. Başlangıç monomer/su oranı polimerizasyon hızı partikül oluşturma basamağına gelene kadar etkin bir parametre değildir. Fakat son partikül boyutunu kontrol eden oldukça önemli bir parametredir. Çünkü oluşan partiküllere monomer absorpsiyonu sürekli fazın içinde bulunan monomer miktarı ile orantılıdır.

Son zamanlarda, Smigol ve ark. yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonunu stiren, metil metakrilat ve glisidil metakrilat'ı da içeren değişik monomerler için kapsamlı olarak çalışmışlardır. Bu çalışmada potasyum peroksidisülfat başlatıcı olarak kullanılmıştır (Smigol ve ark., 1992). Artan iyonik şiddet ve monomer/su oranı ile ortalama partikül boyunun arttığı ve artan polimerizasyon sıcaklığı ile partikül boyunun azaldığı gösterilmiştir.

Mikron altı boyutlarda tek boyutlu kopolimer partikülleri hazırlamak için yüzey aktif madde içermeyen çekirdekli emülsiyon polimerizasyonu alternatif bir yöntem

olarak önerilmiştir (Suzawa ve ark., 1982; Shirama ve ark., 1984). Bu proseste, toplam monomer-komonomer karışımının küçük bir miktarı su fazına eklenmiştir. Bundaki amaç konvansiyonel direk yönteme kıyasla düşük monomer/su fazı oranında kopolimerizasyonu başlatmak ve koagülasyon ve monodispesite eksikliklerini önlemektir. Monomer-komonomer karışımındaki fonksiyonel komonomer miktarı molce %10'un altında tutulmaktadır. Başlatıcıyı da içeren su fazı, başlangıç monomer karışımı eklenmeden önce ve sonra polimerizasyon sıcaklığında sabit tutulmaktadır. Çekirdeklenme kopolimer makromoleküllerinin çökmesiyle başlar ve önce oluşan kopolimer çekirdekleri çarpışarak daha büyük partiküller oluşturur. Düşük başlangıç organik faz/su oranında partikül oluştuktan sonra sürekli fazın içinde oligomer oluşur. Polimerizasyon ortamında yüksek organik faz/ su oranında ve yüksek komonomer konsantrasyonlarında, büyüyen oligomer konsantrasyonu ve oligomer zincirlerinin büyüme hızları artar ve ikinci çekirdeklenmeler son üründe polidispersiteye neden olur. Monomer- komonomer karışımının geri kalanı çekirdeklenme basamağından sonra uzun bir zaman aralığında reaktöre beslenir. Bu süre boyunca reaktör polimerizasyon sıcaklığında sabit tutulur. Monomer karışımının yavaş yavaş eklenmesi, çekirdek partikülleri aracılığıyla monomer ve komonomerlerin sulu fazdan tamamen absorplanmasını sağlar. Böylece kopolimerizasyon reaksiyonu her bir tek boyutlu tanecik üzerinde gelişir, yeni tanecik üretilmez. Başlatıcı ile stabilize olan daha büyük mikroküre oluşumları aynı zamanda bu prosesteki koagülasyon oluşma riskini azaltır.

Yüzey aktif madde içermeyen çekirdekli emülsiyon polimerizasyonu stirenin polar ve fonksiyonel monomerlerle kopolimerizasyonuyla hazırlanan tek boyutlu mikroküre üretiminde kullanılır. Burada polistiren-polimetakrilik asit (PS/PMMAc), polistiren-polimetilmetakrilat-polimetakrilikasir (PS/PMMA/PMAAc), polistiren-polihidroksietilmetakrilat (PS/PHEMA) ve polistiren- poliakrilik asit (PS/PAAc) tek boyutlu mikroküreleri çok-basamaklı yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir (Suzawa ve ark., 1982; Shirama ve ark., 1984).

Elaissari ve ark, küresel formda ve dar boy dağılımında lateksleri yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon yöntemiyle sentezlemiştir (Elaissari ve ark., 1993). Pozitif ve negatif yük taşıyan bu partiküller oligonükleotid adsorpsiyonu için

incelenmiştir. Adsorpsiyonda elektrostatik kuvvetlerin rol oynadığı gösterilmiştir. Ganachaud ve ark. stireni amino-içeren iki farklı katyonik monomerle, aminoetil metakrilat hidroklorür (AEMH) ve vinil benzil amin hidroklorür (VBAH), katyonik başlatıcı 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorür (V-50) varlığında yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile kopolimerleştirmiştir. Katyonik hidrofobik (polistiren) lateks sentezi, partikül oluşumu veya büyümesi sırasında iyonik monomerin eklenmesiyle çoğunlukla dış kabukta küçük yığınlar halinde polimer zincirlerinin oluşmasıyla sonlanmıştır. Dış yüzeyde yer alan bu iyonik grupların varlığı yüzey yükünün ölçülmesiyle gösterilmiştir. Daha sonra kullanılan iyonik monomere göre elde edilen katyonik latekslerin kolloidal ve yüzey özellikleri kinetik çalışma ile gösterilmiştir (Ganachaud ve ark., 1997; Sauddze, 1997). Xu ve ark. yaptıkları çalışmada yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile stiren ve bütil akrilat kopolimerizasyonunu katyonik fonksiyonel komonomer (*N*-dimetil, *N*-bütil, *N*-etil metakrilat amonyum bromin (DBMA) varlığında başlatıcı olarak azobis(izobütil amidin hidroklorür) (AIBA) ile gerçekleştirmiştir (Xu ve ark., 1997). Partiküllerin yüzey özellikleri ve yükleri incelenmiştir. Farklı monomer besleme metodları ile elde edilen partiküllerin partikül boyları, mikromorfolojileri ve farklı yöntemlerle hazırlanan emülsiyon partiküllerinin özellikleri incelenmiştir. Tek boyutlu ve dar boy dağılımlı partiküller elde edilmiştir. Kullanılan yönteme göre partikül boyu, sayısı ve emülsiyon özelliklerinin değiştiği gözlenmiştir. Fritz ve ark, yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu kullanarak suda çözünür başlatıcı varlığında, 150-200 nm boyutlarında pozitif yük taşıyan monodispers polistiren partiküller sentezlemiştir (Fritz ve ark., 1997). Daha sonra bu partiküller "antisense oligonucleotides" için ilaç taşıyıcı sistemlerde model olarak kullanılmıştır. Tuncel, kısa zincir uzunluğundaki poli(etilen glikol) etil eter metakrilat (PEG-EEM) ile stiren-su emülsiyonun kararlılığını arttırmaya çalışmıştır (Tuncel, 2000). Emülsiyon polimerizasyonu sonucu 0.4-1.2 μm boyutlu dar boy dağılımlı partiküller elde edilmiştir. PEG-EEM miktarının artmasıyla boy dağılımının daha da azaldığı ve reaksiyon veriminin arttığı rapor edilmiştir.

Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonlarınn çoğu su ortamında gerçekleşmektedir, fakat bazı araştırmacıların su-metanol ortamında reaksiyonları gerçekleştirdiği rapor edilmiştir (Lappainen ve ark., 1994; Chavany ve ark., 1992; Zobel ve ark., 1997). Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonunda

partikül çekirdeklenmesinin sürekli fazda gerçekleştiği ve monomer katılımı, partikül kararlılığı gibi bazı parametrelerin dağıtma ortamının özelliğine bağlı olduğu bilinmektedir. Yani dağıtma ortamının kompozisyonunun değişmesiyle partikül karakterininde değişeceği beklenilmektedir. Yapılan bir çalışmada stiren ve sodyum vinilbenzil sülfonat'ı su-metanol ortamında kopolimerleştirmiştir (Lappainen ve ark., 1994). Partikül monodispersitesinin ve yüzey yükünün daha da arttığı gözlenmiştir. Liu ve Xiao, katyonik lateks partikülleri yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle su-etanol ortamında gerçekleştirmiştir. Stiren ile kuaterner amonyum komonomeri, (2-(metakriloyloksi) etil) trimetil-amonyum klorür (MATMACS) katyonik başlatıcı varlığında kopolimerleştirmiştir (Liu ve ark., 2001). Sparnacci, polimetil metakrilat-kökenli fonksiyonel nanoküreleri emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlemiştir. Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile metil metakrilat'ı ionic komonomer (2-(dimetilamino)etil metakrilat) ve non-iyonik komonomer (poli(etilen glikol) metakrilat) ile hazırlamıştır. Nanokürelerin boyu iyonik ve non-iyonik komonomer miktarından etkilenmektedir. 540-1080 nm boyutlu partiküller üretilmiş ve karakterize edilmiştir (Sparnacci, 2000).

2.1.4. Fonksiyonel Grup Eklenmesi

Polimerik partikül yüzeylerinde fonksiyonel grup bulundurulması mikroküreleden kimyasal yöntemler ile türetilecek uygulamalarda kullanılabilmeri için gereklidir. Fonksiyonel grup içermeyen polimer yüzeyleri ile bu tür uygulamalar yapmak oldukça zordur.

Fonksiyonel polimer mikroküreleinin sentezi, apolar monomer olan stiren gibi hidrofobik monomerin fonksiyonel grup içeren polar monomer ile kopolimerleştirilmesiyle elde edilir. Akrilat-bazlı fonksiyonel komonomerler genellikle tercih edilir. Karboksil, hidroksil,amin, amid, yada klorometil fonksiyonel grupları polimerik mikroküreye son ürünün monodispersitesi bozulmadan eklenebilir. (Tseng ve ark., 1986; Okuba ve ark., 1992, 1994; Tuncel ve ark., 1994; Shirahama ve Suzawa, 1988). Kopolimerizasyon metodunun seçiminde polariteler ve monomer ve komonomerin reaktiflikleri önemli rol oynar. tek-basamaklı yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu bazı limitasyonlarla birlikte

apolar monomer ile polar monomerin direk kopolimerizasyonunda kullanılabilir. Bu metodun dezavantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Fonksiyonel komonomerlerin sudaki çözünürlükleri oldukça yüksek olduğu için, ortamdaki başlatıcı yada komonomer konsantrasyonunun yüksek olmasıyla sulu fazda reaksiyon başlaması çok hızlı olabilir. Emülsiyon kopolimerizasyonu reaksiyonuna fonksiyonel komonomerin çözelti veya dispersiyon polimerizasyonu eşlik edebilir. Bu da farklı kompozisyonlarda ve molekül ağırlıklarında partikül, agregat ve çözünür polimer formunda polimerik ürünlerin oluşumuyla sonuçlanabilir.
2. Çok hızlı reaksiyon başlangıcı partiküllerin topaklanmasına neden olabilir.
3. İkincil çekirdeklenme ile oluşan kopolimer partikülleri nedeniyle monodispersite kontrol edilemiyeceği için son ürünün boy dağılımı geniş olabilir.

Bu yöntem genellikle oluşan tek boyutlu partiküle çok küçük miktarda komonomerin eklenmesi için uygun bir yöntemdir. Tek boyutlu p(St/AAm), P(St/HEMA), P(St/AAc) ve P(St/AAm/AAc) lateksler direk emülsiyon kopolimerizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır (Tamai ve ark., 1989). Bir başka çalışmada hidroksil grup taşıyan P(St/DVB) partikülleri polimerizasyon reçetesinde PVA'yı stabilizatör olarak içeren çok-basamaklı emülsiyon polimerizasyonu tekniği ile elde etmiştir. Reaktif gruplar içeren, stiren-akrilonitril (S/AN) ve stiren-glisidil metakrilat (S/GMA) "coreshell" emülsiyon kopolimerizasyonu veya yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon kopolimerizasyonu yöntemiyle hazırlanmıştır.

2.2. MANYETİK PARTİKÜLLER

2.2.1. Ferrosıvılar

Bir taşıyıcı sıvı içinde dağıtılmış süperparamanyetik partiküller ferrosıvılar (ferrofluid) olarak adlandırılmaktadır. Kararlı bir ferrosıvı süperparamanyetik partiküller, bir taşıyıcı sıvı ve bir yüzey aktif madde içermektedir. Ferrosıvılar doğal olarak bulunmazlar ve ilk olarak 1960 yılında tanımlanmışlardır

Ferrosıvıların kararlı dispersiyonu manyetik çekim kuvvetleri, yerçekimi kuvveti ve London dispersiyon yada van der Walls kuvvetleri olmak üzere üç temel çekim kuvvetleri dengelenerek sağlanmaktadır. İki manyetik dipol arasındaki manyetik çekim enerjisi (U_A^{mag}), m_1 ve m_2 dipol momentlerininin ve partiküller arası uzaklığın

bir fonksiyonudur (Rosensweig, 1985). Partiküller arası uzaklık azalırken etkileşim enerjisi artar ve bir yüzey aktif maddeyle korunmadığından topaklanma oluşur. Ayrıca bir manyetik alanda partiküllerin manyetik dipolleri birbirini çeker. Derişik bir manyetik sıvı dispersiyonuna bir manyetik alan uygulandığında partiküller sıvı ile birlikte uygulanan alan yönünde hareket ederler.

Kolloidal kararlılığı korumak ve partiküller arası etkileşim enerjisini yenmek için partiküllerin yeterince küçük ve süperparamanyetik olması gerekmektedir. En önemlisi partiküller süperparamanyetik olduğunda sistemde partiküller arası manyetik etkileşim azalmaktadır. Çünkü termal enerji partiküllerin manyetik momentlerinin serbest dönmelerine sebep olmaktadır. Brownian hareketi partiküllerin dağılmasını sağlarken yerçekim kuvveti partikülleri aşağıya çeker. Rosensweig tipik bir ferrofluid'deki nanopartiküllerin kararlılığı üzerine yerçekimi etkisinin çok az olduğunu tayin etmiştir. Partiküllerin büyük yüzey alanının hacme oranının artmasıyla nanopartiküllerin yüzey enerjisi (≥100dyn/cm) artmaktadır. Bu büyük yüzey enerjisini düşüren çekim kuvvetleri topaklanmayı kolaylaştırmaktadır. Partiküller arası uzaklık azaldıkça etkileşim enerjisi artar ve topaklanma oluşur. Bir partikül diğerinden uzaklaşırken bu çekme kuvveti azalır. Van der walls çekme kuvvetleri önemli bir faktördür ve kararlı kolloidal dispersiyonlar hazırlamak için bu çekme kuvvetlerinin engellenmesi gerekir. Elektrostatik veya sterik itme kuvvetleri partikül topaklanmasını önlemek ve çekme kuvvetlerini dengelemek için kullanılan iki mekanizmadır. Partikül yüzeyinin elektrostatik stabilizasyonu bir yük taşımasıyla oluşturulmakta ve eğer partiküllerin birbirine yakınlığı belli bir uzaklığın altına düştüğünde partiküller birbirini geri iter. Elektrostatik stabilizasyon pH duyarlı bir metot ve özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanımı sınırlıdır. Sterik itme metodu genellikle uzun zincirli yüzey aktif maddelerini kullanarak oluşturulmaktadır (Kim ve ark., 2001).

2.2.2. Manyetik Nanopartiküller

Bir sıvı içersinde süperparamanyetik dispersiyonlar oluşturan manyetik partiküller 1'den 100 nm boyuna kadar değişen boyutlarda metal ve metal oksitlerden oluşmaktadır. Bu metal ve metal oksitler Ni, Co, Fe, Fe_3O_4 ve Fe_2O_3'den oluşmaktadır.

Çizelge 2.1. Geçiş metalleri ve metal oksitlerin manyetik özellikleri

Maddeler	**Doygunluk Mıknatıslığı (Ms) (emu/cm^{-3}) 298 K**	**Curie Sıcaklığı (K)**
Ni	485	631
Co (Kübik)	1400-1422	1404
Fe (Kübik)	1700-1714	1043
Γ-Fe_2O_3	394	820-986
$FeO.Fe_2O_3$	480-500	858
$MnO. Fe_2O_3$	410	573
$CoO. Fe_2O_3$	400	793
$NiO. Fe_2O_3$	270	858
$CuO. Fe_2O_3$	135	728

2.2.3. Demir Oksitler

Demir oksitler farklı manyetik özellikler ile değişik kimyasal bileşenlerden oluşmaktadır. Ferrimanyetizma gösteren bu ilginç materyaller γ-Fe_2O_3 , Fe_3O_4, $MO.Fe_2O_3$ (M=Co, Mn, Ni veya Cu) gibi demir oksitlerdir. Ferrimanyetik demir oksitler geçiş metalleri gibi ferromanyetik metallerden daha küçük bir manyetik cevap özelliği gösterirler. Fakat, demir oksitler oksidasyona daha az duyarlı ve bu nedenle kararlı manyetik etkilerini korumaktadırlar.

Çizelge 2.2. Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri

Mineral	**Formül**	**Manyetik Özellik**
Goethite	α-FeOOH	Antiferromanyetik
Akaganéite	β-FeOOH	Antiferromanyetik
Lepidocrocite	γ- FeOOH	Antiferromanyetik
Feroksayt	δ- FeOOH	Ferrimanyetik
Ferrihidrit	$Fe_5HO_8.4H_2O$	Antiferromanyetik
Hematit	α-Fe_2O_3	Zayıf ferrimanyetik
Maghemit	γ-Fe_2O_3	Ferrimanyetik
Manyetit	Fe_3O_4	Ferrimanyetik

Manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit (γ-Fe_2O_3) en genel ve en çok araştırılan demir oksitlerdir. MO. Manyetit ve maghemit aynı fiziksel özelliklere ve kristal yapısına sahiptir (Çizelge 2.3). Her ikiside ferrimanyetik özellik gösterir. Fakat maghemit daha düşük doygunluk mıknatıslığına sahiptir. Bunların manyetik cevapları alt örgü etkileşimleri nedeniyle değişmektedir. Maghemit (γ-Fe_2O_3) sadece Fe^{3+} iyonlarından oluşmaktadır. Kristal yapısında Fe^{3+} iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısıda oktahedral düzenlenmiştir. Manyetit ise ($FeO.Fe_2O_3$), 1:2 molar oranında Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarından oluşmaktadır. Fe^{3+} iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı oktahedral ve Fe^{2+} iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir.

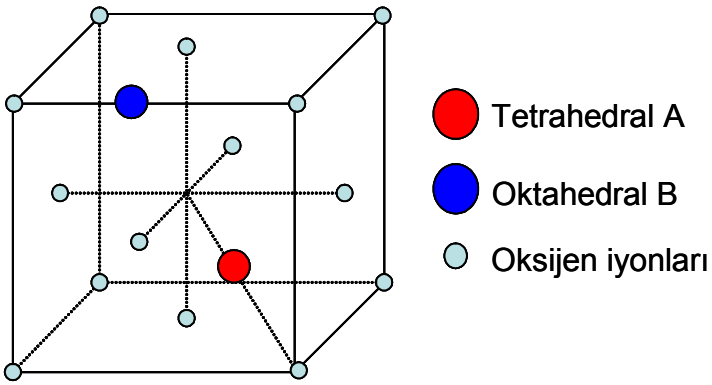
Çizelge 2.3. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri

	Kristal yapısı	**Hücre boyutu (nm)**	**Renk**	**Doygunluk mıknatıslığı**	**Curie sıcaklığı**
Manyetit	Kübik	a_0=0.839	Siyah	90-98	850
Maghemit	Kübik tetragonal	a_0=0.834	Kırmızı kahve	76-81	820-986

2.2.4. Manyetit

2.2.4.1. Manyetit Kristal Yapısı ve Manyetik Özellikleri

Manyetit (Fe_3O_4), oksijen iyonlarının her üç eksen boyunca birbirine karşı gelen pozisyonlarda küp içersinde düzenli yerleştiği kübik birim hücre merkezi şekil ile bir ters spinel kristal yapısına sahiptir. Birim hücre, 32 O^{2-} anyonu 16 Fe^{3+} katyonu ve 8 Fe^{2+} katyonları olmak üzere 56 atomdan oluşmaktadır. Manyetitin kimyasal formülü Fe_3O_4, fakat $FeO.Fe_2O_3$ olarak tanımlanmaktadır. Ters spinel yapı Fe^{3+} iyonlarının yarısı tetrahedral, geri kalan Fe^{3+} iyonları ve Fe^{2+} iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir (Cornell, 1996; Brabers , 1995).



Şekil 2.1. Manyetitin ters spinal kristal yapısı

Manyetit elektron konfigürasyonu, net manyetik momentler veren eşlenmemiş 3d elektronlarını içermektedir. Tetrahedral düzenlenmiş Fe^{3+} iyonlarının spinleri ve oktahedral düzenlenmiş Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarının spinleri ters paralel ve eşit olmayan bir büyüklüktedir.

2.2.4.2. Manyetit Kararlılığı ve Yüzey Kimyası

Manyetit havada kolayca maghemite oksitlenir. Maghemit sadece az manyetik özelliğe sahip ferrimanyetiktir. Fakat 300 ºC'den büyük sıcaklıklarda manyetit hematite oksitlenir.

$$4\ Fe_3O_4 + O_2 \longrightarrow 6\ Fe_2O_3 \qquad (1.1)$$

Hematit antiferromanyetiktir, bu nedenle bu dönüşüm bazı uygulamalarda göz önünde bulundurulabilir.

Manyetit nanopartiküllerin kullanımı ve özellikleri dikkate alındığında bu partiküllerin yüzey özellikleri ve kimyası büyük önem taşımaktadır. Manyetitin sudaki dispersiyonu ne pozitif ne de negatiftir, çözeltinin pH' ına bağlıdır. Manyetitin izoelektrik noktası 6.8'dir. Manyetit nanopartiküllerin elektrostatik çift tabaka oluşturulması, sterik stabilizasyonu veya izoelektrik noktasının sitrat yada silika kaplanarak modifiye edilmesiyle stabilizasyonu sağlanmaktadır. Demir oksit nanopartiküllerin stabilizasyonu kararlı bir manyetik kolloidal ferrosıvılar oluşturulması için çok önemlidir (Cornell ve ark.,1991).

2.2.4.3.Manyetit Nanopartikülleri Sentezleme Metotları

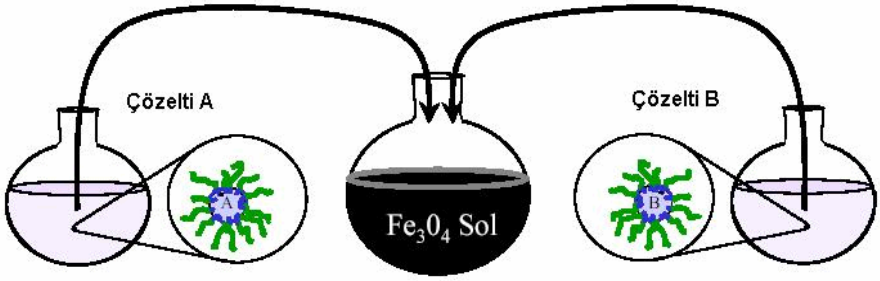
Manyetit ve maghemit nanopartiküllerin sentetik metotlarla oluşturulması için literatürde farklı birçok yöntem bulunmaktadır. Manyetit, boyut küçültme ve sulu çöktürme olmak üzere sentetik olarak iki şekilde sentezlenmektedir. Manyetitin çöktürme yöntemiyle sentezlenmesi genel olarak demir iki ve üç hidrat tuzlarının güçlü bir bazla çöktürülmesi temeline dayanmaktadır.

Boyut Küçültme Prosesi: 1960'lı yıllarda Papel tarafından geliştirilen küre öğütme değirmeni (ball mill grinding), mikron boyutundaki manyetit partikülleri yaklaşık 10 nm çapında partiküllere dönüştürülmesinde kullanılan ilk metottur. Bu yöntemle nanopartiküller oluşturmak için 500-1000 saat gibi uzun bir öğütme periyodu gerektiği için sulu çöktürme metotları bu yöntemin yerini almıştır.

Boyut Kontrollü Manyetit Sentezi : Hidratlı demir iyonlarının bir çözelti içinde sulu çöktürülmesi yöntemiyle reaksiyon koşullarına bağlı olarak farklı boylarda küresel nanopartiküller oluşturulmaktadır. Sentetik yada biyolojik nanoreaktörler kullanarak boyut kontrollu demir oksit nanopartikülleri oluşturmak için de birçok çalışmalar yapılmaktadır. Bu sınırlı ortamlar, polar olmayan çözücüler içinde suda şişen ters misel yapılar oluşturan amfoterik yüzey aktif maddeler içermektedir.

Su/yağ mikroemülsiyonları amfoterik yüzey aktif maddeler kullanılarak oluşturulmaktadır. Polar olmayan hidrokarbon çözücüler içinde polar baş grupları bir araya toplanarak misel yapılarını oluşturur. Termodinamikçe kararlı bir dispersiyon oluşturmak için bu polar olmayan zincirler çözücü içersinde uzanmaktadır. Uygun konsantrasyon ve kimyasal bileşimdeki yüzey aktif maddelerin oluşturduğu misellerin içi sulu demir tuzlarının çöktürülmesinde sınırlı

nanoreaktör ortamlar olarak kullanılmaktadır. Literatürde sodyumbis(2-etilhekzilsulfosuksinat (AOT) veya setil metil amonyum bromür (CTAB) gibi maddeler yüzey aktif madde olarak kullanılmaktadır. Nanoreaktör içinde demir oksit nanopartiküllerin oluşturulması prosesi Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Heptan gibi polar olmayan bir çözücüde kritik misel konsantrasyonundan fazla konsantrasyonda yüzey aktif madde içeren iki emülsiyon çözelti hazırlanmaktadır. Fe^{2+} iyonlarının oksidasyonunu önlemek için bütün reaksiyon karışımlarının oksijeninin giderilmesi önemlidir. Daha sonra termodinamikçe kararlı emülsiyon oluşturan sınırlı miktarda şişmiş misel içeren çözeltilerden birine demir tuzlarını içeren karışım diğerine de NH_4OH gibi güçlü bir baz ilave edilmektedir. Bu çözeltiler birleştirilerek oluşan ters misellerin içinde demir oksit nanopartiküller bulunmaktadır. Fonksiyonel gruplu yüzey aktif maddelerin oluşturduğu misellerle oluşturulan manyetit nanopartiküllerinin boyutu kontrol edilebilmektedir. Bu nedenle bu yöntemler boyut kontrollu manyetit sentezi olarak adlandırılmaktadır. Ancak yapılan araştırmalar sonucunda manyetit ve maghemitin oluşumunda fonksiyonel grupların varlığı kristal oluşumunu engellediği görülmüştür. Ayrıca demir oksitlerin bileşiminin ve kristal yapısının bu reaksiyonda kullanılan koşullara nasıl bağlı olduğu henüz belirlenememiştir (Kandori, 1991; Cornell, 1991).



Şekil 2.2. Su/yağ mikroemülsiyonu ile manyetit sentezi

İkili Çöktürme Yöntemiyle Manyetit Sentezi: 1990 'lı yıllardan beri manyetit, Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının bir baz ile çöktürülmesiyle oluşturulmaktadır. Manyetit oluşumu bu kadar eski tarihlerden beri bilinmesine karşın kesin oluşum mekanizması halen bilinmemektedir. Oluşum mekanizması ile ilgili bir genel teori, Fe^{2+} tuzunun $Fe(OH)_2$'e hidroliz olup manyetit oluşturmak için hidroksitlerle reaksiyona girdiğini ileri sürmektedir (Blesa,1985). Hidratlı Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonları arasındaki reaksiyonların belirsizliğine rağmen birçok araştırmacı kübik ters spinel

kristal yapının elde edilmesinde çekirdeklenme ve kristal geliştirme mekanizmalarının etkilerini araştırmışlardır. Birinci basamağın ardından kristal geliştirmeyle monodispers partiküller oluşturmak için çözelti içinde iyonların çekirdeklenmesinde tedbirli olunması gerektiğini bildirmişlerdir. Deneysel çözelti koşullarının kristal geliştirme basamağı sürecini etkilediği belirtilmektedir (Cornell, 1991).

2.2.5. Manyetik Yüklü Polimerik Partiküller

Mikron ve mikronaltı manyetik yüklü polimerik partiküller, polimerizasyon sırasında polimer partiküllerin içine demir oksit partiküllerin katılması ve polimer partikül yüzeylerine demir oksit nanopartiküllerinin adsoplanması olmak üzere iki şekilde oluşturulmaktadır. Bu sistemlerde manyetik yüklü yada polimerle kaplı partikülerin toplam partikül boyu büyüktür.

2.2.5.1. Polimer Partiküllerin Yüzeyine Manyetit Partiküllerin Adsorpsiyonu

Polimer kürelerinin yüzeyine manyetit nanopartiküllerinin adsorpsiyonuyla manyetik kompozit sistemler elde edilmektedir. Bu sistemler literatürde bulunan manyetik mikrokürelerin bir tipidir. Literatürde bu maddeler geniş kapsamlı olarak incelenmemiştir.

Sitratla stabilize edilmiş manyetitin polistiren (PS), polistiren/poli(izopropilakrilamid) (p(S/NIPAM) çekirdek/kabuk) ve poli(izopropilakrilamid) p(NIPAM) küreleri üzerine adsorpsiyonu ile oluşan partiküller manyetik polimer kompozitlerine birer örnektir. Bu metot, Furuzawa tarafından yapılmış ön çalışmaya dayanmakta ve 1) anyonik demir oksit ve katyonik lateks partiküllerin sentezlenmesi 2) polimer çekirdek partiküllerinin yüzeyine anyonik demir oksit partiküllerinin adsorpsiyonu 3) çekirdek latekslerinin üzerine manyetik kaplı partiküllerinin kapsüle edilmesini içermektedir. Araştırmacılar, anyonik manyetit partiküllerinin, katyonik lateks partiküllerine adsorpsiyonu katyonik PS≤ amino içeren katyonik P(S/NIPAM) ≤ amino içeren katyonik P(NIPAM) sırasında arttığını gözlemlemişlerdir. 10 nm çapındaki manyetit partiküllerinin adsorplandığı polimer partiküllerinin manyetik özellikleri incelenmemiştir (Furusawa ve ark., 1994).

2.2.5.2. Manyetit Partiküllerinin Polimerle Kaplanması

Polimerizasyon sırasında manyetitin polimer partiküllerinin içine katılması genellikle manyetik kompozit olarak adlandırılır. Literatürde bu şekilde hazırlanan manyetik yüklü polimer partiküllerine birçok örnekler bulunmaktadır. Zaitsev tarafından yapılmış bu çalışmalarından biri, manyetit nanopartikül dispersiyonuna metakrilik asit ve hidroksietil metakrilat monomerleri eklenerek çekirdek çökeleğinin polimerizasyonuyla manyetik yüklü polimerik nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu yöntemde %1 (ağırlıkça) manyetit etil asetat içinde dağıtıldıktan sonra %0.5-2.5 (ağılıkça) monomerler, çapraz bağlayıcı (%1-10 mol monomer temelinde) ve % 0.025 (ağırlıkça) AIBN eklenip 65 ºC'de N_2 atmosferi altında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Kullanılan manyetit nanopartikülleri 6-80 nm ve polimerle kaplı manyetit nanopartikülleri ise 340-400 nm boyundadır. Araştırmacılar, manyetitin doygunluk mıknatıslığını polimerle kaplamadan önce bildirmişler fakat kapladıktan sonra bu değer ölçülmemiştir (Zaitsev ve ark., 1999).

Lee ve Senna, sodyum oleat ile stabilize edilmiş manyetit varlığında polistirenin çekirdek polimerizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Sodyum oleat ile kaplı manyetit nanopartikülleri stiren monomeri ve yüzey aktif maddenin oluşturduğu emülsiyona ilave edilmiştir. Bu çözelti çekirdek polistiren partikülleri ile karıştırılarak polistirenin heterojen polimerizasyonu başlatılmıştır. Bu partiküllerin çekirdek kabuk yapısı merkezinde çekirdek olarak polistiren ve manyetit, kabuğunda polistiren kabuk içermektedir. Araştırmacılar, bu tip heterojen polimerizasyon yöntemiyle çok çeşitli manyetik kompozit mikroküreleri sentezlenebileceğini söylemişlerdir. Bu çekirdek/kabuk tipi polistiren-manyetit/ polistiren partiküllerin manyetik özellikleri incelenmemiştir (Lee ve ark., 1995).

Diğer ilginç bir manyetik kompozit de, manyetik çekirdekler ile poli(izobutilsiyanoakrilat) partiküllerinin oluşturulmasıdır. Polialkilsiyanoakrilatlar, anyonik polimerizasyonla sentezlenen ilaç uyumlu biyobozunur polimerlerdir. Manyetit, Fe^{2+} hidroksit jelinin kristalizasyonu ile hazırlanmıştır. Daha sonra manyetit/poli(izo-etil-2-siyanoakrilat) (çekirdek/kabuk) nanopartikülleri sentezlenmiştir. Bu yöntemde 2.10^{-3} M HCl çözeltisi içinde dağıtılmış olan %0.75 w/v manyetit süspansiyonu polimerizasyon ortamına ilave edilmiştir. (%1w/v) Monomerin karıştırılan çözeltiye damla damla ilave edilmesiyle polimerizasyon

gerçekleştirilmiştir. Polimerle kaplı partiküllerin ve iç kısmındaki manyetik çekirdeklerin boyu, deneysel parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Arias, yaklaşık 84 nm olan manyetik çekirdeklerin polimerle kaplı boyunun yaklaşık 144 nm olduğunu bildirmiştir (Arias ve ark., 2001). Ramirez ve arkadaşları miniemülsiyon prosesi ile yüksek manyetit içerikli manyetik polistiren nanopartikülleri sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir (Ramirez ve ark., 2003).

Sonuç olarak, manyetik nanopartiküllerin polimerle kaplanmasında en çok kullanılan yöntem manyetik partiküllerin etrafında monomerlerin süspansiyon, miniemülsiyon, dispersiyon, ters mikroemülsiyon ve mikroemülsiyon polimerizasyonu gibi çeşitli yöntemlerle polimerleştirilmesine dayanmaktadır. Dispersiyon, süspansiyon polimerizasyonlarıyla mikron boyutunda partiküller elde edilirken mikroemülsiyon polimerizasyonu ile nano boyutta manyetik yüklü polimerik partiküller elde edilmiştir.

2.3. NÜKLEİK ASİTLER

Nükleik asitler vücut ağırlığının yalnızca % 2' sini oluşturmalarına karşın genetik bilginin depolanması, ekspresyonu ve transmisyonu gibi çok önemli görevleri üstlenmiş moleküllerdir. Nükleik asitleri kimyasal olarak şu iki grupta incelemek mümkündür: (i) deoksribonükleik asit (DNA) ve (ii) ribonükleik asit (RNA). DNA hücrenin kromozomlarında, mitokondrilerinde ve bitkilerin kloroplastlarında bulunur. Hücrelerde ayrıca plazmid adı verilen kromozom yapısında olmayan sitoplazmik DNA'lara da rastlanır. Organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için hücrelerin çoğalması gereklidir. Döllenmiş bir yumurtada bulunan DNA, bulunduğu organizmanın gelişimini yönlendirecek bilgiyi içerir. Hücrelerin bölünerek çoğalması sırasında DNA tam olarak replike olur ve bölünen hücrenin özelliğine göre seçici olarak belirli bilginin ifade edilmesi söz konusudur (Champe ve ark., 1998).

Her iki nükleik asit de nükleotidlerin polimerize olması ile meydana gelmektedir. Makromoleküler yapıda şeker ve fosfat grupları fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak molekülün ana omurgasını oluşturur. Azotlu bazlar ise iki omurgayı birarada tutmaktadır. Kısacası nükleik asitler bir çok yapısal ünitenin bir düzen içinde bir araya gelmesi ile ortaya çıkmaktadır (Stapleton ve ark., 2002). Bunlar

şekerler, pürin ve primidin bazları, nükleozitler, nükleotidler ve polinükleotidler (nükleik asitler)dir.

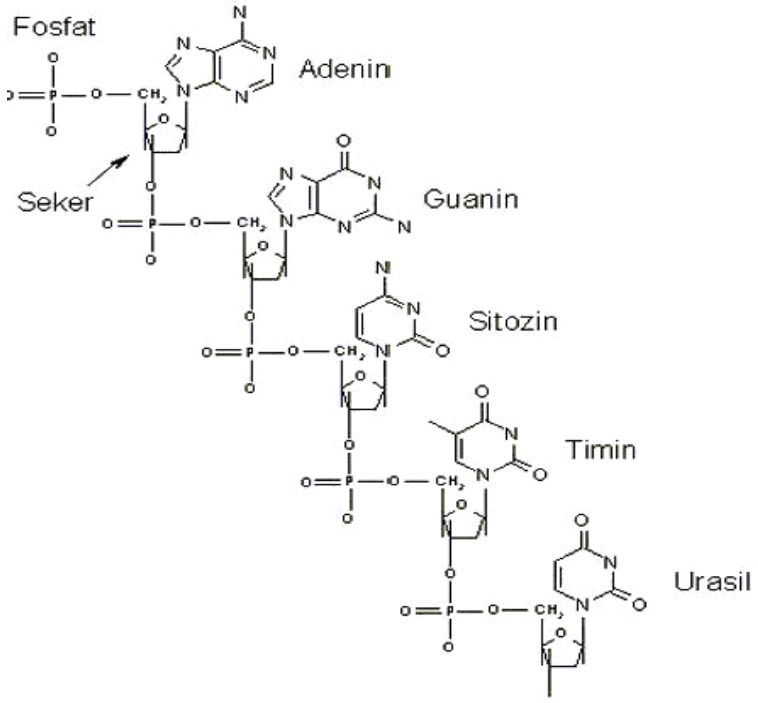
Şekerler nükleik asitlerin en önemli ana elemanlarıdır. Hem RNA hem de DNA'da pentozlar nükleik asitlerin ana kısmını oluşturur. RNA'da riboz DNA'da ise 2-deoksiriboz şekerleri bulunur. Nükleik asit bünyesindeki şeker ünitelerinin atomları azotlu bazların atomları ile karışmaması için 1', 2',...., 5' gibi üs işaretleri ile işaretlenmiş durumdadır. Nükleik asit şekerlerinin 3' karbon atomuna bağlı OH grubu kendinden sonra gelen nükleik asit şekerinin 5' karbon atomuna bağlı fosfat grubu ile reaksiyona girerek ester bağı oluşturur. Şeker üniteleri arasındaki fosfodieaster bağları nükleik asitlerin lineer yapıdaki omurgasını oluşturur.

Azotlu bazlar olarak da bilinen pürin ve pürimidinler nükleik asitlerin yapısına katılan önemli organik bileşiklerdir. Pürinler biri altı diğeri beş atomdan oluşan iki halkasal yapının ortaya çıkmıştır. Pirimidinler ise yalnızca altı üyeli bir tek halkadan ibarettir. Dört adet pürin, dört adette pirimidin bazları mevcuttur (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Pürin ve Pürimidin bazları

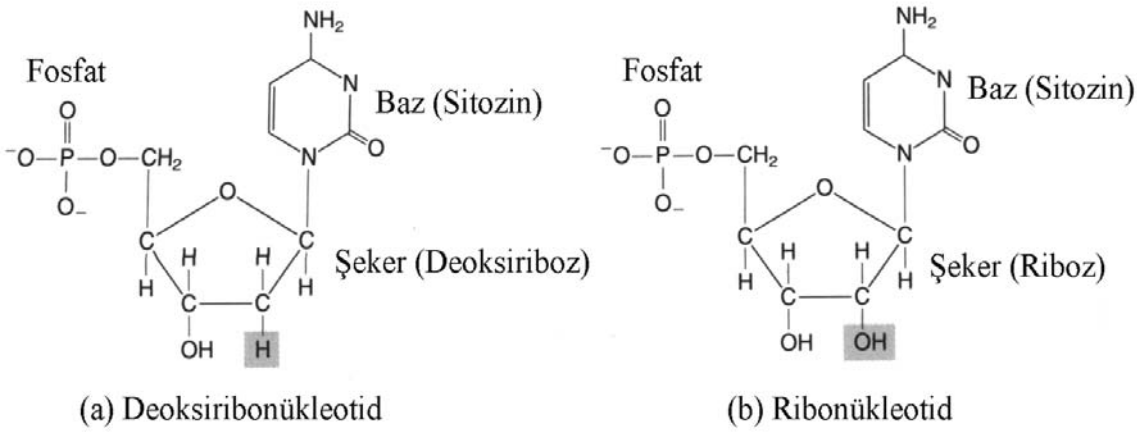
Pürinler	**Pürimidinler**
Adenin: 6-amino pürin	Urasil: 2,4-dioksi-5-metil pirimidin
Guanin: 2-amino-6- oksi pürin	Timin: 2,4-dioksi-5-metil primidin
Hipoksantin: 6-oksi pürin	Sitozin: 2-oksi-4- amino primidin
Ksantin: 2,6-dioksi pürin	Oratik asit: 2,4-dioksi-6-karboksi primidin

Şekil 2.3'de görüldüğü gibi baz grubu 5 farklı yapıdadır. Bunlardan adenin, guanin ve sitozin hem DNA hem de RNA'nın yapısında bulunmaktadır. Urasil ise yalnızca RNA'da bulunur. Timin normal olarak DNA'da bulunmasına rağmen bazen urasil gibi tRNA yapısına katılır. Çift halka içeren adenin ve guanin "purin" bazları, tek halka içeren diğerleri ise "pirimidin" bazları olarak adlandırılır.



Bir pürin veya pürimidin riboz veya 2-deoksiriboz şekerlerinden birisine eklenirse nükleozit adı verilen bileşikler meydana gelir. Nükleozitlerde şekerin birinci karbon atomu pürin bazlarının dokuzuncu; pürimidin bazlarının ise birinci azot atomlarına bağlı durumdadır (Lehninger ve ark., 2000; Mathews ve ark., 1996).

Nükleozitlerin riboz veya deoksiriboz şekerlerine bir veya daha çok fosfat grubu şekerin 5’ karbonuna ester bağı ile bağlı durumdadır. Eğer birden fazla fosfat grubu söz konusu ise bunlar birbirine yüksek enerjili asit anhidrit bağı ile bağlanırlar. Bu durumda fosfat grubunun yerini ifade etmek üzere nükleotid isminin önüne karbon atom numarasını yazmaya gerek yoktur. Şayet 5’ karbon atomundan faklı pozisyonda bağlanma söz konusu olursa nükleotid isminden önce bağlanma noktasını belirtilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. DNA ve RNA' daki nükleotidler (a) Deoksiribo nükleotid; ve (b) Ribonükleotid.

Nükleotidler 3'-5' fosfodiester bağları ile polimerize olarak polinükleotidleri oluştururlar. Ribonükleotidlerin polimerizasyonu RNA oluşumuna yol açarken deoksiribonükleotidlerin polimerizasyonu sonucu da DNA oluşur. DNA ve RNA önemli farklar Çizelge 2.5'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. RNA ve DNA arasındaki farklılıklar

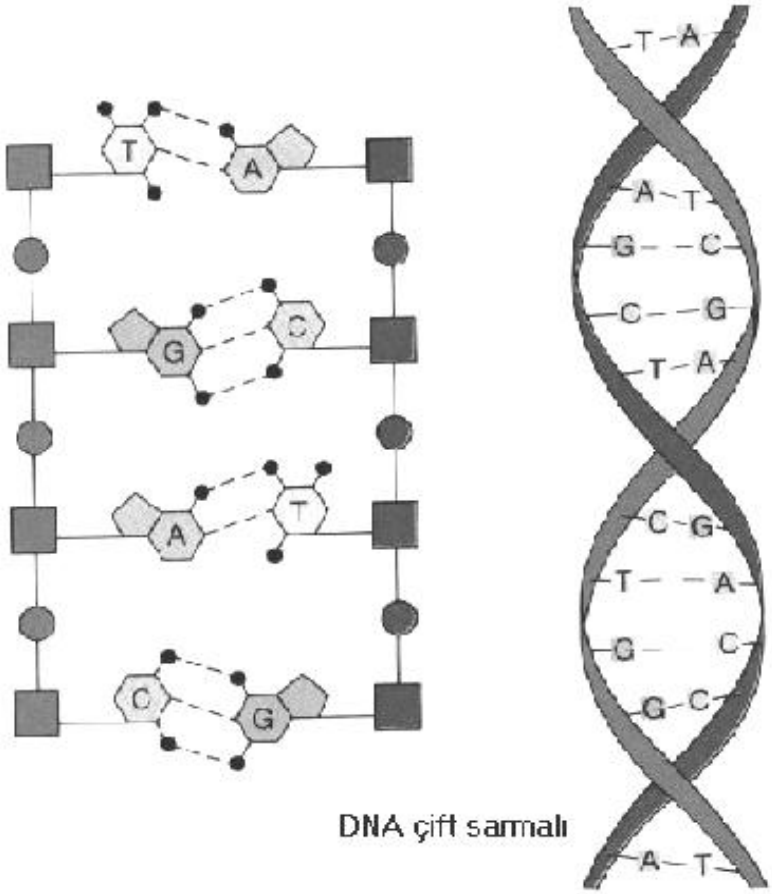
	RNA	**DNA**
Şeker Birimleri	Riboz	Deoksiriboz
Azotlu Bazlar	A, G, C, U	A, G, C, T
Sarmal Yapı	Tek sarmal	Çift sarmal
Türler	tRNA, mRNA, rRNA	Nükleer, Mitokondrial ve Plazmid DNA'ları

DNA çok sayıda deoksiribonükleotid molekülünün, birbirine 3'-5' fosfodiester bağı ile bağlanması sonucu ortaya çıkan bir biyopolimerdir. Fosfodiester bağı ardışık nükleotid şekerlerinden birisinin 5'-hidroksil grubunun, diğerinin 3'-

grubuna fosfat köprüsü aracılığı ile bağlanmasıyla oluşur. Sonuçta uzun ve düz bir zincir yapısı ortaya çıkar. DNA zincirinin ana çatısını bu deoksiriboz-fosfat iskeleti oluşturur. Bu iskelet boyunca yerleşmiş olan baz dizeleri geleneksel olarak zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru yazılır. DNA ve RNA'da nükleotidler arasında bulunan fosfodiester bağları ya kimyasal hidroliz yada enzimatik yolla açılabilir. Hidroliz yapan enzimlerin genel adı nükleazlardır. DNA'da deoksiribonükleazlar, RNA'da ise ribonükleazlar hidrolizi gerçekleştirir. Nükleik asit zincirinin iç kısımlarındaki nükleotidleri hidrolize ederek sertleştiren nükleazlara endonükleazlar; zincirin her iki ucundaki nükleotidleri hidrolize edenlere ise ekzonükleazlar denir (Champe ve ark., 1995).

Tek sarmallı DNA içeren bir kaç virüs dışında DNA çift sarmallıdır. Sarmalı oluşturan iki zincir ortak bir eksen etrafında dönerek, çift heliks yapıyı oluştururlar. Bu yapıda zincirler birbirlerine antiparalel konumda bulunurlar. Sarmalın 5' ucu diğer sarmalın 3' ucu ile eşleşir. DNA heliksinin en sık rastlanan şekli, klasik "B" şeklidir. Burada zincirlerin hidrofilik deoksiriboz fosfat ana iskeleti molekülün dış kısmında bulunur. Hidrofobik bazlar ise içe doğru, heliks eksenine dik olarak yerleşmişlerdir. Heliksdeki bu yerleşim düzeni sarmallar arasında bir tane geçiş (majör), bir tane de dar (minör) oluk ortaya çıkarır (Hantz ve ark., 2001).

DNA molekülünün iki zinciri, pürin ve pürimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından bir arada tutulmaktadır (Şekil 2.5) Çift zincirli helikste bazlar heliksin iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için heliksin iç kısmı hidrofobik dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pürimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler A karşısında T; G karşısında C bulunduğu için son derece spesifiktir. Bu nedenle çift heliks yapısında yer alan bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde; ikinci zincirdeki baz dizisi belirlenebilir (Romieu ve ark., 1999).



Şekil 2.5. DNA' da çift sarmal yapı ve bazların eşleşmesi ile kurulan hidrojen bağ köprüleri.

DNA'nın içinde bulunduğu ortam pH'sı değiştirilirse ve ortamın ısısı artırılırsa bazlar arasındaki hidrojen bağları etkilenerek, çift sarmal yapı açılabilir. Şeker birimleri arasındaki fosfodiester bağları ise hafif değişkenliklerden etkilenmezler. Heliks yapısının açıldığı sıcaklığa DNA'nın erime derecesi denir. DNA zincirinin açılarak çift heliks yapısının tamamen bozunmasına "denatürasyon" denir. Denatürasyon, DNA çözeltisinin 260 nm'de absorbansı ile ölçülebilir. 260 nm dalga boyunda tek sarmal DNA çift sarmal DNA'ya oranla daha fazla absorbans oluşturur.

G ve C arasındaki üç (G≡C); A ve T arasındaki iki (A=T) hidrojen bağı bulunduğundan yüksek konsantrasyonda G ve C taşıyan DNA, A ve T yönünden zengin DNA'ya göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olur. Ilımlı koşullarda

birbirinden ayrılan DNA çift zinciri, koşullar düzelince tekrar eski haline dönüşebilir, bu işlem “renatürasyon” olarak isimlendirilir.

2.3.1. Plazmid DNA

Bazı bakterilerde, kendi büyük halkasal kromozomlarının yanısıra, genetik materyal taşıyan ekstrakromozomal DNA segmentleri bulunmaktadır. Bunlar bağımsız olarak hücre DNA’sının dışında (plazmid) bulunabildiği gibi hücre DNA’sıyle birleşmiş (epizom) olarakta bulunabilirler. Plazmidler çift iplikli halkasal bir şekilde olup 4-60x10^6 dalton molekül ağırlığında değişmektedirler. Plazmidler hücre için hayati önem taşıyan gerekli elementler değildirler. Bunlar sonradan çeşitli yollarla hücreye girerler ve varlıklarını, bu hücrelere yeni özellikler kazandırdıklarında belli ederler. Plazmidler genellikle, bakteri kromozomunun % 1-2’si kadar ve 12-200 arası gen taşıyabilen bir uzunluğa sahiptirler.

Plazmidlerin hemen hepsi kendi bağımsız durumlarını devam ettirebilmek için gerekli temel genetik bilgilere sahiptirler. Hücre bölünmesi sırasında, bakteri DNA’sı kopyasını çıkarırken plazmitinde aynı anda bir kopyası çıkarılır ve kardeş hücreye geçer. Böylece girdikleri hücrede hücre sayısının artması kadar içerisindeki plazmid de çoğaltılmış olur. Plazmidler bakteri hücrelerinden kopyalanabilir ve çoğaltılabilirler (Arda, 1985).

Plazmidlerin en önemli özellikleri, antibiyotik gibi çeşitli antibakteriyal ilaçlara karşı direnç gösteren genler taşımalarıdır. Böylece içinde bulundukları bakteri hücresini bu ilaçlardan koruyabilirler. Plazmidler üzerlerinde antibiyotiklere direnç gibi çok sayıda gen bulunan küçük çembersel DNA molekülleri olup, bakterinin içinde hiçbir sınıra bağımlı olmaksızın kendilerinin eşleyebilir, kendi kopyalarını sınırsız olarak çıkarabilirler.

Günümüzde plazmidlerin bu özelliklerinden faydalanarak genetik mühendisliğinde yoğun olarak plazmidler kullanılmaktadır. Gen bozukluklarında sağlam gen izole edilerek plazmid DNA’sına takılmakta, plazmid uygun bakterilere aktarılıp çoğaltılmaktadır. Aktarılan geni almış bakteriler dirençli oldukları antibiyotik ortamında çoğaltılıp, plazmid DNA‘lar uygun kit ve metodlarla saflaştırılabilirler. Saflaştırılmış plazmid‘in saflıkları kontrol edildikten sonra in vitro ve in vivo ortamlarda hücrelere gen aktarımında kullanılmaktadır.

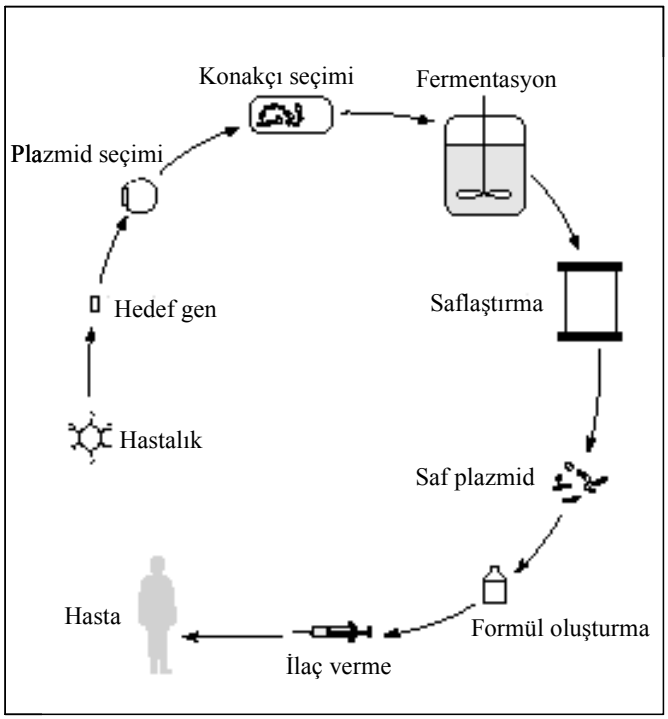
Plazmidler küçük moleküllerdir. Genomik DNA ile karşılaştırıldıklarında, DNA' nın %4–20'si arasında olduğu görülür. Plazmidler bazı üreme koşullarında konakçı hücre için mutlaka taşınması gereken yapılar değildir. Bununla birlikte pek çok plazmid özel koşullar uyum sağlamak için önemli olan genler içerir. Bu genler çoğu kez bakterinin plazmidi taşıdığına dair temel işaret olurlar. Örneğin R plazmidi taşıyıp çeşitli antibiyotiklere dirençli olan bakteriler, aynı plazmidi taşımayan bakterilerin yaşayamadığı antibiyotikli ortamlarda yaşayarak diğerlerinden ayrılırlar.

Çeşitli *E.coli* suşlarında bir çok plazmid tipine rastlanmıştır. Ancak en çok bilinenleri; F, R, Col plazmidleridir. Bu plazmidler bazı özellikleri paylaşsalar da önemli farklılıklara sahiptirler.

F plazmidlerin en büyük özellikleri, bakteri kromozomuna entegre olabilmeleridir ve kromozomdan ayrılmaları nadir de olsa gerçekleşir. R plazmidleri, konakçıyı bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli kılar. Bu tip plazmidler, transfer edilerek başka hücrelerin de direnç kazanmasına yol açabilirler. Col plazmidleri, "kolisin" adını alan bir grup proteinin sentezinden sorumlu genleri içerirler. Kolisinler, yakın suşlardan aynı tip Col plazmidini taşımayan bakterileri öldürme özelliğindedirler. Öldürme mekanizması, Col plazmidinin tipine göre değişiklik gösterir.

2.4. GEN TERAPİ

Gen tedavisi(gen terapisi) özellikle son yıllarda kanser ve AIDS gibi yaygın olarak rastlanan hastalıkların ve daha az yaygın olsa da tedavisi zor immun bozuklukların tedavisinde önemli ve gelecek vadeden bir yaklaşımdır (Latchman, 1994; McKusick, 1994) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Gen terapi

Gen terapisi ile hastalıkların tedavi edilmesinde çeşitli yaklaşımlar vardır : (i) kalıtsal hastalıklarda bozuk olan genin yerine sağlam genin aktarılarak istenilen proteinin sentezlenmesi, (ii) tümör hücrelerine hücreyi öldürecek gen aktarılması, (iii) istenmeyen genin çalışmasını durdurmak için antisense oligonüleotid göndererek gen ekspresyonunu durdurmak (Anderson, 1994).

Gen terapisinde istenilen geni hedef hücrelere aktarmakta iki temel strateji kullanılmaktadır. Birinci stratejide hastaya verilmek istenen genler bir ilaç gibi hastaya (kan dolaşımına) enjekte edilir. Ancak, burada genin hastanın immün sisteminden korunması ve istenilen hedef hücreye ulaşarak hücreye girmesi beklenir. İkinci yaklaşımda ise hastadan alınan hücreler istenilen gen ile invitro ortamda transfekte edilir, hücrelerin sayısı hücre kültür ortamlarında arttırılır ve hücreler hastaya geri implante edilir. Bu amaçla bir taşıyıcı sisteme gereksinim vardır.

Rekombinant DNA teknolojisinin 1980 'li yıllarda uygulamaya başlamasına bağlı olarak aynı yıllarda ilk klinikte uygulanabilir gen taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Anderson, 1992).

1990'lı yıllardan 2000'li yıllara kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde viral ve viral olmayan vektörler kullanılarak klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İlk uygulamalarda virüsler taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Fakat virüslerın dezavantajlarından dolayı nonviral sistemler kullanılmaya başlanmıştır.

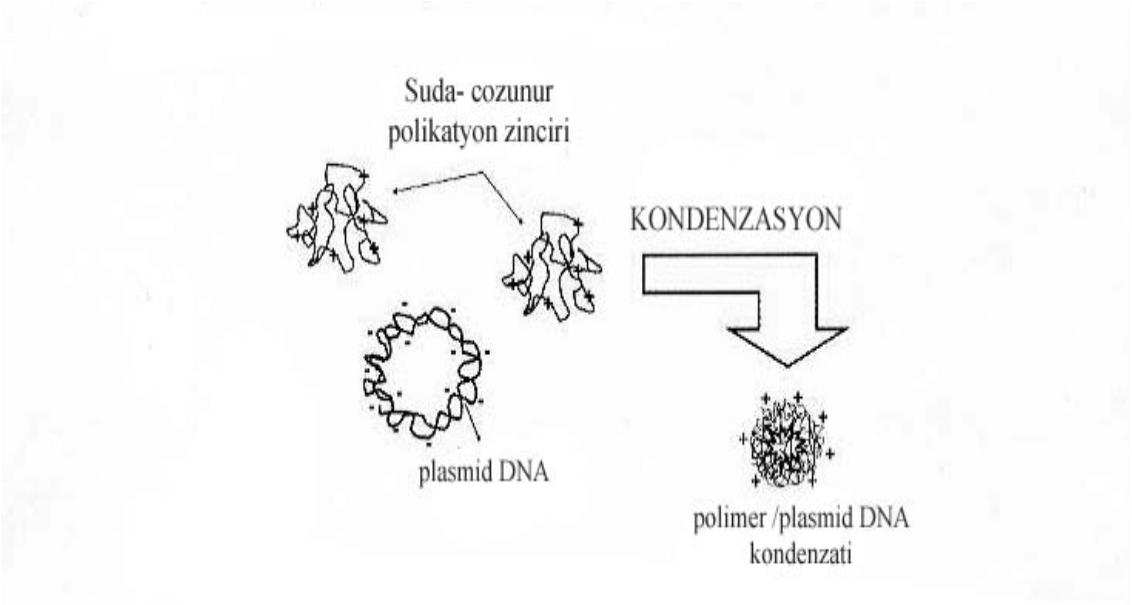
Bu gelişmeler dikkate alındığında gen terapisinde kullanılan taşıyıcıları şu iki grupta toplamak mümkündür: (i) viral sistemler ve (ii) nonviral sistemler. Viral sistemlerde virüsler taşıyıcı olarak kullanılır ve bunlarla ilgili ayrıntılı bilgi ilgili literatürde bulunabilir. Virüsler hücrelere kolaylıkla girmektedir. Eğer seçilen genler virüsler içine yerleştirilirse, hücre içine giren virüslerle istenilen genlerin hücre içine sokulması, başka bir ifadeyle hedef hücrenin transfeksiyonu başarıyla gerçekleştirilebilir (Felgner and Rhodes, 1991). Virüslerin taşıyıcı vektörler olarak kullanılmasında önemli sorunlar vardır. Virüs hedef hücrede çoğalırsa hem girdiği hücrenin ölümüne neden olabilir hemde burada çoğalarak diğer hücreleri de enfekte edebilir. İkinci sorun ise, virüslerin sınırlı miktarda genetik materyal taşıma kabiliyetinde olmalarıdır. Bir virüsden ancak belli sayıda gen çıkartılarak, eklenecek gen için sınırlı bir yer sağlanabilir. Örneğin gen transferinde yaygın olarak kullanılan retrovirüsler ve adenovirüslerde, mevcut boşluklara en fazla sırasıyla 9 ve 7 kilobazlık DNA yerleştirilebilmektedir. Ancak, insanda çok az sayıda genin bu boyut sınırlarına girdiği not edilmelidir. Virüsler immün cevaba neden olur, dolayısıyla bağışıklık sorunu nedeniyle tekrarlanan dozlarda virüs yüklemesi yapma olanağı yoktur. Virüsün vücutta aktive olma riski herzaman söz konusudur. Viral taşıyıcıların önemli bir sınırlayıcı özelliği de spesifik olmamaları, hedef hücre dışında kontrolsuz bir şekilde hemen hemen tüm hücrelere girebilme kabiliyetleridir (Weiss,1982; Miller, 1995; Nabel,1993; McGrath,1978; Roemer ve Fridmann, 1992; Deminie ve Emerman, 1993). Gen aktarımında kullanılan vektörlerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Nonviral taşıyıcı vektörleri 5 grupta toplamak mümkündür: (i) lipozomlar, (ii) katyonik lipitler, ve (iii) polikatyonlar (iv) nano partikül ve mikro küreler (v) uyarı-cevap polimerleri. Bunlardan ilk ikisi yaygın olarak uygulanmıştır ve bunlarla ilgili

ayrıntılı bilgi ilgili literatürde bulunabilir (Lee ve Huang, 1997; Dash ve ark., 1997; Mahato ve ark., 1997). İlk non-viral gen tedavi klinik uygulaması 1992'de Nabel ve arkadaşları tarafından yapıldı. Bununla birlikte non-viral metodlar gen terapi uygulamalarının 20%'ni kapsamaktadır. Günümüzde, gen terapisinde, polikatyonlar ve uyarı-cevap polimerler gittikçe artan bir sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Dyer, 2000).

DNA uzun, esnek ve fosfat grupları nedeniyle fizyolojik koşularda negatif yüklü çift zincirli bir polinükleotiddir. Hücre çekirdeğinde pozitif yüklü histon proteinleri ve polikatyonlarla kompleks halde çok kompakt bir şekilde bulunur. Çıplak plazmid DNA veya oligonükleotidler kendi başına biyolojik membranları (endotelyum ,hücre zarı ve çekirdek zarı) geçemez. Tez çalışmasında hücreye aktarılmakta kullanılan plazmid DNA tipik olarak 10^3-10^5 baz çifti uzunluğunda, yaklaşık 10^6-10^7 molekül ağırlığında süper sarmal yapıda ve 100 nm den büyük çapa sahiptir. Zeta potansiyeli (yük ölçer) ile yüzey yükü ölçüldüğünde –20 ile –25 mV arasında değişmektedir ve yaklaşık boyutu 740 nm dir. Bu geniş boyut ve yüksek negatif yük nedeniyle plazmid DNA'nın tek başına hücre içine girmesi mümkün olmamaktadır. DNA direkt olarak dokuya enjekte edildiğinde kısa sürede nükleazlar tarafından yüksek oranda parçalanmaktadır. Bu yüzden aktarılan genin ekspresyonu terapötik etki yapacak miktarda olmamaktadır.

Ex vivo gen aktarımı çeşitli mekanik teknikler veya taşıyıcılar kullanılarak başarılabilmektedir. Çok sayıda mekaniksel teknik ex vivo terapide uygulaması araştırılmaktadır. Örneğin gen tabancası, hidrostatik basınç, elektroporasyon, infuzyon, sonikasyon gibi (Pagano, 1967; Neumann, 1982; Capecchi, 1980). Bu metodlar yüksek gen aktarımı sağlasa da pahalı ve her durum için geçerli değildir. Bu bilgiler ışığında polikatyonların DNA ile kompleksleştirilerek taşınması fikri ortaya çıkmıştır. Şekil 2.7'de polikatyon ile plazmid DNA'nın kondensazyon ile nasıl kompleks oluşturduğu şematize edilmiştir. Bu amaçla birçok doğal ve sentetik polikatyon (spermidin, kitosan, poliamino asitler, özellikle poli(L-lisin) (PLL), poli(4-vinilpiridin) (PVP), polidimetilaminoetilmetakrilat (poli-DMAEMA) ve kopolimerleri, polietilenimin (PEI), vb.) kullanılmıştır (Choi ve ark., 1999; Bielinska ve ark., 1997; Boussif ve ark., 1996; Erbacher, 1998; Ferrari ve ark., 1997; Smith ve ark., 1998; Hennink, 2001).



Şekil 2.7. Polikatyonik polimer ile plazmid DNA'nın kondanzesyonu

Katyonik lipitler ilk defa 1987 Felgner ve arkadaşları tarafından gen terapide kullanılmıştır. O zamandan beri çeşitli katyonik lipid sistemleri önerilmiştir. Bunlardan biri de lipofektindir (McLachalan, 1994; Gao, 1991; Farhood, 1995). Çeşitli katyonik lipitler ile plazmid DNA'nın in vivo akciğer, beyin, deriye lokal taşınmasında ve vaskülar endotel hücrelere gen aktarımında kullanılımı araştırılmaktadır. Bazı katyonik lipidler ise kanser ve sistik fibrozis gibi hastalıkların tedavisinde klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Lipozomal ve katyonik lipidler diğer taşıyıcılarla kıyaslandığında, çeşitli dezavantajları vardır : yüksek maliyet, in vivo uygulamalarda immün cevap oluşturması, tekrarlanan dozlarda toksik olması v.b. (Filion, 1998; Crook, 1996; Choi, 1999).

Polielektrolit komplekslerinin oluşmasının arkasındaki teori bir çok polikatyon için literatürde belirtilmektedir. Bu teori uygun koşulların seçilmesiyle bir takım organlara iletilen kompakt DNA komplekslerinin elde edilebildiğini ve gen taşınmasının gelişimi için yararlı bir temel oluşturulabildiğini göstermektedir. Ancak, gen terapisinde kullanılan bütün polimerler bu teoriye göre tanımlanabilmiş değildir.

Katyonik polimer komplekslerinin aktivitesini arttırabilmek için çeşitli modifikasyonlar yapılmasına rağmen, bunlar viral vektörler kadar aktif değildir. Bunu sağlayabilmek için bu sistemlerin mekanizmaları çok iyi anlaşılmalıdır.

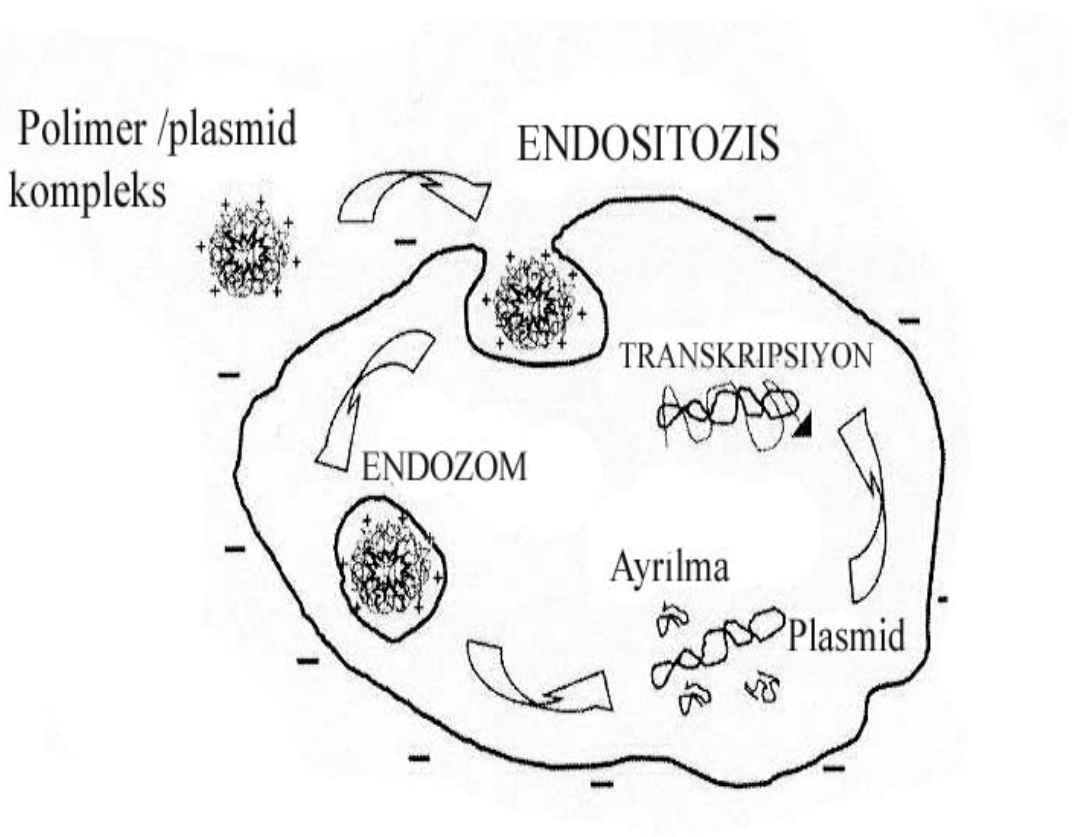
Katyonik polimerler genellikle protonlanabilir amin grupları taşırlar. Bu polimerlere poli(L-lisin) (PLL), poli(4-vinil piridin) (PVP), polidimetilaminoetilmetakrilat (poli-DMAEMA) ve kopolimerleri (PEG-PLL blok kopolimeri, PLL-g-dekstran), dietilamino etil-deksran (DMAE-dekstran), poli (amidoamin) (PAMAM) dendrimer, kitosan ve polietilen imin (PEI) örnek olarak verilebilir (Choi ve ark., 1999; Bielinska ve ark., 1997; Boussif ve ark., 1996; Erbacher, 1998; Ferrari ve ark., 1997; Smith ve ark., 1998; Hennink, 2001).

Bu polimerlerin nükleik asitlerle kompleks oluşumu ve gen aktarımı üzerinde çok değişik yapılara sahiptir. Fonksiyonel amin grupları polimerin modifiye edilmesinde (hedefleyici ligand veya floresan işaretlemede) kullanılmaktadır. Polimer ile plazmid DNA'nın kompleks oluşumu Şekil 2.6'da şematize edilmiştir. Katyonik polimerlerden PLL lineer zincirlere sahip iken PEI'nin bir kısmı ve PAMAM dendrimerleri dallanmış yan gruplar içerir. Amino grupların (primer, tersiyer, sekonder) sayısı ve pKa değerlerindeki farklılık polikatyonlara farklı özellikler katmaktadır. PLL sahip olduğu amin grupları pKa değeri 9-10 da protonlanabilmektedir. Bu da bize fizyolojik pH'da protonlanabildiğini göstermektedir. Diğer polikatyonların pKa değerleri genellikle asidik pH'da dır. PEI primer amin gruplarının pKa'sı 5.5; PAMAM dentrimerinin 3.6-6.9 ; kitosanın pKa sı 6.5 dir. Bu yüzden pH 7.4' de bunlar kısmi olarak protonlanabilirler (Maruyama ve ark., 1997; Lim, 2000; Erbacher, 1999). pKa değerine bağlı olarak polimerin protonlanabilmesi önemli bir özelliktir. Plazmid DNA'nın hücre içine endositoz yolu ile alınmasında ve endozom içinde düşük pH değerinden polimerin protonlanarak plazmidin endozomdan kurtulmasını sağlar (Boussif, 1995; Cho, 2003 ; Kyriakides, 2000, 2002, Schafer, 2000). Polikatyonun türüne, özelliklerine ve polikatyon/plazmid DNA oranına göre oluşan kompleksin (konjugatın) şekli (torid, küresel veya şekilsiz), boyutları (20nm-1μm) ve kompleks yükü (-40 ile +50) farklı olabilmektedir. Kompleks üzerinde açıkta kalan pozitif gruplar negatif yüklü hücre membranı ile elektrostatik olarak etkileşir. Hücre membranına bağlanan kompleks endositoz ile hücre içerisine alınır. Komplekslerin hücre içine alınması Şekli 2.8'de şematize edilmiştir. Lizozomlar endozomlar ile birleşir ve nükleazları endozoma boşaltırlar. Polikatyonlar DNA'nın etrafını sardığı için nükleazların etkisinden DNA'yı korur. Endozom pH'sı düşük olduğundan protonlanır ve pozitif yük kazanır. Pozitif yüklü polimer endozomun lipid membranına saldırarak ve endozom

içerisine su çekerek endozomun patlamasına ve plazmid DNA'nın sitoplazmaya salınmasını sağlarlar. Plazmid DNA sitoplazmadan çekirdek bölgesine giderek, RNA polimeraz enziminin faaliyeti ile terapötik etki yapacak proteinin ekspresyonunu sağlar. Fakat plazmid DNA nın endozomdan kurtulduktan sonraki aşamalarda hala açıklanamayan belirsizlikler vardır. Sitoplazmada polimer plazmid ten ayrılıyor mu yoksa birlikte çekirdeğe mi gidiyorlar, bununla ilgili çelişkili açıklamalar mevcuttur (Pichon, 2000; Pollard, 1998; Zanta, 1999).

Çizelge 2.7. Gen aktarımında kullanılan vektörlerin avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
	Virüsler
1. Bir çok hücreyi transfekte edebilir	1. Gen taşıma kapasitesi düşük(7,8 kb)
2. Girdiği hücrenin DNA'sına stabil intekrasyon sağlar	2. Yalnız bölünebilen hücrelere girebilir
3. İnvitro ortamda yüksek transfeksiyon	3. İnvivo ortamda düşük transfeksiyon
4. Biyolojisi iyi biliniyor	4. Saflaştırması zor
	5.İntegrasyon bölgesi spesifik değil
	6.Transfeksiyon işlemi zor
	7.İmmün reaksiyon oluşturabilir
	Direkt injeksiyon
1. Uygulaması kolay	1. Gen epizomal bölgede kalabilir
2. Aşılamada kullanılabilir	2. Çok düşük transfeksiyon
3. Limitsiz gen taşıma kapasitesi	3. Sadece kas dokusu transfeksiyonu
	Fiziksel Yöntemler
1. Yüksek gen transfeksiyonu	1. Sadece invitro uygulanabilir
2. Uygulanması kolay	2. Çok sayıda hücre ölümü olması
3. Gen aktarma kapasitesi yüksek	
	Katyonik Polimer ve Liposomlar
1. Gen taşıma kapasitesi yüksek	1. Düşük Gen ekspresyonu
2. Hazırlanışı ve uygulaması kolay	2. Toksik olabilir
3. İmmunojenik değil	3. Gen ekspresyonu süresi kısa
4. İstenilen özelliklerde üretilebilir	4. Gen epizomal bölgede kalabilir
5. Maliyeti düşük	5. Kan proteinleri ile etkileşebilir



Şekil 2.7. Polimer/plazmid kompleksinin hücre içine girişi ve transkripsiyonu

Polikatyonların boyut olarak büyük plazmid DNA'yı kondense etmesi (küçük boyuta çekmesi) istenir. Fakat doğal polikatyonlar: polivinilalkol (PVA), polivinilpirolidon (PVP) v.b. plazmid DNA'yı kondense etme yeteneğine sahip değildir. Bununla birlikte DNA'yı nükleazlardan koruyabilirler. Bu polimerler hidrofobik ve hidrofilik gruplara sahiptirler. Hücre içine plazmid DNA'nın aktarılmasını hidrofobik etkileşimle sağlarlar (Pouton, 1998; Kircheis, 1999; Ogris, 1999; Ferrari, 1999; Fischer, 1999; Takai, 1990).

Bunların dışında polisiyanoakrilat bazlı, poli(D,L-laktikasit), poli(D,L-laktikasit-ko-glikolikasit), jelatin, aljinat ve kitosandan yapılan nano veya mikropartiküllerin plazmid DNA'yı adsorblayarak ve enkapsüle ederek gen terapide kullanıldığı araştırmalar devam etmektedir (Mahato ve ark., 1997; Wagner, 1991; Guo, 1989; Li, 2000). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda araştırmacılar plazmid DNA'yı lipid-bazlı partiküller içine enkapsüle etmeyi başarmışlardır. Wheeler ve ark.

Deterjan dializ prosedürünü kullanarak kararlı plazmid-lipid partikülleri (70 nm boyutunda) hazırlama yöntemlerini açıklamışlardır (Wheele ve ark., 1999). Lipid içine plazmid DNA'nın enkapsüle edilmesiyle plazmid'in serum nükleazlar tarafından parçalanması önlenmiş olur. Bailey ve Sullivan plazmid DNA'nın nötral lipozomlara enkapsüle edilmesine çalışmışlardır (Bailey ve Sullivan, 2000). Lipoproteinler veya lipidler ve alipoproteinlerden oluşan emülsiyon partiküller ile ilgili çalışmalar Hara ve ark. tarafından yapılmıştır (Usui ve ark, 2002). Bu grup doğal emülsiyonların hidrofobik iç kısmında DNA'nın çözünebilmesi avantajını kullanmışlar ve yaklaşık 100 nm çapında partikülleri gen transferinde kullanmışlardır. Chesnoy ve grubu plazmid DNA enkapsüle edilmiş katyonik emülsiyonların PEG ile kaplanarak daha kararlı yapı oluşturduğunu ve bunların istenilen bölgelere yollanmasında artış olduğunu rapor etmiştir (Chesnoy ve ark., 2001). PLL ile kompleks oluşturan DNA'nın nükleazlar ile degredasyondan korunduğu gösterilmiştir (Dash ve ark., 1997). Yapılan çalışmada DNA-PLL kompleksinin kısmen degrede olduğu, ancak DNA-PEG-PLL komplekslerinin bozunmadan korunduğu anlatılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez kapsamının ilk bölümünde nanoboyutlu partikül üretimine yönelik çalışmalar yapılmıştır. İlk olarak üzerinde fonksiyonel grup taşımayan yalnızca yüksek miktarda katyonik yük taşıyan nano boyutlu polimer partikülleri yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Mikroemülsiyon boyut aralığında oldukça kararlı lateksler elde edilmiştir. Burada ana monomer, katyonik monomer, stabilizör amaçlı kullanılan monomer, dağıtma ortamı ve başlatıcı miktarlarının partikül boy ve boy dağılımlarına olan etkileri incelenmiştir. Bunların dışında reaksiyon sıcaklığının, reaksiyon zamanının, iyonik gücün ve ortam pH'ının partiküllere olan etkileri araştırılmıştır. Ayrıca ana monomer olan stiren yerine metil metakrilat kullanılarak bu monomerin lateks kararlılığına ve partikül boy/boy dağılımına olan etkileri incelenmiştir. Bu kısımda yapılan optimizasyon sonucu seçilen en küçük boyutlu partikül reçetesi çalışmanın geri kalan kısmında kullanılmıştır. Seçilen bu reçetede stabilizatör olarak kullanılan monomerin fonksiyonel grup taşıyan bir başka stabilizör ile değiştirilmesi sonucu yine nano boyutlu katyonik yük taşıyan ve aynı zamanda yüzeyinde fonksiyonel gruba sahip kararlı partiküller sentezlenmiştir. Burada stabilizör miktarının partikül boy ve boy dağılımına olan etkisi incelenmiştir. Ürünler Zeta Sizer, Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (NMR), Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR), Elementel Analiz, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), Jel Geçirgenlik Kromotogrofisi (GPC), Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), viskozimetri gibi yöntemlerle karakterize edilmiştir. Çalışmanın devamında plazmid DNA ayırmasında (biyoayırma amacıyla) daha etkin olduğu düşünüldüğü için sentezlenen bu partiküllere manyetik özellik kazandırılmıştır. Bu amaçla daha önce bir yüksek lisans tezi kapsamında sentezlenen nano boyutlu manyetit parçacıkları bir önceki kısımda anlatılan polimerler ile yine yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak kaplanmıştır. Yine üzerinde fonksiyonel grup içeren ve içermeyen olmak üzere iki çeşit manyetik özellik taşıyan katyonik nanopartikül sentezlenmiştir. Partikül karakterizasyonu Zeta Sizer, FTIR, Elektron Spin Rezonans (ESR) gibi yöntemlerle yapılmıştır.

İkinci kısım çalışmada nanopartikül-nükleik asit etkileşimi incelenmiştir. Burada fonksiyonel grup içeren ve içermeyen en küçük boyutlu nanopartiküller kullanılmıştır. DNA etkileşimine yönelik optimizasyon çalışmasında önce genomik DNA kullanılmıştır. Değişik tampon çözeltileri (farklı pH'larda) içinde partikül ve DNA etkileştirilerek DNA bağlanma miktarı spektrofotometrik olarak bulunmuştur. Partikül-DNA konjugatlarının boy/boy dağılımları ve yükü Zeta Sizer ile karakterize edilmiştir. Daha sonra fizyolojik pH'da plazmid DNA partikül etkileşimi incelenmiştir. Bunun içinde hem fonksiyonel grup içeren hem de fonksiyonel grup içermeyen iki farklı boyutta (70 nm ve 200 nm civarında) nanopartiküller GFP (yeşil floresan protein) plazmid ile etkileştirilmiştir. Oluşan konjugatların boy/boy dağılımları ve yükleri Zeta Sizer ile belirlenmiştir. AFM kullanılarak konjugatlar görüntülenmiştir. Konjugatların yüksek pozitif yük değerleri nedeniyle gen transferi çalışmalarında uygun bir taşıyıcı olduğu düşünülmüştür. Hazırlanan bu konjugatlar hücre kültür laboratuvarında HeLa hücrelerinin (insan serviks karsinoma hücreleri) transfeksiyonu için kullanılmıştır. Partiküllerin HeLa serviks karsinoma hücre kültüründe toksik etkileri, hücre içine gen aktarım yetenekleri ve GFP protein sentez (model gen) yetenekleri araştırılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan ana monomerler stiren (St) Sigma (ABD), metil metakrilat (MMA) Fluka (İsviçre) firmalarındandan temin edilmiştir ve kullanılmadan önce distile edilmiştir. Katyonik komonomer N-[3-(dimetil amino) propil] metakrilamid (DMAPM) ve stabilizörler poli(etilenglikol) etil eter metakrilat (PEG-EEM)(n=3) ve poli(etilenglikol) metakrilat (PEG-MA)(n=5) Sigma (ABD) firmasından, katyonik başlatıcı 2,2'-azobis (2-metil propion amidin) dihidroklorür (V-50) Aldrich (ABD) firmasından satın alındığı gibi kullanılmıştır. Dağıtma ortamı ise distile sudur.

Adsorpsiyon deneylerinde kullanılan deoksiribonükleik asit (Ringa balığı testisinden elde edilen DNA) Sigma (ABD) firmasından temin edilmiştir. Transfeksiyon deneylerinde kullanılan polimerin ve plazmid DNA'nın floresan işaretlenmesinde kullanılan florosein Aldrich (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücreye aktarmakta ve gen ekspresyonunun (protein sentezinin) gösterilmesinde model gen olarak kullanılan yeşil protein (GFP) geni taşıyan PEGFP-N3 (Colontech, ABD) plazmidi *E.Coli*'de üretilmiş ve Qiagen Inc. (Almanya) tarafından

temin edilen saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır. Metiltiazololetetrazolyum ve diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma (ABD) firmasından satın alınmış ve olduğu gibi kullanılmıştır. İn vitro çalışmalarda kullanılan serviks epitelial karsinoma hücreleri (HeLa) Şap Enstitüsü doku kültür kolleksiyonundan (Türkiye) satın alınma yolu ile temin edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılmak üzere Tripsin-EDTA, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM F-12) besi yeri, penisilin-streptomisin antibiotik, fetal buzağı serumu (FCS), ve sodyum klorür (NaCl) Biological industries (İsrail) firmasından satın alma yolu ile temin edilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan kültür kapları ve diğer sarf maddeleri Corning (ABD) firmasından satın alma yolu ile temin edilmiştir.

3.2. Katyonik Nanopartikül Üretimi

Polimerizasyonlar su içinde yağ (o/w) sisteminde yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polmerizasyonu yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Mikroemülsiyon boyutlarında, üzerlerinde yüksek miktarda katyonik yük bulunan partiküllerin oluşturduğu oldukça kararlı lateksler elde edilmiştir.

3.2.1. Fonksiyonel Grup İçermeyen Nanopartikül

Bu grup deneylerde kullanılan reçeteler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Stiren, DMAPM, PEG-EEM ve V-50 100 ml hacminde sızdırmaz cam reaktör içinde yer alan distile suya eklenmiştir. Daha sonra bu karışım bir sonikatör (Bransonic 221, ABD) yardımıyla iyice dağıtılmıştır. Ortam pH'sı 0.1 N'lik standart hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2.5-3'e ayarlanmıştır. Polimerizasyon öncesi reaktörden su fazındaki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla 5 dk süreyle saf azot gazı geçirilmiştir. Polimerizasyonları 65˚C'de, sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda (Köttermann Laborteknik, Almanya) 70 vuru/dk hızda çalkalanan reaktörlerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Polimerizasyon süresi yaklaşık 24 saattir.

Polimerizasyon sonrası elde edilen lateksler ortamda bulunan reaksiyona girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla metanol ve su ile yıkanmıştır.

Şekil 3.1. Nanopartikül üretiminde kullanılan deney düzeneği.

20 000 devir/dk'da çalıştırılan santrifüj yardımıyla çöktürüldükten sonra tekrar su içerisinde dağıtılmıştır. Yıkama işlemi en az üç kez tekrarlanmıştır.

Bu grup çalışmalarda ana monomer, katyonik komonomer, stabilizör, başlatıcı ve dağıtma ortamı (su) miktarı, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon zamanı, iyonik güç, ortam pH'ı gibi parametrelerin partikül boy/boy dağılımına ve yüzey yüküne etkileri incelenmiştir.

Çizelge 3.1. Polimerizasyon reçeteleri.

Örnek	Su(ml)	Stiren(ml)	DMAPM(ml)	PEG-EEM(ml)	V-50(gr)
EEM 1	50	**1.25**	0.1	0.1	0.03
EEM 2	50	**2.5**	0.1	0.1	0.03
EEM 3	50	**5.0**	0.1	0.1	0.03
EEM 4	50	1.25	**0**	0.1	0.03
EEM 5	50	1.25	**0.3**	0.1	0.03
EEM 6	50	1.25	**0.6**	0.1	0.03
EEM 7	50	1.25	0.1	**0.1**	0.03
EEM 8	50	1.25	0.1	**0.2**	0.03
EEM 9	50	1.25	0.1	**0.4**	0.03
EEM 10	50	1.25	0.1	**0.6**	0.03
EEM 11	50	1.25	0.1	0.1	**0.03**
EEM 12	50	1.25	0.1	0.1	**0.06**
EEM 13	50	1.25	0.1	0.1	**0.12**
EEM 14	**50**	1.25	0.1	0.1	0.03
EEM 15	**75**	1.25	0.1	0.1	0.03
EEM 16	**100**	1.25	0.1	0.1	0.03
EEM 17	**120**	1.25	0.1	0.1	0.03
EEM 18	**140**	1.25	0.1	0.1	0.03
EEM 19	**160**	1.25	0.1	0.1	0.03
EEM 20	**200**	1.25	0.1	0.1	0.03

Bir başka çalışmada stiren yerine MMA ana monomer olarak kullanılmıştır. Deneylerde su, MMA, DMAPM, PEG-EEM ve V-50 miktarları sırasıyla 50 ml, 1.16 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g olarak alınmıştır. Polimerizasyonlar 100 ml sızdırmaz cam reaktörlerde yapılmıştır. Polimerizasyonlar 65˚C'de sabit sıcaklıkta, 70 vuru/dk hızda çalkalanan sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda

gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon süresi yaklaşık 24 saattir. Polimerizasyon reçeteleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MMA kullanılarak üretilen nanopartiküllere ait reçeteler.

Örnek	Su(ml)	MMA(ml)	DMAPM(ml)	PEG-EEM(ml)	V-50(gr)
MMA1	50	1.16	0	0.1	0.03
MMA2	50	1.16	0.1	0.1	0.03
MMA3	50	1.16	0.3	0.1	0.03
MMA4	50	1.16	0.6	0.1	0.03
MMA5	50	1.16	0.1	0.2	0.03
MMA6	50	1.16	0.1	0.4	0.03
MMA7	120	1.16	0.1	0.1	0.03
MMA8	50	4.64	0.1	0.1	0.03
MMA9	50	1.16	0.1	0.1	0.01

Bu çalışmada ana monomer (MMA), katyonik komonomer (DMAPM), stabilizör (PEG-EEM), başlatıcı (V-50) ve dağıtma ortamı (su) miktarının partikül boy/boy dağılımına ve yüzey yüküne etkileri incelenmiştir.

3.2.2. Fonksiyonel Grup İçeren Nanopartikül

Bir önceki bölümde reaksiyon şartları optimize edildikten sonra en küçük boy ve boy dağılımını veren reçete çalışmanın geri kalan kısmında kullanılmıştır. Burada elde edilen partiküle yüzey fonksiyonel grubu kazandırmak amacıyla stabilizör olarak kullanılan PEG-EEM yerine PEG-MA kullanılmıştır. PEG-MA içerdiği hidroksil gruplarıyla daha sonraki uygulamalarda kullanılmak üzere partiküle fonksiyonel grup sağlamıştır. St, DMAPM, PEG-MA, ve V-50 100 ml hacminde sızdırmaz cam reaktör içinde yer alan distile suya eklenmiştir. Daha sonra bu karışım bir sonikatör (Bransonic 221, ABD) yardımıyla iyice dağıtılmıştır. Ortam pH'sı 0.1 N'lik standart hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2.5-3'e ayarlanmıştır. Polimerizasyon öncesi reaktörden su fazındaki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla 1 dk süreyle saf azot gazı geçirilmiştir. Polimerizasyonları 65˚C'de, sıcaklık kontrollü çalkalayıcı su banyosunda (Köttermann Laborteknik, Almanya)

70 vuru/dk hızda çalkalanan reaktörlerde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Polimerizasyon süresi yaklaşık 24 saattir.

Polimerizasyon sonrası elde edilen lateks ortamda bulunan reaksiyona girmemiş monomerlerden uzaklaştırmak için sırasıyla metanol ve su ile yıkanmıştır. 20 000 devir/dk'da çalıştırılan santrifüj yardımıyla çöktürülmüştür. Bu yıkama işlemi en az üç kez tekrarlanmıştır.

Bu grup çalışmalarda ana monomer, katyonik komonomer, başlatıcı, dağıtma ortamı (su) miktarı ve ortam pH'ı bir önceki bölümde optimize edilen miktarlarda sabit tutulmuş fakat yalnızca kullanılan stabilizörün (PEG-MA) miktarı 0.1-0.4 ml aralığında değiştirilerek partikül boy/boy dağılımına ve yüzey yüküne etkisi incelenmiştir (Çizelge 3.3). Reaksiyon sıcaklığı ve zamanı da ayrıca optimize edilmiştir.

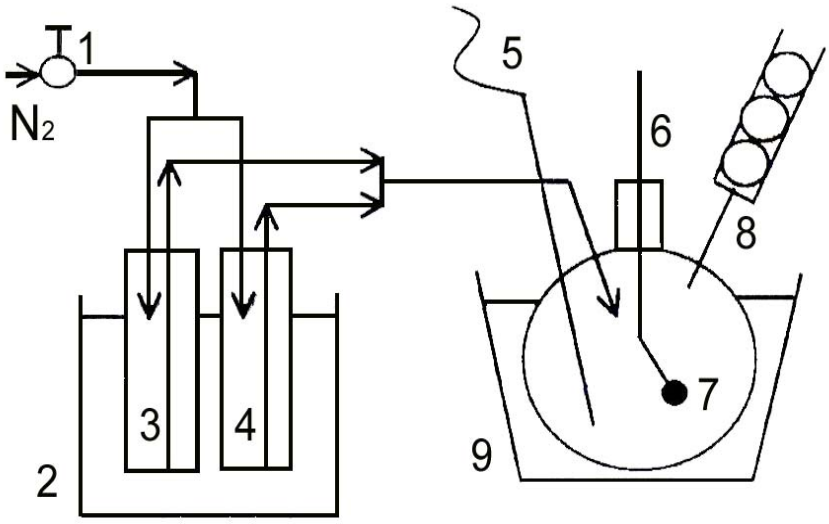
Çizelge 3.3. PEG-MA içeren terpolimere ait yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu reçetesi.

Örnek	Su(ml)	Stiren(ml)	DMAPM(ml)	PEG-MA(ml)	V-50(gr)
MA 1	120	1.25	0.1	0.1	0.03
MA 2	120	1.25	0.1	0.2	0.03
MA 3	120	1.25	0.1	0.4	0.03

3.2.3. Manyetit Nanopartikül Sentezi

Grubumuzda daha önce yapılan bir çalışmada manyetik özelliklere sahip nanoboyutlu çekirdek parçacıkların üretimi için "sol-jel", "mikroemülsiyon" ve "ikili çöktürme" gibi alternatif yöntemler denenmiş ve $CoFe_2O_4$, $BaFe_{12}O_{19}$, Fe_3O_4 gibi çeşitli manyetik partiküller sentezlenmiştir. Bu ön çalışmalarda en başarılı yöntem "ikili çöktürme" yöntemi olmuş ve bu yöntemle manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin üretiminin başarıyla yapılabileceğine karar verilmiştir. Manyetit nanopartiküllerin üretiminde Sigma (ABD)'den temin edilen $FeCl_2.4H_2O$ ve $FeCl_3.6H_2O$ reaktif tuzlar ve NaOH çöktürme ajanı olarak kullanılmıştır. Fe^{2+} tuzları kararsız olduğu ve havada renk değişimi ile gözlenen "akaganeite" (β-FeOOH) yapısına

oksitlendiği bilinmektedir. Reaktiflerin saflığı manyetit oluşumunda önemli bir parametre olduğu için reaktifler azot altında depolanmış, hazırlanmış çözeltilerin kullanılmadan önce bu kararsızlıklarını önlemek için çözeltilerin oksijeni giderilmiştir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının oksidasyonunu ve yan reaksiyonların oluşumunu önlemek için reaksiyonlar azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Manyetit üretiminde kullanılan deney düzeneği. (1) Vana, (2) Su Banyosu, (3) Demir Çözeltisi, (4) NaOH Çözeltisi, (5) Termometre, (6) Reaktör, (7) Mekanik Karıştırıcı, (8) Geri Soğutucu ve (9) Elektrikli Isıtıcı.

Şekil 3.2'de şematik olarak verilen deney düzeneğinde nanopartiküllerin üretimi için izlenen yöntem şöyledir: Reaksiyonlar dört boyunlu bir reaktörde geri soğutucu altında, mekanik karıştırıcı ve su banyosu kullanılarak, azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Tipik bir reaksiyonda, 80˚C'deki 160 ml deionize su içine yüksek karıştırma hızında 120 ml 1.25 M Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuz çözeltisi ile 120 ml 5M NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyonun hemen başında siyah bir çökelek oluşumu gözlenmiştir. Bu çözelti 80˚C'de 2 saat çok yüksek karıştırma hızında karıştırılmıştır. Manyetik ayırıcı (MCB 1200 Biomagnetic Processing Platform, Sigris, İngiltere) yardımıyla manyetik olan partiküllerle olmayan partiküller birbirinden ayrıldıktan sonra birkaç defa su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Manyetit nanopartikülleri manyetik çekim kuvvetleri nedeniyle

topaklanmaktadır. Bunun önüne geçilmek üzere 1M'lık tetrametilamonyum hidroksit (TMAOH, Sigma, ABD) çözeltisinden 10 ml ilave edilerek, pozitif yüklü $N(CH_3)_4^+$ iyonları ile manyetit nanopartiküllerinin stabilizasyonu başarılmıştır. Fe^{2+}/Fe^{3+} mol oranı 0.5-2 aralığında, pH 3-12 aralığında, sıcaklık 25º-80ºC aralığında, karıştırma hızı 1000-3000 rpm aralığında, NaOH derişimi 2.5-10 M aralığında değiştirilerek optimizasyon çalışması yapılmıştır.

3.2.4. Fonksiyonel Grup İçeren ve İçermeyen Manyetik Nanopartikül Üretimi

Fonksiyonel grup içeren yada içermeyen manyetik yüklü polimerik nanopartiküllerin elde edilmesi amacıyla bu grup çalışmalarda önceki bölümde yapılan çalışmalarda üretilmiş olan suda süspanse edilmiş yaklaşık 70 ve 130 nm boyutundaki manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülleri kullanılmıştır. Polimerizasyon çalışmaları 100 ml hacimde sızdırmaz cam reaktörlerde yürütülmüştür. Manyetit nanopartiküller bir sonikatör (Bransonic 221, ABD) yardımıyla distile su içerisinde süspanse edilmiştir. Manyetit miktarı polimerizasyonlarda kullanılacak olan suya göre ağırlıkça %1 olarak seçilmiştir.

1.25 ml St, 0.1 ml DMAPM katyonik komonomer, 0.1 ml PEG-EEM yada PEG-MA fonksiyonel grup içermeyen ve içeren stabilizatörler, ve 0.03 gr V-50 katyonik başlatıcı olarak süspanse edilmiş olan bu manyetit içerisine eklenmiştir. Ortam pH'sı 0.1 N'lik standart hidroklorik asit çözeltisi yardımıyla 2.5-3'e ayarlanmıştır. Polimerizasyon öncesi reaktörden su fazındaki çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak amacıyla 5 dk süreyle saf azot gazı geçirilmiştir. Polimerizasyonları 65˚C'de, sıcaklık kontrollü çalkalamalı su banyosunda (Köttermann Laborteknik, Almanya) 70 vuru/dk hızda çalkalanan reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon süresi yaklaşık 24 saattir.

Polimerizasyon sonrası elde edilen lateksler, ortamda bulunan reaksiyona girmemiş monomerlerin uzaklaştırılması amacıyla sırasıyla metanol ve su ile yıkanmıştır. 20 000 devir/dk'da çalıştırılan santrifüj yardımıyla çöktürülen manyetik yüklü polimerik nanopartiküller manyetik ayırıcı yardımıyla manyetik yüklü olmayanlardan ayrılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Daha sonra polimerle kaplanmamış olan manyetit nanopartikülleri ile kaplanmış olanları ayırmak için 0.01 N'deki H_2SO_4 çözeltisi ile karıştırılarak 48 saat bekletilmiştir.

Manyetit nanopartikülleri 0.01 N'deki H_2SO_4 çözeltisinde çözünürken polimerle kaplı olan nanopartiküllerde hiçbir değişiklik olmamıştır. Süpernatant kısmında çözünmüş manyetit nanopartiküllerin olması nedeniyle çöken kısımdan ayrılarak polimerle kaplı manyetik nanopartiküller tekrar su ile yıkama işlemine tabii tutulmuştur.

3.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. Partikül Boy ve Boy Dağılımı

Hazırlanan tüm nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Cihaz ölçüm yöntemi olarak Dinamik Işık Saçılması (DLS) kullanmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası yıkanıp, santrifüjlenen partiküller distile su kullanılarak seyreltilmiş ve yaklaşık 3 ml hacimli örnek çözeltisi polistiren küvet içerisine konulmuştur. Deneyler, sıcaklık kontrollü bir bölme içerisine yerleştirilen polistiren küvetin içersindeki çözeltiden 633 nm'lik kırmızı lazer ışığının geçirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Örnek içersinden geçirilen lazer ışığından saçılan ışık 90° 'ye yerleştirilen detektör tarafından ölçülmüştür. Dedektörde ölçülen ışık şiddeti, elektronik sinyallere dönüştürülüp korelatöre gelmektedir. Korelatörde küçük zaman aralıklarında saçılan ışık şiddeti değerleri karşılaştırılır ve ışık şiddetinin değişim hızı belirlenmektedir. Saçılan ışığın şiddetindeki değişimler, çalışılan bölgenin içinde ve dışındaki moleküllerin difüzyon hızıyla ilgilidir (Brownian hareketi) ve analiz edilen veriler direkt olarak ışık saçılmasına neden olan partiküllerin difüzyon katsayılarını vermektedir. Difüzyon ile partikül büyüklüğü arasındaki ilişki, küresel partiküller için Einstein tarafından geliştirilen ve Brownian hareketi ile açıklanan teorik denklikle açıklanmaktadır. Bu denklikten, küresel partiküllere ait difüzyon katsayıları fonksiyonlaştırılıp, hidrodinamik çap hesaplanmaktadır.

Partikül boy ve boy dağılımının ölçülmesinde kullanılan cihaz, partikülerin zeta potansiyellerini de vermektedir. Partikül yüzeyinden belli bir uzaklıkta bulunan iyonlar hareket eden partikül ile birlikte sürüklenmemektedir. Bu uzaklığa kayma düzlemi denilmekte bu aralıkta ölçülen elektrik potansiyeli zeta potansiyeli olarak

tanımlanmaktadır. Cihaz mikroelektroforez tekniğini kullanarak zeta potansiyeli ölçmektedir. Bu teknik bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızı elektroforetik hareket olarak adlandırılmakta ve aşağıdaki eşitlikle ifade edilmektedir.

$$\mu_e = V / E \qquad (3.1)$$

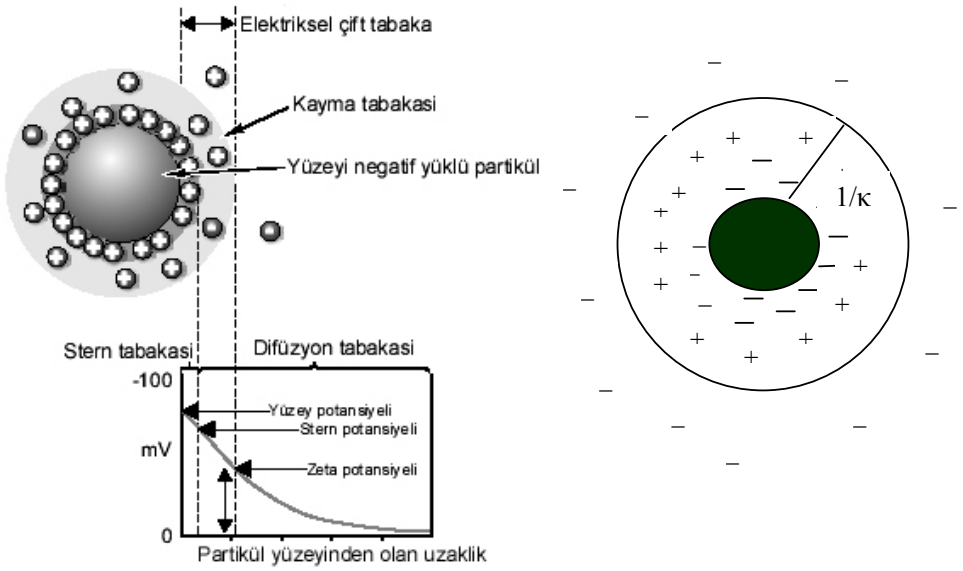
Burada E : uygulanan elektrik alan (Volt/cm);

V : ölçülen hız (cm/s);

μ_e : elektroforetik hareketlilik (cm^2/Volt.s).

Yüklü durgun bir katı ile temasta olan sıvı uygulanan elektrik alan nedeniyle hareket eder ve bu hareket elektro-osmoz olarak tanımlanmaktadır. Cihazda bulunan hücre içerisindeki cam duvarların negatif yüklü olması nedeniyle hücre içerisinde böyle bir hareket oluşmaktadır. Hücre içerisinde elektro-osmotik çözücü akışının sıfır olduğu noktada partikülün hızı ölçülmelidir. Bu noktaya durgun tabaka denilmektedir. Cihaz iki lazer ışığının kesiştiği durgun tabakadaki küçük bir hacimdeki elektrik alanı nedeniyle hareket eden partiküllerin hızını ölçmektedir. Bu hacim içindeki partiküllerden saçılan ışık partikülün hızına bağlı olarak zamanla salınım oluşturmaktadır. Saçılan ışık şiddetinin değişim hızı verileri korelatörde elektroforetik hıza ve zeta potansiyele dönüştürülmektedir. Cihaz ölçtüğü birim elektrik alanındaki partikül hızından aşağıda verilen Henry eşitliğini kullanarak ölçmek istediğimiz zeta potansiyel değerini hesaplamaktadır.

$$\mu_e = (2\varepsilon\zeta / 3\eta) \cdot f(\kappa a) \qquad (3.2)$$



Burada ζ : Zeta Potansiyeli (mV);

η : Viskozite (cP);

$f(\kappa a)$: Henry fonksiyonu (polar olmayan ortamlarda bulunan partikül dispersiyonları için "Huckel yaklaşımını" kullanarak 1.5, polar ortamlardaki partiküller için "Smoluchowski yaklaşımı" ile 1.0 değerini alır);

κ^{-1} : Elektriksel çift tabakanın kalınlığı (cm);

a : Partikül yarıçapı (cm);

κa : partikül yapının elektriksel çift tabaka kalınlığına oranını ölçer;

ε : Sıvının elektriksel geçirgenliği.

Partiküllerin yüzey yüklerini ölçmek ve zeta potansiyeli değerleri ile kıyaslama yapmak için latekslerin iletkenlikleri 'Conductivity Meter' (Model 4052, ABD) ile ölçülmüştür. Cihazın çalışma aralığı 0.01-1000 $\pm$ 0.5% μS'dir.

Nanopartiküller atomik kuvvet mikroskobu (Quesant Instruments, Q-Scope 350, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir. Yıkanmış örnekler mika üzerine damlatılarak azot atmosferinde kurutulmuştur. Mika üzerindeki örnekler 5X5 ile 40X40 μm'leri arasındaki alanların taranmasıyla, "Temassız" modda elde edilmiştir.

Fonksiyonel grup içeren nanopartikülleri görüntülemek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Leica Cambridge S360, ABD) kullanılmıştır.

3.3.2. Yapı Analizi

Nanopartiküllerin kimyasal yapısı ve kompozisyonları Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR, Schimadzu, DR 8101, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenmiş olan partiküller vakum etüvünde kurutulduktan sonra KBr ile (ağırlıkça %10 olacak şekilde) karıştırılarak disk haline getirilmiş ve FTIR spekturumları oda sıcaklığında alınmıştır.

Kimyasal yapının ve bileşenlerinin (kompozisyonların) belirlenmesi için ayrıca Nükleer Manyetik Rezonans spektrometresi (^{1}H-NMR, Bruker Spectrospin Avance Ultrashield, Almanya-İsveç) kullanılmıştır. Yıkanmış partiküller vakum etüvünde kurutulduktan sonra $CDCl_3$ içinde çözünmüş ve oda sıcaklığında 400 MHz'de spektrumlar alınmıştır. Spektrumlar 1-14 ppm arasında tarama yapılarak oluşturulmuştur.

Sentezlenen polimerin C, N ve H içeriğini bulmak amacıyla Elementel Analizi yapılmıştır. Elementel analizlerin belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Partiküller (1.0 mg) elementel analiz cihazının (Leco, CHNS – 932, ABD) alüminyum örnek hücresine yerleştirilerek $\pm$ 0,0001 g duyarlılıkla tartılmıştır. Örnek cihaza konularak yakma işlemi sonucunda örneğin % karbon (C), hidrojen (H) ve azot (N) analizi yapılmıştır.

3.3.3. Isıl Davranış

Nanopartiküllerin ısıl özelliklerinin belirlenmesi amacıyla bir Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC, Schimadzu DSC-50, Japonya) kullanılmıştır. Ölçüm için yaklaşık 8-10 mg polimer alüminyum kapsüle konularak preslenmiştir. DSC termogramları 10˚C/dak ısıtma hızıyla 20-500˚C sıcaklık aralığında ve 100ml/dak akış hızıyla beslenen azot atmosferinde çekilmiştir.

3.3.4. Reaksiyon Verimi

Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu için toplam monomer dönüşümü gravimetrik yöntemle tayin edilmiştir. Polimerizasyon süresinin

tamamlanması ile birlikte oda sıcaklığına soğutulan lateksten alınan yaklaşık 1 ml örnek 24 saat süreyle 40°C'de vakumlu etüvde kurutulmaktadır. Sabit tartıma gelen örneğin ağırlığı kaydedilmektedir. Lateks örneği için toplam monomer dönüşümü (% ağırlık) aşağıdaki ifade yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Dönüşüm}(\%) = (m_{\text{Polimer}} / \sum m_{\text{Monomer}}) \times 100 \qquad (3.3)$$

Burada $m_{Polimer}$: kurutma işlemi sonrasında elde edile polimerin ağırlığı(g); $\sum m_{Monomer}$: polimerizasyon öncesi ortamdaki toplam monomer ağırlığıdır(g).

3.3.5. Molekül Ağırlığı

Tez kapsamında sentezlenen kopolimerin ortalama molekül ağırlıkları viskozimetrik yöntem kullanılarak bulunmuştur. Bunun için bir Ubbelohde kapiler viskozimetresi (Schott, Kapiler, Almanya) kullanılmıştır. Sabit sıcaklık banyosunda, 25±5°C'de gerçekleştirilen ölçümlerde izlenen yöntem şu şekildedir: ölçümlerde önce viskozimetre haznesine 15 ml saf kloroform doldurulmuş, kapillerden akışı sağlanmış ve akış süresi ''t_o'' elektronik olarak ölçülmüştür. Bu ölçüm üç kere tekrarlanarak ortalaması ''t'' olarak değerlendirmelere alınmıştır. Daha sonra farklı konsantrasyonlarda 15 ml polimer çözeltisi Sartorius 0.45 μm'lik poliamid membran ile filtre edildikten sonra viskozimetre haznesine konmuş, kapilerden akış sağlanmış, akış süreleri ''t_n'' aynı şekilde üç kere ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır. Bu ölçümler 0.25, 0.5, 0.75 ve 1g/dl polimer çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Polimer çözeltileri için ölçülen akış süreleri, ''t'' değerleri, saf çözücünün akış süresi olan ''t_o''a bölünmüş, bulunan değerlerin doğal logaritması alınarak konsantrasyona bölünmesiyle logaritmik viskozite sayıları hesaplanmıştır. Akış sürelerinin oranlanmasıyla elde edilen bağıl viskozitelerden özgül viskoziteler hesaplanarak derişime bölünmesiyle indirgenmiş viskozite elde edilmiştir. İndirgenmiş viskozite ile logaritmik viskozite sayılarının derişimin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmesiyle aynı kesim noktası ve farklı eğimlere sahip doğrular elde edilir. Bu doğruların eğimleri olan $k[\eta]^2$ ve $-k[\eta]^2$ değerine göre, doğruların ''y'' eksenini kesecek şekilde ekstrapolasyonu ile kesim noktasında viskozite sayısı $[\eta]$ alınmıştır. Bu değer aşağıda verilen Mark-Houwink eşitliğinde yerine konarak viskozimetrik molekül ağırlıkları bulunur.

$$[\eta] = 1.12x10^{-4} M_v^{0.73} \quad (3.4)$$

Bu eşitliklerde kullanılan K ve a değerleri litaretürden alınmıştır, 25°C'de stiren'in kloroform içindeki değerleridir (Brandrup, 1989).

Sentezlenen poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM)'nin ortalama molekül ağırlığı ve polidispersite indeksleri "Jel Geçirgenlik Kromotogrofisi" (GPC) ile belirlenmiştir. GPC sistemini oluşturan birimler; HPLC pompası (Shimadzu, LC 10A), maksimum 400 000 molekül ağırlıklı polimerler için kullanılan kolon (Shimadzu, 804), Tungsten lambalı refraktif index dedektörü (Shimadzu, RID 10A) ve veri işlem sistemidir. Ölçümlerde çözücü ve taşıyıcı olarak kloroform (Sigma, HPLC grade) kullanılmıştır. Sistem sıcaklığı 25^{o}C'de sabit tutulmuştur. Akış hızı 1.00 ml/dk olarak seçilmiştir. Kalibrasyon için 105000, 50000 ve 17500 molekül ağırlıklarına sahip polistren standartlar kullanılmıştır. Örnek hazırlamada optimum konsantrasyon 10 mg/ml olarak belirlenmiştir. Polistiren standartları ile yapılan deneylerden elde edilen kromatogramlardan, alıkonma süresine karşı molekül ağırlıkları grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Daha sonra polimer hazırlanan polimer çözeltileri sisteme enjekte edilerek orjinal kromatogramlar elde edilmiştir. Bunlar birincil kalibrasyon yöntemine göre değerlendirilerek ağırlıkça (M_w) ve sayıca (M_n) ortalama molekül ağırlıkları ile polidispersite indeksleri ($PI=M_w/M_n$) bulunmuştur.

3.3.6. Manyetik Özellik

Nanopartiküllerin manyetik özellikleri Elektron Spin Rezonans spektrometresi (ESR, Varian E-L X Band spectrometer, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Vakum etüvünde kurutulmuş olan örneklerin 1000-5000 G'luk bir manyetik alanda oda sıcaklığında ESR spektrumları çekilmiştir. Örnek kavitesi homojen, değeri doğrusal olarak değiştirilebilen bir dış manyetik alan oluşturan elektromıknatısın kutupları arasına konulmuştur. ESR spektrumları mikrodalga frekansı 9.3 GHz'de sabit tutulup manyetik alan değiştirilerek soğurma eğrisinin birinci türevi olarak çizdirilmiştir.

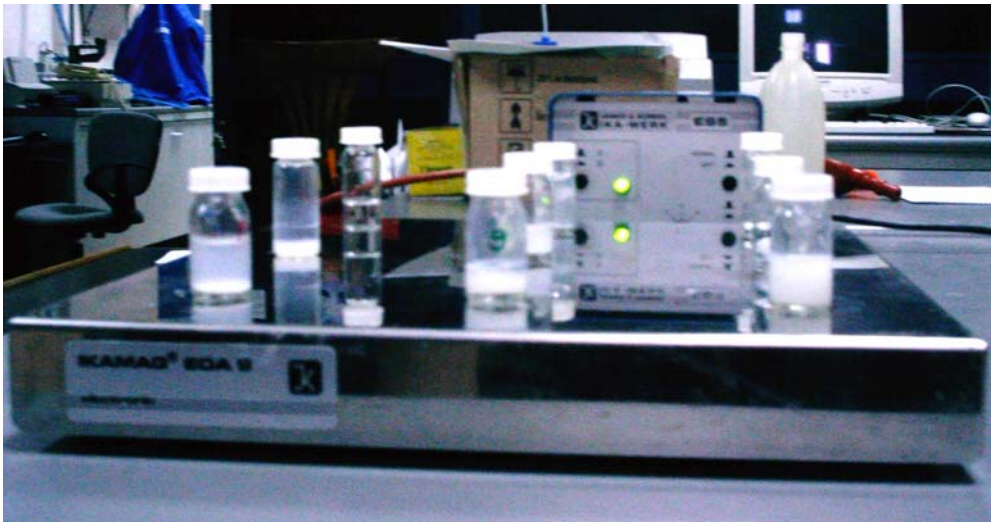
3.4. Nanopartikül Nükleik Asit Etkileşimi

3.4.1. Nanopartikül Genomik DNA Etkileşimi

Çalışmanın bu kısmında öncelikle poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerlerin genomik DNA ile etkileşimi incelenerek partikül-DNA konjugat oluşumuna ait bir optimizasyon yapılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak yalnız başına polimerin ve genomik DNA'nın partikül boy/boy dağılımı ve yükü ölçülmüştür. Deneyin yapılışı şu şekildedir: yıkanmış partiküller ve genomik DNA değişik pH'larda hazırlanmış olan tampon çözeltileri içinde iyice dağıtılmıştır. Bu çözeltiler 3 ml'lik polistiren küvetlere konularak 25^{o}C'de Zeta Sizer HSA3000 (Malvern Instrument, İngiltere) cihazı ile partikül boy/boy dağılımı ve yükü (Zeta potansiyeli) ölçülmüştür.

Partikül-genomik DNA etkileşimi şu şekilde incelenmiştir: 1 mg/ml'lik DNA çözeltisi 10 mg DNA'yı 10 ml tampon çözeltisinde yavaş yavaş manyetik karıştırıcı ile eklenerek hazırlanmıştır. Bu çözeltiye 100 mg partikül eklenerek oda sıcaklığında, hızı ayarlanabilir çoklu manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiş 25 ml hacminde cam reaktörlerde partikül DNA adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Deney düzeneğinin şematik görünümü Şekil 3.2'de verilmiştir. Partiküller ayrı ayrı 10 ml'lik genomik DNA çözeltisi ile 1.5-2 saat karıştırılarak etkileştirilmiştir. Bu deneylerde ortam pH'sının DNA partikül etkileşimine etkisi incelenmiştir. Ortam pH'ını sabit değerlere ayarlamak amacıyla fosfat, asetat ve borat tamponları kullanılmıştır (pH 3-10). DNA/polimer konjugatının partikül boy/boy dağılımı ve yükü ölçülmüştür. Konjugatlar değişik pH'larda hazırlanmış olan tampon çözeltileri içinde iyice dağıtılmıştır. Bu çözeltiler 3 ml'lik polistiren küvetlere konularak 25^{o}C'de Zeta Sizer HSA3000 (Malvern Instrument, İngiltere) cihazı ile partikül boy/boy dağılımı ve yükü (Zeta potansiyeli) ölçülmüştür. DNA bağlanması spektrofotometrik (UV/Vis Spectrometer Jasco V-530, Japonya) olarakta izlenmiştir. DNA derişimi 260 nm'de ölçülmüştür. Partikül ile etkileşen (adsorplanan) DNA miktarı derişim farkı kullanılarak hesaplanmıştır.

DNA (mg/g partikül) = [($\frac{A_1 - A_2}{A_1}$) XDNA DerişimiXToplam Hacim]/Partikül miktarı (3.5)



Şekil 3.3. Adsorpsiyon deney düzeneği.

3.4. 2. Nanopartikül ile Plazmid DNA Etkileşimi

Partikül/plazmid DNA komplekslerinin hazırlanması ise şu şekilde yapılmıştır: 500 μl (180 μg MA70, EEM77, MA200 ve EEM200) polimer lateksi alınıp, içine 10 μg plazmid eklenmiştir. Partikül/plazmid DNA (v/w) çözeltisi elde edilmiştir. Çözeltiler oda sıcaklığında 15-30 dk inkübe edilerek kompleks (konjugat) oluşumu sağlanmıştır. Hazırlanan partikül/plazmid DNA çözeltileri 0.15 M NaCl eklenerek 3 ml'ye tamamlanmış ve küvetlere yerleştirilmiştir. 25^{o}C'de kompleks boyutları ve komplekslerin yükleri Zeta Sizer cihazı ile ölçülmüştür. Ayrıca tek başına plazmid DNA'nın yük ve boyutlarıda aynı cihaz ve yöntem ile ölçülmüştür.

Bu grup deneylerde poli(St/PEG-EEM/DMAPM) partikülleri ile plazmid DNA etkileşimi için optimum koşullar belirlenmiştir. Önceden belirlenen bu optimum koşullarda poli(St/PEG-MA/DMAPM) partikülleri ile plazmid DNA konjugat oluşumu da ayrıca incelenmiştir. Nanopartiküller ve nanopartikül/DNA konjugatları atomik kuvvet mikroskobu (Digital Instruments, AFM Nanoscope, Dimension 3000, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir. Yıkanmış örnekler mika üzerine damlatılarak azot atmosferinde kurutulmuştur. Mika üzerindeki örnekler "Temassız" modda tarama yapılarak elde edilmiştir.

3.4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

Sunulan çalışmada HeLa hücresi kullanılmıştır. HeLa (insan serviks karsinoma hücreleri) hücresi Şap Enstitüsü'nden temin edilmiştir. HeLa hücreleri 1951 yılında

rahim ağzı yassı epitel hücreli karsinoma hastasından izole edilmiş olup halen günümüzde kadar kültür ortamlarında üretilebilen en iyi tanımlanmış hücre hatlarındandır. Bu çalışmada HeLa hücrelerinin seçimin sebebi kültür ortamında sınırsız sayıda bölünebilmeleri, insan kaynaklı olmaları ve kolay çoğaltılabilir olmalarıdır. HeLa hücreleri yüzeyde tek tabakalı veya süspansiyonda formda üretilebilmektedir. Araştırma kapsamında uygulanan HeLa hücrelerinin kültür koşulları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. HeLa hücrelerinin kültür koşulları.

Besi ortamı	DMEM-F12 ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") besi ortamı
Serum	FCS (Fetal buzağı serumu)
Antibiyotik	Penisilin-streptomisin (50μL/5 ml besi ortamı)
Kültür ortamı	Karbondioksit inkubatörü
Kültür atmosferi	% 95 hava ve %5 CO_2 karışımı
Nemlilik	% 95 nemli atmosfer
Subkültür	İki günde bir
Pasajlama	Tripsin-EDTA ile
Kültür kabı	25 $cm^{2,}$lik polistiren kap
Kültür özelliği	Tek tabakalı yüzeye tutunmuş
Toplam hacim	5 ml
Sıcaklık	37°C
Kültür pH	7.2-7.5

Hücreler uygun kültür koşullarında inkübe edildikten sonra morfolojik değişiklikleri ve hücre sayıları ışık mikroskobu ile izlenmiştir. Belli periyotlarda besi ortamları değiştirilerek taze besin sağlanmıştır. Hücreler kültür kabı yüzeyini kapladığında pasajlama yapılmıştır. Kültür koşullarında kontaminasyona karşı pH değişikliği besi ortamının renk değişikliği takip edilerek yapılmıştır. Kültür ortamında maya, mantar ve küf kontaminasyonunun takip edilmesi için besi yerinden alınan örnekler

PDA agarlara (potatoes dekstroz agar) içeren petrilere ekilmiş büyüme olup olmadığı tesbit edilmiştir. Kültür koşullarında kontaminasyona karşı pH değişikliği besi ortamının renk değişikliği takip edilerek yapılmıştır. Kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayan hücreler tripsin-EDTA (% 0.5 tripsin, %0.02 EDTA) çözeltisi ile 2 kez yıkandıktan sonra 0.5 ml tripsin-EDTA ile ortamdan kaldırılmıştır. Enzimin faaliyeti serum içeren besi yeri ilavesi ile durdurulmuştur.

Hücre süspansiyonundan 0.2 ml alınarak üzerine 0.2 ml Tripan blue eklenmiştir. Tripan blue ile sadece ölü hücreler boyandığından canlı hücre sayımı ve % canlılık oranı hemositometre ile ışık mikroskobunda saptanmıştır. % canlılık aşağıdaki eşitliğe göre saptanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \text{Canlı hücre sayısı/Toplam hücre sayısı X } 100 \qquad (3.6)$$

3.4.4. Nanopartiküllerin Floresan İşaretlenmesi ve Hücrelere Aktarımı

Polimerlerin hücre içine aktarımını göstermek için kültüre edilmiş HeLa hücrelerine florosein (fluorescein) ile işaretlenmiş polimerler aktarılmıştır. HeLa hücrelerine aktarım deneylerine başlanmadan önce poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) partikülleri sırasıyla amin uçlu floroseinle (floreseinamin izomeri) ve florosein ile işaretlenmiştir. Partiküllerin floroseinle işaretlenmesi deneyi şu şekilde yapılmıştır: 0.036 gr/ml polimer çözeltisinden 2 ml (0.072 gr polimer) alınarak 0.01 gr florosein eklenmiştir. Karanlıkta manyetik karıştırıcıda gece boyunca bekletilmiştir. Reaksiyon sonunda 20000 devirde 30 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Yıkama için saf su kullanılmıştır ve her yıkama sonunda santrifüjle çöktürme yapılmıştır. En son yıkamada elde edilen çökelek 1.5 ml suda dağıtılmıştır. 48 μg polimer/μl konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır.

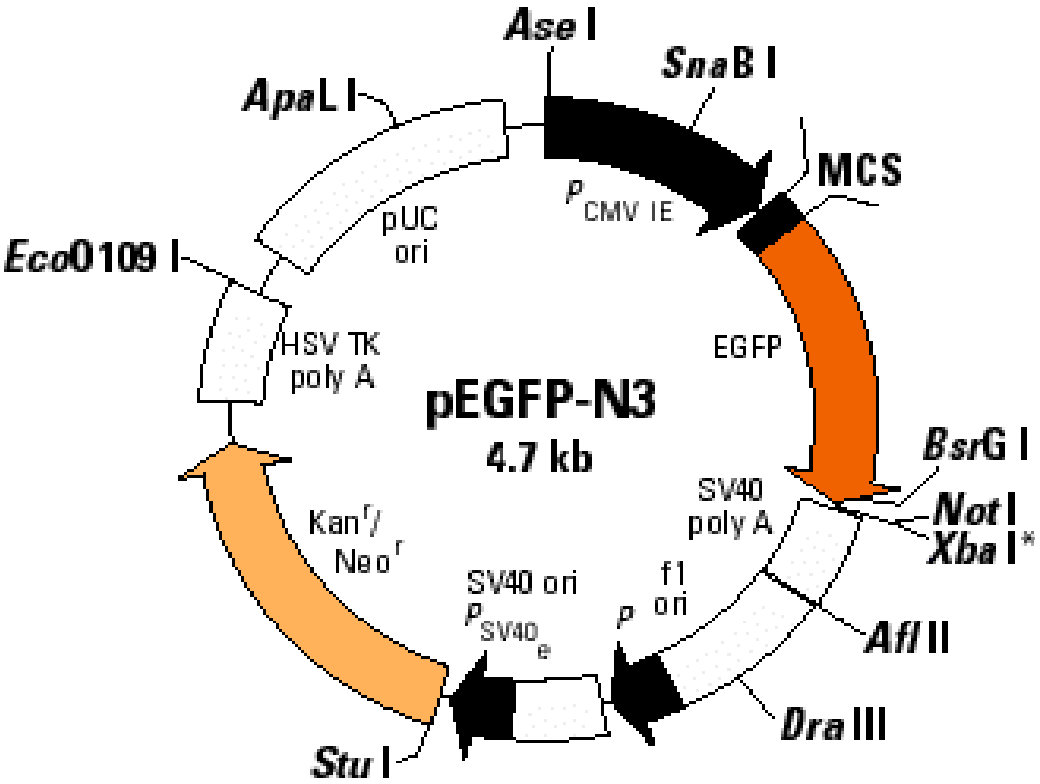
Hücreye floresan işaretli partikülleri aktarma çalışmalarında 6 bölmeli (her biri 35 mm çaplı) kültür kabı kullanılmıştır. İlk önce HeLa hücreleri ekimi yapılmış ve %10 FCS, %1 antibiyotik içeren besi yeri eklenmiştir. Yukarıda hazırlanan stok polimer çözeltisinden 750 μl (3.6 mg polimer) alınarak 2 ml'ye distile su ile tamamlanmış (1.8 μg polimer/μl), partiküller su içinde iyice dağıtılmıştır. Kültüre edilmiş her bir bölmedeki HeLa hücrelerinin üzerine sırasıyla 10, 30, 60, 90, 120 ve 200 μl hazırlanan polimer çözeltisinden (18, 54, 108, 162, 216, 360 μg polimer) ilave

edilmiştir. Daha sonra kültür kapları 37°C'de ve %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir. İşaretli partiküller hücrelerle 3 saat etkileştirilmiştir. İşaretli partiküllerin hücre içine aktarıldığı Floresan ataçmanlı inverted mikroskop (Fluorescence Inverted Microscope, Olympus IX70, Japonya) ile saptanmıştır (Şekil 3.4). Hücre içine giriş yetenekleri yüzde olarak hesaplanmıştır. % canlılık oranı hemositometre ile ışık mikroskobunda bir önceki bölümde verilen eşitlik (3.6) kullanılarak saptanmıştır.

Şekil 3.4. Hücre kültür laboratuvarı fotoğrafları: a) hücre kültürünün yapıldığı alan b) hücrelerin izlendiği floresan ataçmanlı inverted mikroskop.

3.4.5. Plazmid DNA'nın Hazırlanması

Hücreye aktarılmakta kullanılmak üzere 4.7 kb büyüklüğünde kanamisin ve neomisin antibiyotiklerine duyarlı, "Yeşil Floresan Protein" geni (GFP) taşıyan PEGFP-N3 plazmid DNA seçilmiştir. GFP floresan protein (Jellfish Aequorea victoria'dan izole edilmiştir) *in vitro* ve *in vivo* gen aktarımında gen ekspresyonunun takibinde kullanılmaktadır. GFP, 450-490 nm'lik floresan ışık altında yeşil renk veren bir proteindir. Yaydığı yeşil ışık kararlıdır ve kullanılan hücre hattına bağlı değildir. Bu çalışmada kullanılan plazmid DNA'nın gen haritası Şekil 3.5'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Bu çalışmada kullanılan PEGFP-N3 plazmid DNA'nın gen haritası

Plazmid DNA standart moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak *E. Coli* bakterisinde çoğaltılmış ve Qiagen midi plazmid saflaştırma kiti (Qiagen Inc., Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır. Bakteriden itibaren plazmid DNA saflaştırılması [illegible] niştir.

Şekil 3.6. Plazmid DNA saflaştırma basamakları

Alkali lizis, adsorpsiyon, yıkama ve desorpsiyon aşamalarında kullanılan tampon çözeltileri Qiagen Inc® (Almanya). firmasından temin edilmiştir. Kullanılan tampon çözeltileri Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Plazmid adsorpsiyon tampon çözeltileri

TAMPON	BİLEŞİMİ	MUHAFAZA KOŞULLARI
Tampon P1 **(Süspansiyon Tamponu)**	50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 μg/ml Rnase A	2 – 8 °C
Tampon P2 **(Lizis Tamponu)**	200 mM NaOH, %1 SDS[1] (w/v)	Oda sıcaklığı
Tampon P3 **(Nötralizasyon Tamponu)**	3.0 M potasyum asetat, pH 5.5	Oda sıcaklığı veya 2-8 °C
Tampon QBT **(Adsorpsiyon Tamponu)**	750 mM NaCl; 50 mM MOPS[2], pH 7.0; % 15 isopropanol (v/v); %0.15 Triton® X-100 (v/v)	Oda sıcaklığı
Tampon QC **(Yıkama Tamponu)**	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 8.5; %15 isopropanol (v/v)	Oda sıcaklığı
Tampon QF **(Desorpsiyon Tamponu)**	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; %15 isoprapanol (v/v)	Oda sıcaklığı

[1] SDS : Sodyum dodesil sülfat
[2] MOPS: Morfolino Propan Sulfonik Asit

3.4.6. Nanopartiküllerin Toksisitesi

Hücreler hatları 10% fetal buzağı serumu ve 10 μl/ml penisilin-streptomisin çözeltileri de içeren, L-glutamin içermeyen besi yerinde kültür edilmiştir. Tripsin uygulanan hücreler nemli atmosferde (37^{o}C'de %5 CO_2) saklanmıştır. Hücreler 96-bölmeli kültür kabına ekilmiştir. Partiküller her bir kuyucuğa 1-10 μL polimer (MA70, EEM77 ve MA200: 18, 36, 72, 108, 144, 180, 216, 252, 288, 324 μg polimer) olacak şekilde eklenmiştir ve DMEMF içinde ortam pH'ı 7.4'e ayarlanmıştır.

Hücrelerin kimyasallar varlığındaki canlılığı metilthiazolole tetrazolium test (MTT test) ile gösterilmiştir. Hücreler kültür kabına her bir bölmeye 60×10^3 hücre (200 μl/bölme) gelecek şekilde konulmuştur. Kültür kapları 24 saat 37°C'de nemli %5

CO_2 atmosferinde inkübe edilmiştir. Daha sonra ortam değiştirilip polimer çözeltisi eklenmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrası çözeltiler dökülüp her bir bölme 13 µl metilthiazolole tetrazolium (5 mg MTT/ml) ile işlem görmüştür ve 4 saat 37°C'de %5 CO_2 içeren nemli atmosferde inkübe edilmiştir. Daha sonra MTT çözeltisinin yerine oluşan formazen kristallerini çözmek için her bir bölmeye 100 µl izopropanol eklenmiştir. 570 nm'de (UV/Vis Spectrometer Jasco V-530, Japonya) kullanılarak absorbans ölçülmüştür.

3.4.8. Nanopartiküller ile Gen Aktarımı ve Ekspresyon

Çalışmanın bu kısmında yeşil floresan protein ekspresyonu sağlayan plazmid DNA kullanılmasındaki amaç; polimerin DNA aktarımı (transfeksiyon) yaptığını ve aktarılan genin hücre çekirdeğine giderek RNA polimeraz enzimini hücrede oluşturarak proteinin sentezlendiğini, ekspresyonun sağlandığını gösterebilmektir.

Polimer ve plazmid DNA'nın hücre içine aktarılması (transfeksiyonu) ve gen ekspresyonu ile ilgili bu gruptaki deneylerde HeLa hücre hatları kullanılmıştır. %10 fetal buzağı serumu ve 10 µl/ml penisilin-streptomisin içeren, glutamin içermeyen DMEMF besi yeri kullanılmıştır. Kopolimerlerin hücre içerisine alındıklarını göstermek için kültür edilen hücreler floresan işaretli kopolimerlerle transfekte edilmiştir.

Yeşil floresan protein geni taşıyan PEGFP-N3 plazmid DNA İ-Koli'de çoğaltılmış ve Qiagen kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Kopolimer-plazmid kompleksleri yukarıdaki gibi hazırlanmıştır ve 6 bölmeli kültür kabının her bir bölmesine hazırlanan bu konjugattan 100 µl (180 µg polimer) eklenmiştir. Transfeksiyonlarda 6 bölmeli kültür kabı kullanılmıştır. Her bir bölmeye HeLa hücreleri konulmuştur (bölme başına $60x10^3$ hücre) ve 2 ml fetal buzağı serumu ve antibiyotik içeren DMEM eklenmiştir. Bu kültür kabı 37°C'de %5 CO_2 ortamında 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir bölmeye 2 ml taze DMEM (FCS ve antibiyotik içermeyen) eklenmiştir. Bölmeler 37°C'de %5 CO_2 ortamında 1 saat inkübe edilmiştir ve 100 µl transfeksiyon çözeltisi (floresan işaretli kopolimeri de içeren) eklendikten sonra 37°C'de %5 CO_2 ortamında 3.5 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra ortama FCS ve antibiyotik içeren taze besi yeri DMEM eklenmiştir. Kopolimerin içeri alınmasından 4 saat sonra ve GFP ekspresyonundan 72 saat

sonraki transfeksiyonlar floresan ataçmanlı inverted mikroskop (Fluorescence Inverted Microscope, Olympus IX70, Japonya) ile izlenmiştir.

Transfeksiyon (hücre içine girişi) ve gen ekspresyon yetenekleri yüzde olarak hesaplanmıştır. Transfekte olmuş hücreler ve toplam hücre bir bölmedeki 5 farklı bölgede (her bir bölgede100-150 hücre içeren) sayılmış ve ortalaması alınmıştır. Gerek gen aktarımı gerekse GFP protein sentez (gen ekspresyonunun) oranlarının belirlenmesinde her bir oran en az 5 kez tekrar edilerek hesaplanmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Plazmid DNA'nın (pDNA) gen terapi ve aşılarda kullanılmasıyla birlikte pDNA üretimine olan ilgi artmıştır.

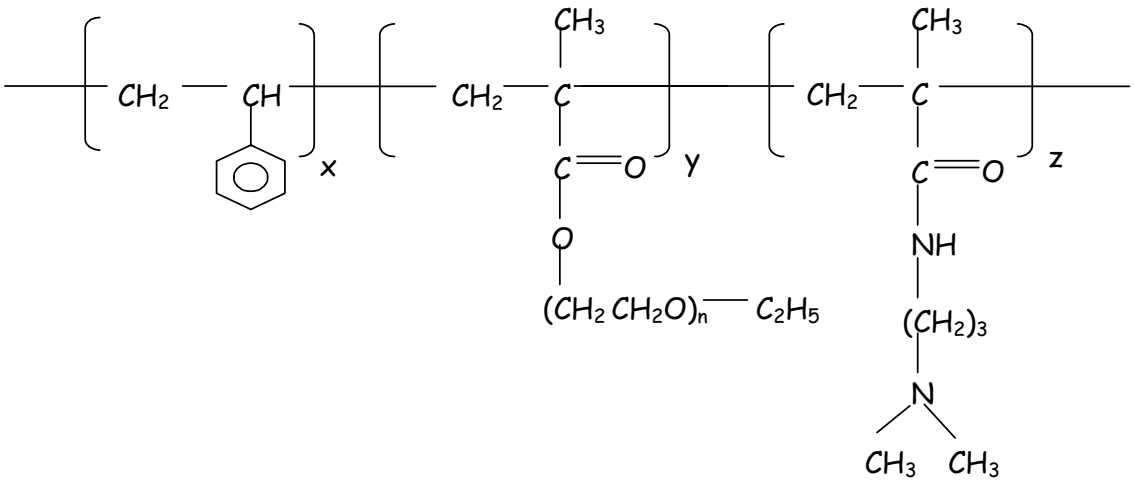
Plazmid kökenli terapilerde başarının en önemli koşulu uygun maliyetli ve jenerik pDNA üretim proseslerinin geliştirilmesidir. Bununla beraber, yasal uygulamaları karşılamak için üretilen materyalin yüksek saflıkta olması, homojen süper kıvrımlı halkasal ("supercoiled circular covalently close") pDNA elde etmeyi gerektirmektedir. Hücre transfeksiyonu için yapılan küçük ölçekli üretimlerden büyük ölçekli üretimlere geçiş bakteriyal fermentasyona, bakteriyel lizatın işlenmesine ve pDNA'nın en son üretim ve formülasyonuna yeni sınırlar getirmektedir.

Klasik biyoteknoloji, enzimler, mikroorganizmalar ve hayvan hücreleri kullanılarak oldukça gelişmiş fermantasyon teknolojileri ile özel bileşikler üretmeyi amaçlar. Modern biyoteknolojide ise genetik modifiye mikroorganizmaların, hayvan hücrelerinin ve transjenik bitki ve hayvanların kullanılması söz konusudur. Genetik modifikasyonda önce istenilen gen bölgesi çeşitli enzimler kullanılarak DNA'dan kesilerek alınır ve pDNA üzerine yerleştirilir. Sonraki adımda pDNA çoğaltılmak üzere bir mikroorganizmaya sokulur. Mikroorganizma uygun besi ortamlarında ve fermantasyon koşullarında çoğaltılır ve pDNA mikroorganizmadan çeşitli yöntemler kullanılarak ayrılır. pDNA'ya doğrudan elektroporasyon, vb. gibi tekniklerle ya da viral veya nonviral gibi taşıyıcılar kullanılarak istenilen hücreye transfer edilir. Transfer hücre kültür ortamında gerçekleştirilebileceği gibi, taşıyıcı vektörle birlikte doğrudan istenilen bitki veya hayvana yada gen terapisi durumunda insana yapılabilir.

Sunulan çalışmada *E. coli*' den elde edilen ve gen terapisi amacı ile kullanılan PGFP-N3 plazmidinin saflaştırılması için üzerinde fonksiyonel grup içermeyen ve içeren katyonik nanopartiküller sentezlenmiş ve bunların pDNA'yı ayırmada kullanılabilirlikleri araştırılmıştır. Hazırlanan bu nanopartiküllere manyetik özellik kazandırılarak biyoayırmanın manyetik özellik yolu ile daha etkin olacağı düşünülmüştür. Yapılan çalışmada üretilen nanopartiküllerin pDNA ile oluşturdukları konjugatların gerek boyu gerekse taşıdıkları yüzey yüklerinin ideal bir gen transferine uygun olduğu düşünüldüğü için konjugatların hücre içine aktarımı ve transfeksiyonu çalışılmıştır.

4.1. Fonksiyonel Grup İçermeyen Nanopartiküller

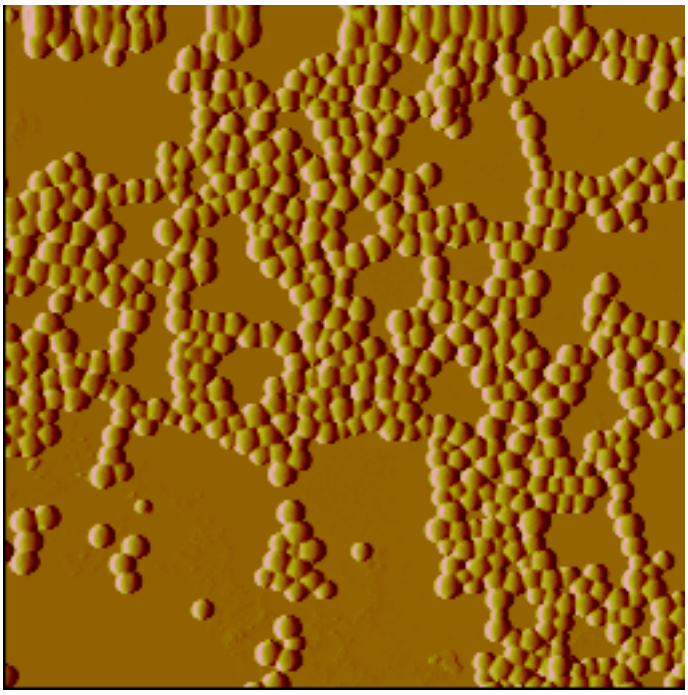
Yapılan çalışmanın ilk kısmında fonksiyonel grup içermeyen katyonik nanopartiküller yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle üretilmiştir. Polimerizasyonlar St, DMAPM ve PEG-EEM (n=3) monomerlerinde bulunan vinil grupları üzerinden zincir polimerizasyonu şeklinde yürümüş ve olası kimyasal yapısı Şekil 4.1'de verilen terpolimerler sentezlenmiştir.



Şekil 4.1. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin molekül yapısı.

Sentezlenen terpolimerden oluşan nanopartiküller AFM ile görüntülenmiştir. Şekil 4.2'de tez kapsamında üretilen bir polimerik nanopartikül örneğinin AFM görüntüsü sunulmuştur. Diğer polimerik partiküllerin AFM görüntüleri de benzerdir. Tez kapsamında uygulanan yöntemle üretilen nanopartiküllerin küresel ve dar boy dağılımına sahip oldukları belirlenmiştir. Şekil 4.2'de verilen görüntüdeki nanopartiküllerinin ortalama çapı 112 nm olarak ölçülmüştür. İleriki bölümlerde söz edileceği gibi tez kapsamında üretilen polimerik nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı ölçümü için esas olarak Zeta Sizer cihazı kullanılmıştır. Yukarıdaki örneğin bu cihaz ile ölçülen ortalama boyu 117.3 nm dir. Dikkat edileceği gibi her iki yöntemde yaklaşık aynı değeri vermektedir. Ancak AFM'de elde edilen değerin daha gerçekçi olduğunu söylemek mümkündür. Çünkü Zeta Sizer ölçümlerinde sulu fazda bulunan partikülün etrafında suyun içinde bulunan serbest iyonların

toplanmasıyla bir difüzyon tabakası oluşmaktadır. Ölçümler sırasında oluşan bu difüzyon tabakasıda hesaba katılarak partikül boyu hesaplanmaktadır, dolayısıyla hesaplanan partikül boyu gerçekte olandan biraz daha büyüktür.



Şekil 4.2. EEM7'ye ait atomik kuvvet mikroskobu (AFM) görüntüsü
(tarama alanı 5μm X 5μm).

Sunulan tezin ilk bölümünde monomerlerin, başlatıcı ve dispersiyon ortamı derişimlerinin partikül boyuna ve yüzey yüküne etkileri incelenmiştir. Uygulanan tüm reçetelerde kararlı lateksler elde edilmiş ve bir yıldan daha uzun bir süre saklanmalarına rağmen herhangi bir çökme gözlenmemiştir. Optimize edilen reçeteler içinde en küçük partikül boyuna sahip reçete çalışmanın sonraki bölümlerinde uygulanmıştır. İkinci bölüm deneylerde nanopartiküllerin ortamdan kolaylıkla ayrılmasının sağlanmasının çok daha uygun olacağı görüşüyle nanopartiküllere manyetik özellik kazandırılmıştır. Başka bir ifadeyle manyetik yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Sonraki bölümlerde nanopartiküllerin genomik

ve plazmid DNA ile etkileşimleri ve bunların saflaştırılmasında ve hücre içine transferinde kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Bu çalışmaların sonuçları aşağıdaki alt bölümlerde ayrı ayrı ele alınarak sunulmuştur.

4.1.1. Toplam Monomer Dönüşümü

Farklı besleme bileşimleriyle 20 farklı polimerik nanopartikül sentezlenmiştir. Çizelge 4.1'de polimerizasyon besleme ve ulaşılan monomer dönüşümü olarak verimler topluca sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Farklı reçetelerle hazırlanan poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerine ait toplam dönüşüm miktarları.

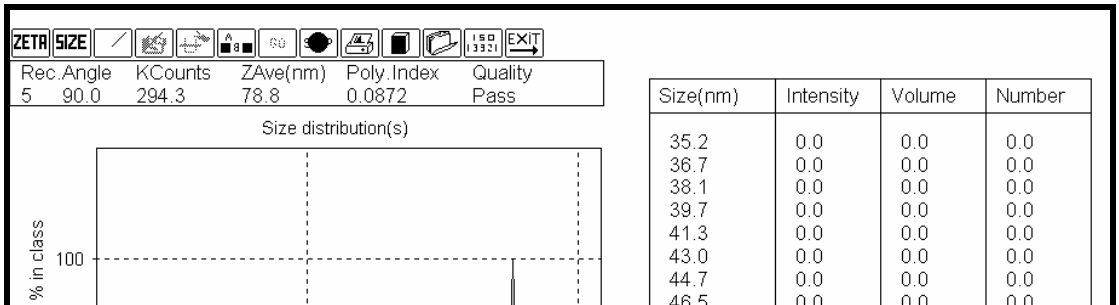
Örnek	*Su* (ml)	*Stiren* (ml)	*DMAPM* (ml)	*PEG-EEM* (ml)	*V-50* (gr)	Toplam Dönüşüm (%)
Stiren Derişiminin Etkisi						
EEM 1	50	**1.25**	0.1	0.1	0.03	97
EEM 2	50	**2.5**	0.1	0.1	0.03	99
EEM 3	50	**5.0**	0.1	0.1	0.03	98
DMAPM Derişiminin Etkisi						
EEM 4	50	1.25	**0**	0.1	0.03	96
EEM 5	50	1.25	**0.3**	0.1	0.03	98
EEM 6	50	1.25	**0.6**	0.1	0.03	99
PEG-EEM Derişiminin Etkisi						
EEM 7	50	1.25	0.1	**0.1**	0.03	98
EEM 8	50	1.25	0.1	**0.2**	0.03	93
EEM 9	50	1.25	0.1	**0.4**	0.03	85
EEM 10	50	1.25	0.1	**0.6**	0.03	86
V-50 Derişiminin Etkisi						
EEM 11	50	1.25	0.1	0.1	**0.03**	94
EEM 12	50	1.25	0.1	0.1	**0.06**	94
EEM 13	50	1.25	0.1	0.1	**0.12**	92
Su Miktarının Etkisi						
EEM 14	**50**	1.25	0.1	0.1	0.03	98
EEM 15	**75**	1.25	0.1	0.1	0.03	98
EEM 16	**100**	1.25	0.1	0.1	0.03	95
EEM 17	**120**	1.25	0.1	0.1	0.03	97
EEM 18	**140**	1.25	0.1	0.1	0.03	94
EEM 19	**160**	1.25	0.1	0.1	0.03	95
EEM 20	**200**	1.25	0.1	0.1	0.03	79

Çizelgede görüldüğü gibi hemen hemen tüm polimerizasyonlarda toplam dönüşüm değerleri oldukça yüksektir. Çoğu durumda dönüşüm %90 ın üzerine çıkmıştır.

Dikkat edileceği gibi besleme bileşiminde komonomer oranlarının değişimi toplam monomer dönüşümünü çok belirgin bir şekilde etkilememiştir. Bu değerler yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen monomerlerin dönüşüm değerleriyle uyum içindedir. Ganachaud ve arkadaşları stiren monomeri vinil benzil amin hidroklorür veya aminoetil metakrilat hidroklorür komonomerlerini, V-50 varlığında yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimeriasyonu ile polimerleştirilmiş ve değişik boyutlarda katyonik nanopartiküller üretilmişlerdir, ki burada rapor edilen dönüşüm değerleri %83-99 aralığındadır (Ganachaud ve ark., 1997). Liu ve Xiao'nun çalışmalarında stiren ve (2-(metakriloyloksi)etil) trimetil amonyum klorür monomerlerinin yine aynı yöntemle kopolimerleştirilmesi sonucu ulaşılan dönüşüm değerleri %78-99 aralığındadır (Liu ve Xiao, 2000). PEG-EEM kullanılarak yapılan bir başka çalışmada ise stiren monomeri yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile kopolimerleştirilmiş ve PEG-EEM makromonomerinin oluşan latekslerin kararlılığına olan etkisi incelenmiştir (Tuncel, 2000). Bu çalışmada da dönüşüm yüzdelerinin %61-94 aralığında değiştiği rapor edilmiştir

4.1.2. Stiren Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu grup deneylerde ana monomer stirenin (St), beslemedeki miktarı 1.25-5 ml aralığında değiştirilmiştir. Su, DMAPM, PEG-EEM ve V-50 miktarları sırasıyla 50 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g olarak sabit tutulmuştur. Polimerizasyonlar pH 2.5-3 aralığında (0.1 N HCl ile ayarlanmış), 65°C'de azot atmosferinde 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Bu grupta üretilen nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı ve zeta potansiyeli, Zeta Sizer ile ölçülmüştür. Cihazda elde edilen tipik bir çıktının görüntüsü Şekil 4.3'de örnek olarak verilmiştir (Çıktı doğrudan konduğu için yazılar İngilizcedir). Elde edilen veriler Şekil 4.4'de topluca sunulmuştur. Kolaylık sağlamak için, her partiküle ait zeta potansiyeli (mV olarak), ortalama boy (nm olarak) ve boy dağılımının (PI) sayısal değerleri yine bu şekilde gösterilmiştir.

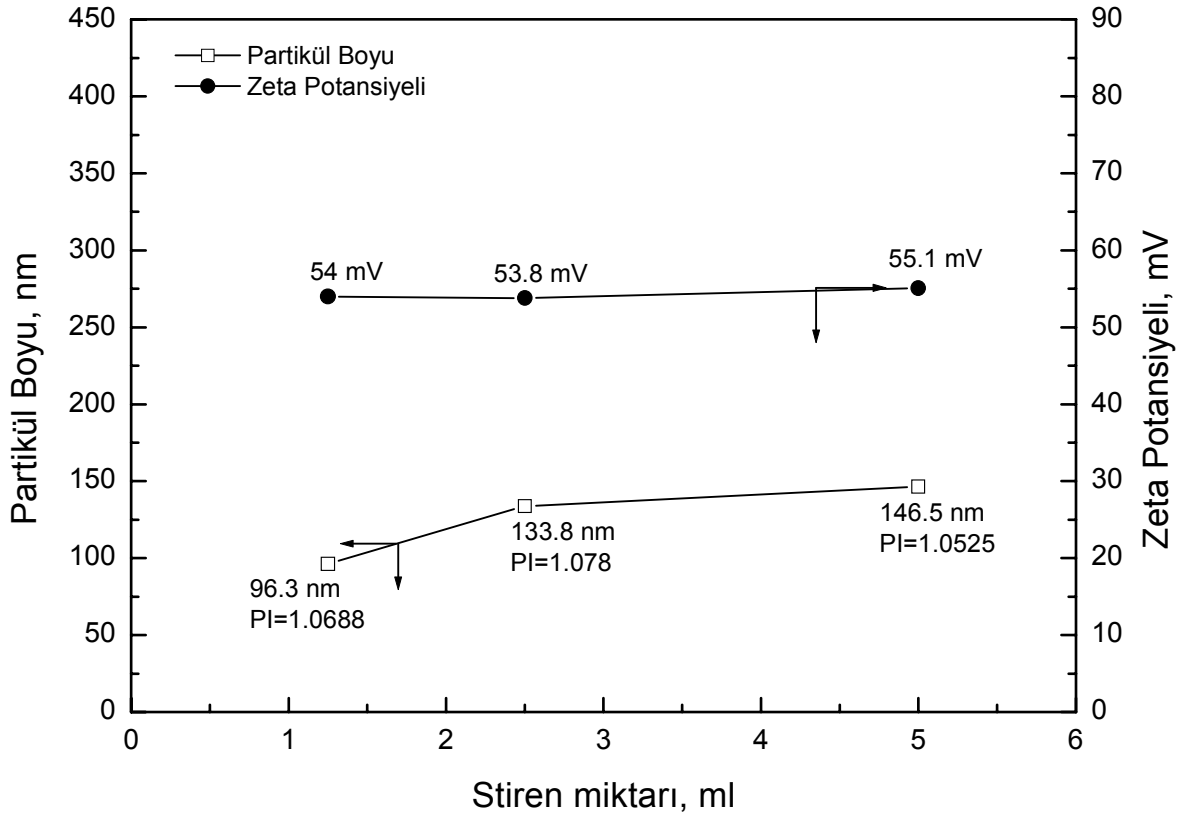


Şekil 4.3. Zeta Sizer'da elde edilen bir ölçümün cihazın yazıcısından alınan çıktısının görüntüsü.

Burada görüldüğü gibi partikül boy dağılımları oldukça dar bir aralıktadır ve ortalama partikül boyu artan St miktarı ile çok fazla olmamakla birlikte belirgin şekilde artmaktadır. Bu artışı ilgili literatürün de tanımladığı gibi (Goodwin ve ark., 1979; Smigol ve ark., 1992, Ganachaud ve ark., 1997, Xu ve ark., 1997; Sauzedde ve ark, 1997) şu şekilde açıklamak mümkündür: Stiren polimerizasyonda kullanılan ana monomerdir ve reçetelerde görüleceği gibi beslemeye diğerlerine göre çok daha fazla miktarda eklenmektedir. Bunun sonucu olarak reaksiyon ortamında "monomer saklama tanecikleri" olarak adlandırılabilecek ayrı bir faz oluşturmaktadır. Polimerizasyon sırasında, çekirdeklenme basamağından sonra, monomer molekülleri bu taneciklerden polimer oluşum fazına difüzlenip, polimerizasyonun devamını sağlamakta ve bunun sonucu da partikül boyu artmaktadır. Bu sırada ortamda bulunan PEG-EEM oligomerlerinin oluşan partikülün kararlı olmasını sağladığı, ve katyonik komonomer DMAPM ile katyonik başlatıcının büyüyen terpolimer zincirine eklenerek partikülün yüzeyine biriktikleri not edilmelidir. Monomer saklama taneciklerinden polimer faza doğru monomer difüzyonu ve polimerizasyon ortamda bulunan tüm monomer bitene kadar devam

eder. Dolayısıyla eğer ortamda daha fazla monomer saklama tanecikleri varsa, partiküller büyümeye devam edecektir ve yapılan çalışmada da gözlendiği gibi partikül boyu St miktarı ile artmaktadır.

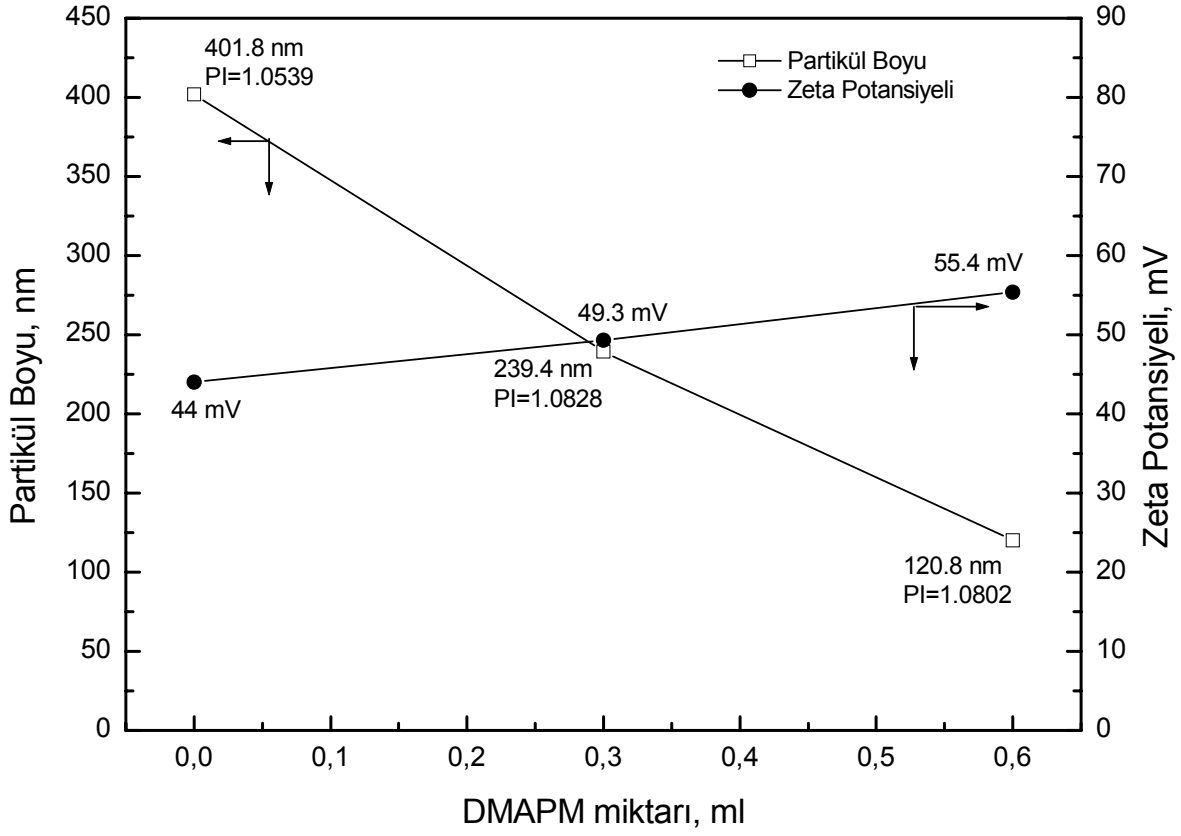
Şekilde görüldüğü gibi, St derişimin artması ile nanopartikül boyu artmasına karşın, ölçülen zeta potansiyalleri hemen hemen aynıdır. Bu da bu gruptaki tüm reçetelerde kullanılan katyonik komonomer ve başlatıcı miktarının partiküllerin yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde reaksiyon ortamında yeterli miktarda bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4. Beslemedeki St miktarının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

4.1.3. DMAPM Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu bölüm deneylerde beslemede kullanılan katyonik komonomer miktarı 0.0-0.6 ml aralığında değiştirilmiştir. Su, St, PEG-EEM ve V-50 miktarları sırasıyla 50 ml, 1.25 ml, 0.1 ml ve 0.03 g'dır. Polimerizasyonlar pH 2.5-3 aralığında (0.1 N HCl ile ayarlanmış), 65°C'de azot atmosferinde 24 saat sürdürülmüştür. Elde edilen veriler Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Beslemedeki DMAPM miktarının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

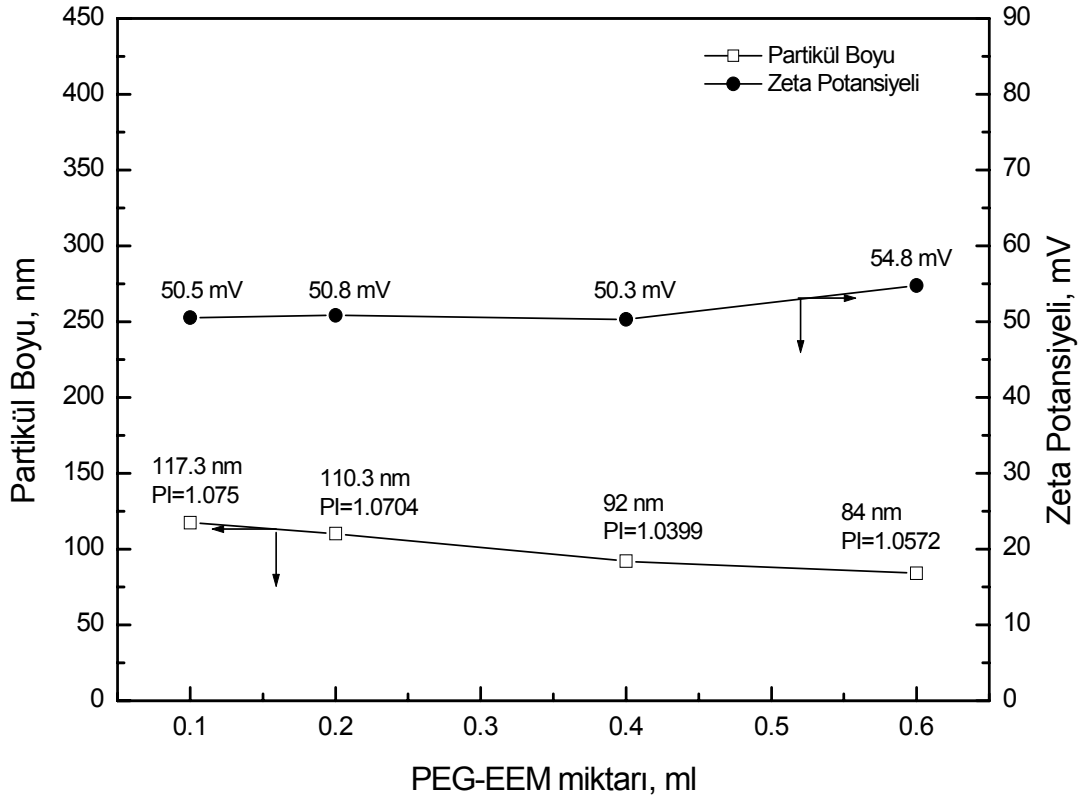
Şekil 4.5'de görüldüğü gibi polimerizasyon reçetesinde kullanılan katyonik komonomer miktarının artmasıyla birlikte ortalama partikül boyutu önemli ölçüde azalmaktadır. Her durumda gözlenen partikül boy dağılımı oldukça dardır. İlgili literatürde iyonik komonomerler başlatıcı molekülleri ile reaksiyona girerek oligomer radikalleri oluşturdukları, dolayısıyla bunların ortama artan miktarlarda ilavesiyle birlikte "birincil partikül oluşumu" hızlandığı, bunun da ortamda

başlangıçta daha çok sayıda partikül oluşumuna ve dolayısıyla ortalama partikül boyunun küçülmesine yol açtığı ifade edilmektedir. (Xu ve ark., 1997 Ganachaud ve ark., 1997, Sparnacci ve ark., 2000; Sauzedde ve ark, 1997). Sunulan tezde iyonik (katyonik) komonomer olarak kullanılan DMAPM miktarının artmasının üretilen nanopartikül boyuna etkisini de benzer şekilde açıklamak mümkündür.

Şekil 4.5'de katyonik DMAPM miktarı ile zeta potansiyellerinde artış olduğu gözlenmektedir. Bu iyonik komonomer varlığında gerçekleştirilen yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonlarında gözlenen genel bir durumdur (Xu ve ark., 1997, Ganachaud ve ark., 1997, Sparnacci ve ark., 2000; Sauzedde ve ark, 1997). Bu tür polimerizasyonlarda iyonik komonomerin esas rolü partikül yüzeyine kimyasal olarak bağlanarak partikülün daha kararlı davranmasını sağladığı not edilmelidir. Reaksiyon ortamında bulunan komonomer miktarının artmasıyla birlikte partikülün yüzeyine kimyasal olarak bağlanan grup miktarı artmaktadır. Bu grup miktarının artması da yüzey yük miktarının artmasının nedenidir.

4.1.4. PEG-EEM Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu grup çalışmada komonomer PEG-EEM miktarı 0.2-0.6 ml aralığında değiştirilmiştir. Su, St, DMAPM ve V-50 miktarları sırasıyla50 ml, 1.25 ml, 0.1 ml ve 0.03 g'dır. Polimerizasyonlar pH 2.5-3 aralığında (0.1 N HCl ile ayarlanmış), 65°C'de azot atmosferinde 24 saat sürdürülmüştür. Ortalama boy/boy dağılımı ve zeta potansiyel değerleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Beslemedeki PEG-EEM miktarının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

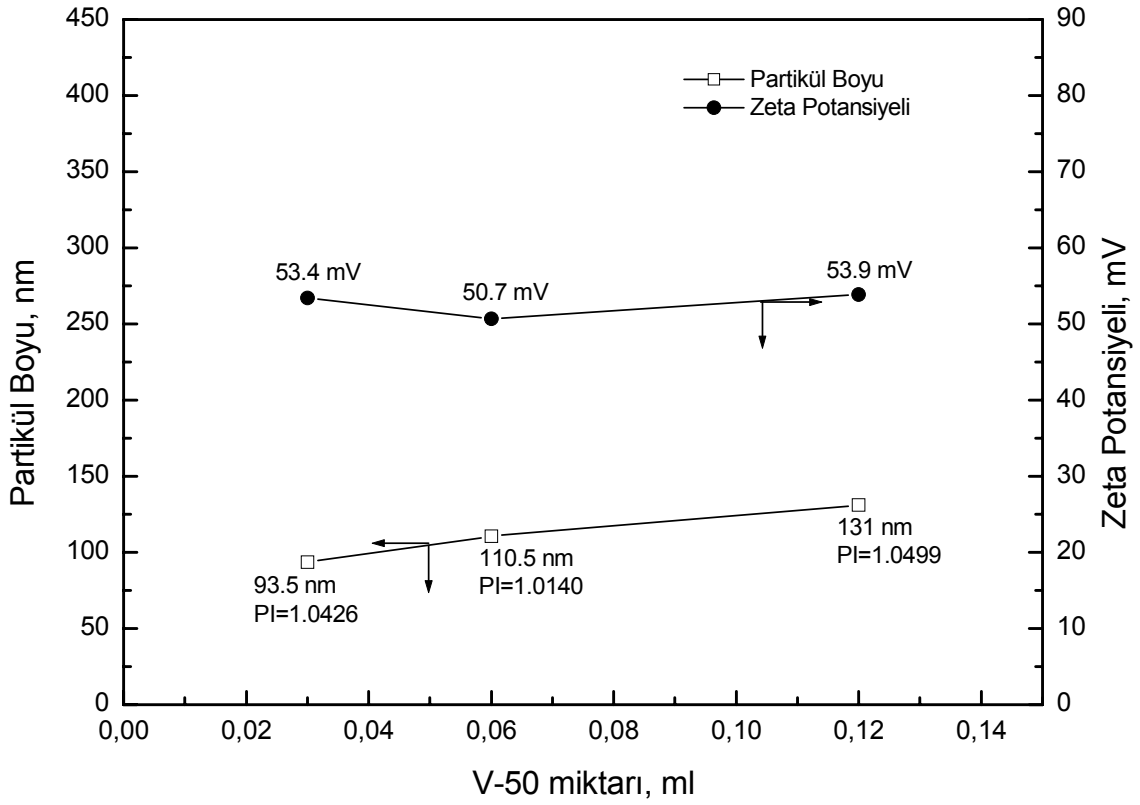
Bu grup deneylerde elde edilen partikül boyları 84-117 nm aralığındadır. Polimerizasyon reçetesinde kullanılan PEG-EEM miktarı arttığında, partikül boyutunda azalma gözlenmiştir. Polidispersite indeksinde gözlenen azalma ise çok fazla olmamakla birlikte yine de farkedilebilir boyutlardadır. Polimerizasyon ortamında PEG-EEM kullanılmasıyla stiren-su karışımının kararlılığı artmaktadır. PEG-EEM'nin partikül boyu üzerindeki etkisini şöyle açıklamak mümkündür: PEG-EEM komonomeri hidrofilik PEG ve polimerizasyon sırasında polimerleşebilen (taşıdığı çift bağ ile) hidrofobik EEM olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. PEG-EEM başlatıcı ile reaksiyona girerek yüzey aktif madde gibi davranan oligomer radikalleri oluşturur ve sisteme kararlılık sağlar. Polimerizasyonunun başlangıcında ana monomer stiren ve PEG-EEM'in başlatıcı ile reaksiyona girmesi yarışmalı bir şekilde olmaktadır. PEG-EEM daha polar olduğu için başlatıcının buraya bağlanarak zincir büyümesini başlatması daha olasıdır. Çekirdeklenme öncesi zincir uzaması yalnızca büyüyen zincir PEG-EEM içerirse mümkündür. Çünkü bu zincirin daha polar yapıda olması zincir yüksek molekül ağırlıklarına

ulaşana kadar çözünür formda kalmasını sağlar. Partikül oluşumu PEG-EEM oligomerinin belli bir zincir uzunluğuna gelerek çökmesiyle oluşmaktadır. Çekirdeklenme oluşmadan önce büyüyen zincirler fazla miktarda PEG-EEM içermektedir ve sonuç olarak küçük boyutlu fakat fazla miktarda partiküller oluşur. Başka bir ifadeyle, başlangıçta ortamda daha çok PEG-EEM olması daha çok sayıda çekirdekleşme noktasının oluşumuna yol açar, bunun sonucu ortamda sabit miktarda ana monomer olduğundan daha küçük partiküller oluşur. Bu tez kapsamında gözlenen bu davranış Tuncel ve arkadaşları tarafından da rapor edilmiştir (Tuncel, 2000).

Şekil 4.6'da dikkat edileceği gibi, düşük PEG-EEM miktarlarında yüzey yükünde önemli bir değişiklik gözlenmezken, artan PEG-EEM miktarı (0.6 ml) ile yükte önemli bir artış olmaktadır. Bunu açıklamak çok kolay olmamakla birlikte, büyük olasılıkla uygulanan bu reçetede katyonik komonomer ve hatta katyonik başlatıcı molekülleri oluşan partikülün dışına doğru itilmiş ve partikülün en dış yüzeyine yerleşmiştir. Partikül boyunun küçülmesiyle birlikte yüksek miktarda yüzey alanı ortaya çımış, bunun sonucu da yüzeye bağlanan iyonik grup sayısı artarak yüzey yük miktarı da artmıştır.

4.1.5. V-50 Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu gruptaki deneylerdepolimerizasyon reçetesinde katyonik başlatıcı, V-50, miktarı 0.03-0.12 ml aralığında değiştirilmiştir. Su, St, DMAPM ve PEG-EEM miktarları sırasıyla 50 ml, 1.25 ml, 0.1 ml ve 0.1 ml'dir. Polimerizasyonlar pH 2.5-3 aralığında (0.1 N HCl ile ayarlanmış), 65°C'de azot atmosferinde 24 saat sürdürülmüştür. Zeta Sizer'da elde edilen veriler Şekil 4.7'de topluca sunulmuştur.



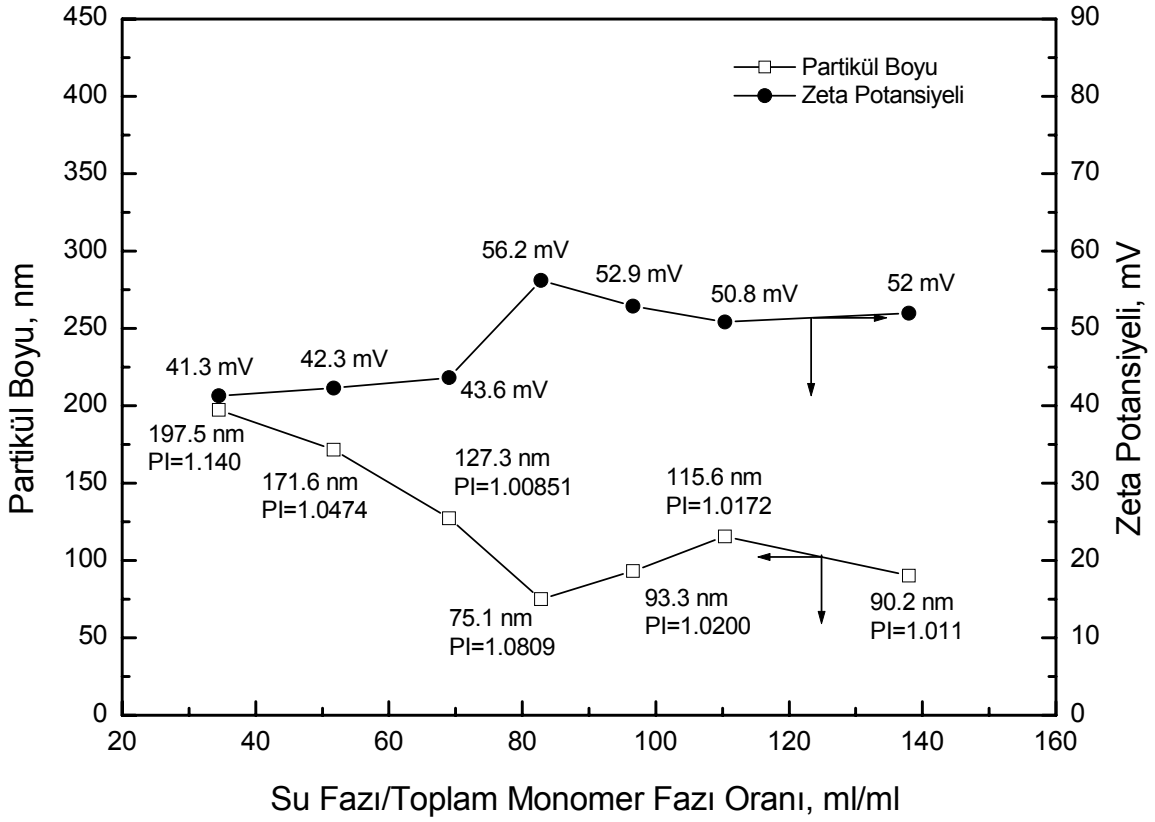
Şekil 4.7. Beslemedeki V-50 miktarının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

Şekil 4.7'de görüldüğü gibi ortamda bulunan başlatıcı miktarının artmasıyla birlikte partikül boyu artmakta ve oldukça dar boy dağılımı gözlenmektedir. Besleme ortamında yüksek katyonik başlatıcı derişimlerinde, oluşan az sayıda ancak yüksek molekül ağırlıklı zincirler nedeniyle çekirdeklenme sırasında daha az sayıda polimerizasyon çekirdeği üretilir, bu da daha büyük partiküllerin oluşmasını yol açar (Tuncel, 2000, Ganachaud ve ark.,1997; Xu ve ark., 1997; Sauzedde ve ark, 1997).

Partikül yüzey yüklerinde önemli bir değişiklik gözlenmemektedir. Ortamda bulunan başlatıcı miktarının artmasıyla birlikte yüzey yükününde artması beklenirken, partikül boyunun büyümesiyle ters olarak başlatıcının bu etkisi bastırılmıştır ve yüzey yükünde önemli bir değişiklik olmamıştır.

4.1.6. Su/Monomer Oranının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

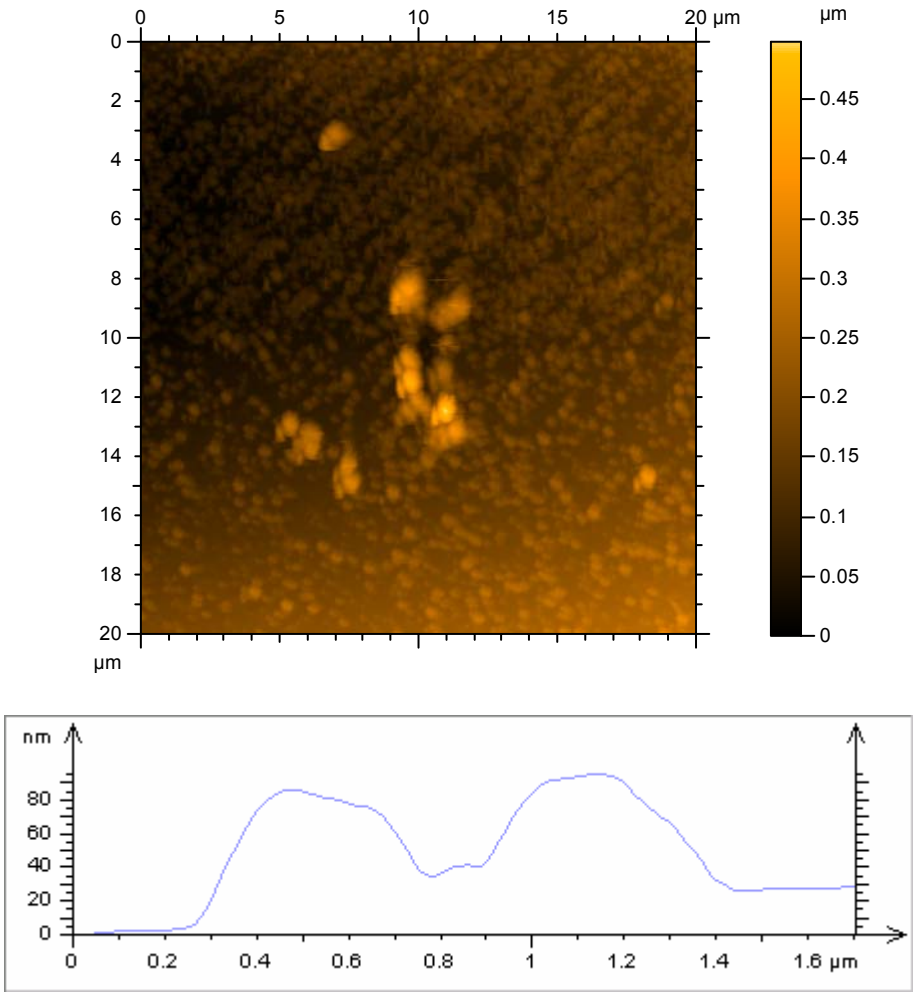
Bu gruptaki deneylerde, polimerizasyon reçetesinde kullanılan su fazı miktarı başka bir ifadeyle su fazının toplam monomer fazına oranı 51.72-137.93 (su miktarı 75-200 ml) aralığında değiştirilmiştir. St, PEG-EEM, DMAPM ve V-50 miktarları sırasıyla 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g'dır. Polimerizasyonlar pH 2.5-3 aralığında (0.1 N HCl ile ayarlanmış), 65°C'de azot atmosferinde 24 saat sürdürülmüştür. Zeta Sizer'da elde edilen veriler Şekil 4.8'de topluca sunulmuştur.



Şekil 4.8. Beslemedeki su/monomer oranının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

Şekil 4.8'de su/monomer oranının değiştirilmesiyle birlikte iki ayrı bölge oluştuğu görülmüştür. Oluşan ilk bölgede oranın artması ile ortalama partikül boyunda önemli ölçüde bir azalma gözlenmiştir. En küçük partikül boyutu (yaklaşık 75 nm)

su/monomer oranının 82.76 olduğu (120 ml su/1.45 ml toplam monomer) değerde ve yukarıda belirtilen polimerizasyon koşullarında elde edilmiştir. Yüksek su/monomer oranlarında (82.76'nın üzerindeki su/monomer oranlarında) hazırlanan partiküllerin ortalama boyları çok fazla değişmemekte ve 90-115 nm aralığındadır. Başka bir ifadeyle su/monomer oranının artmasıyla partikül boyutu plato değerine ulaşmaktadır bu da ikinci bölgeyi oluşturmaktadır. Polimerizasyon ortamında artan su miktarı monomer/sürekli faz ortamı'nı azaltmakta, St'in yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonunda gözlendiği gibi artan su/monomer oranı ile son partikül boyutu azalmaktadır (Goodwin ve ark., 1979; Smigol ve ark., 1992, Ganachaud ve ark., 1997, Xu ve ark., 1997; Sauzedde ve ark, 1997. Partikül boyutunun azalmasıyla ulaşılan en küçük değer çalışılan bu emülsiyon sisteminde elde edilen en küçük partikül boyunu vermektedir. Elde edilen en küçük partiküle ait AFM görüntüsü Şekil 4.9'da verilmiştir. Burada görüldüğü gibi partiküller küresel yapıda olup oldukça monodisperstir. AFM'ye ait programda yer alan "derinlik profili" ile hesaplanan partikül boyu 75-85 nm aralığındadır. Elde edilen bu sonucun Zeta Sizer'daki boy ölçümleri ile aynı paralellikte olduğu görülmektedir.



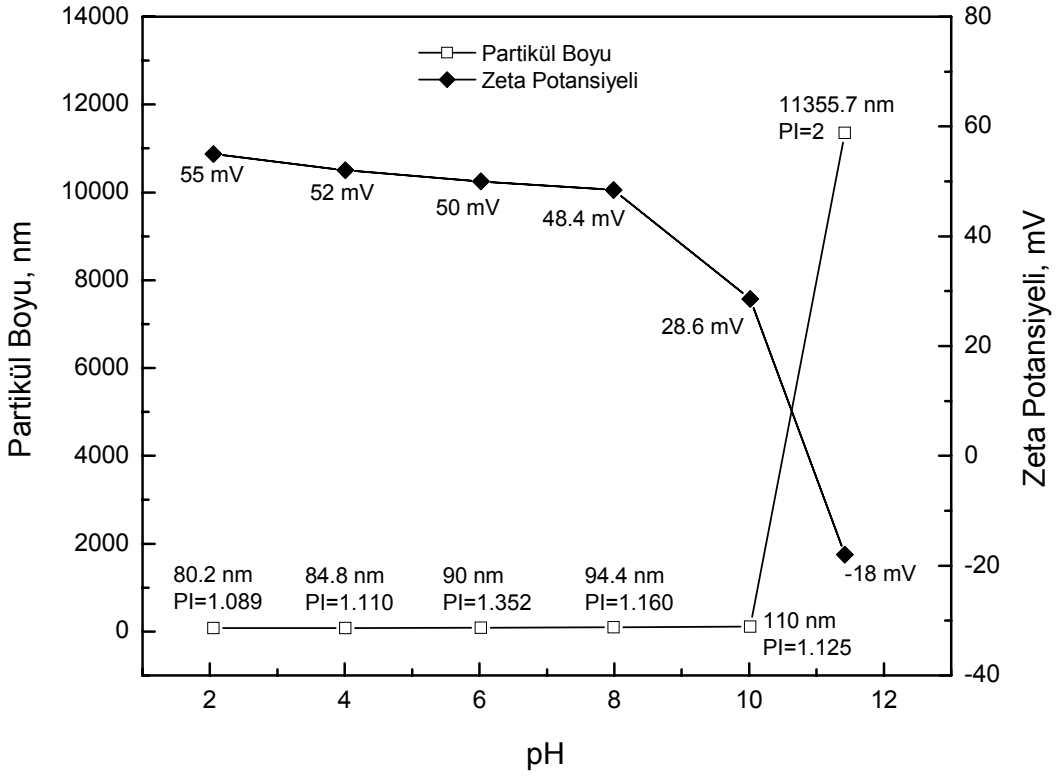
Şekil 4.9. Elde edilen en küçük partikül'e (EEM17) ait AFM görüntüsü ve "derinlik profili". (Zeta Sizerda ölçülen partikül boyu 75.1 nm dir.)

Ortalama partikül boyunun azalmasıyla birlikte elde edilen partikül yüzey alanı artmakta ve dolayısıyla başlatıcıdan gelen yüzey yük yoğunluğu azalmaktadır. Zeta potansiyelde oluşan artış ise oluşan bu yüzey yük yoğunluğundaki azalmanın sonucudur.

4.1.7. pH'nın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu gruptaki deneylerde yalnızca ortam pH'sı çeşitli tamponlar kullanılarak 2-12 aralığında değiştirilmiştir. Polimerizasyon reçetesi şöyledir: Su, St, PEG-EEM, DMAPM ve V-50 miktarları sırasıyla 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g.

Reaksiyonlar 65°C'de azot atmosferinde 24 saat sürdürülmüştür. Zeta Sizer'da elde edilen veriler Şekil 4.10'da topluca sunulmuştur.



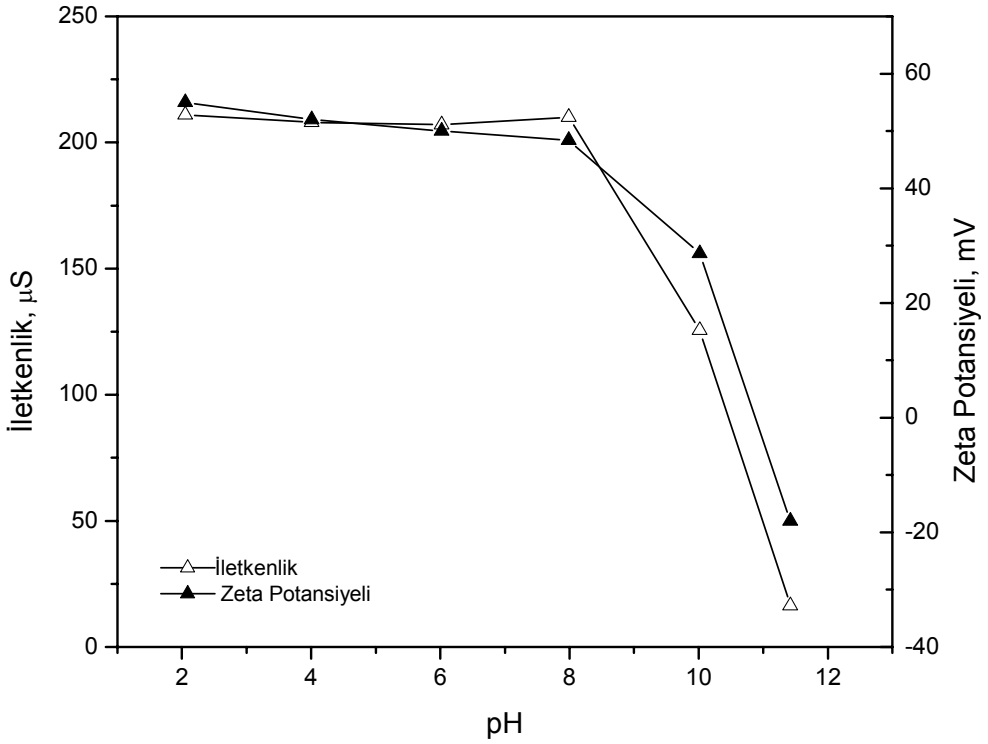
Şekil 4.10. Ortam pH'sının nanopartikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

Yapılan bu çalışmada partikül boy/boy dağılımının pH'nın bir fonksiyonu olduğu görülmüştür. Asidik pH'larda çalışmanın amacı katyonik başlatıcının ve monomerin bu pH değerlerinde pozitif yüklenmesi ve oluşan polimere katyonik yük sağlaması, böylece hem yüklü hem de kararlı latekslerin elde edilmesidir. Şekil 4.10 incelendiğinde reaksiyon pH'ı 2-9 aralığında iken partikül boyu 80-90 nm civarındadır ve pH ile değişmemektedir. Zeta Potansiyeli ise 50 mV civarındadır. Fakat pH 10'un üzerinde partikül boyu birden çok artmakta (çökme gözlenmekte) ve zeta potansiyeli -18 mV'a kadar düşmektedir.

pH 10 ve yukarısında amidin grubu içeren katyonik monomerin hidroliz sonucu karboksil gruplarının oluştuğu düşünülmektedir. Zeta potansiyeli değerlerine bakıldığında yine asidik pH'larda protonlanan başlatıcı ve katyonik monomer

nedeniyle yüzey yük yoğunluğu artmakta ancak bazik pH'larda potansiyelde şiddetli azalma görülmektedir. Lateks yaklaşık pH 10.5 değerinde izoelektrik noktaya ulaşmaktadır. Daha önce literatürde yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır. Katyonik monomer kullanılarak yapılan çalışmalarda oluşan lateksin izoelektrik noktası genellikle pH 9.5-10.5 olarak rapor edilmiştir (Xu ve ark., 1997; Elaissari ve ark., 1993; Ganachaud ve ark., 1996). Amino etil metakrilat hidroklorür ile yapılan bir başka çalışmada lateksin izoelektrik noktası pH 9-10.5 olarak verilmiştir (Sauzedde ve ark., 1996). pH 10'un üzerinde anyonik grupların varlığı ise bazik koşullarda, yukarıda da belirtilen bu çalışmada olduğu gibi, yüzeyde bulunan amidin gruplarının hidroliz olarak karboksilik yüzey gruplarına dönüşmesi ile açıklanmıştır.

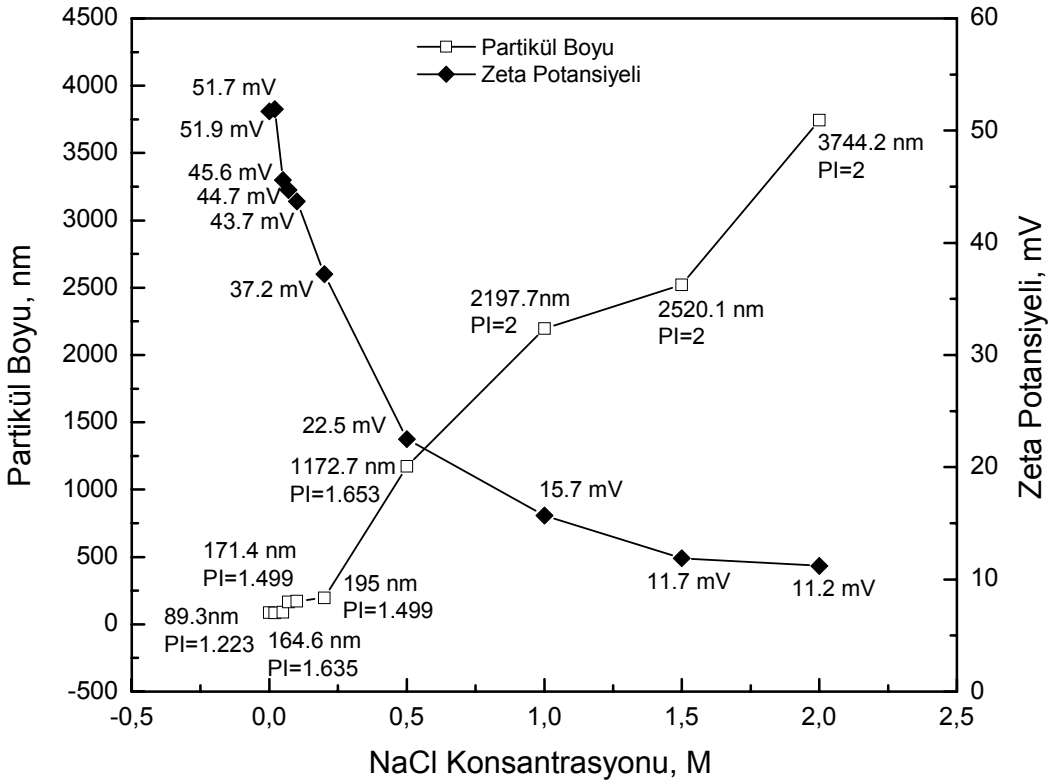
Yapılan çalışmada zeta potansiyeli ölçümlerinden elde edilen sonuçlar iletkenlik ölçümleriyle de karşılaştırılmıştır. Bunun için EEM17 partikülleri seçilmiştir ve oda sıcaklığında değişik pH değerlerinde (2-12) iletkenlik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi iletkenlik ölçümlerinden elde edilen veriler ile zeta potansiyeli değerleri tam bir uyum içindedir.



Şekil 4.11. Ortam pH'ının nanopartikül yüzey yüküne etkisi:
İletkenlik ölçümleri ile Zeta Sizer ölçümlerinin sonuçlarının karşılaştırılması.

4.1.8. Tuz Derişiminin Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu gruptaki çalışmalarda tuz derişiminin başka bir ifadeyle iyonik gücün değiştirilmesinin sentezlenen nanopartikül boy ve boy dağılımına ve yüzey yüküne etkilerinin araştırılması için yalnızca beslemedeki tuz (NaCl) derişimi 0-2 M aralığında değiştirilmiştir. Polimerizasyon reçetesi şöyledir: Su, St, PEG-EEM, DMAPM ve V-50 miktarları sırasıyla 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g. Polimerizasyon pH'ı 2.5-3 aralığındadır. Reaksiyonlar 65°C'de azot atmosferinde 24 saat sürdürülmüştür. Zeta Sizer'da elde edilen veriler Şekil 4.12'de topluca sunulmuştur.



Şekil 4.12. Tuz (NaCl) derişiminin nanopartikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

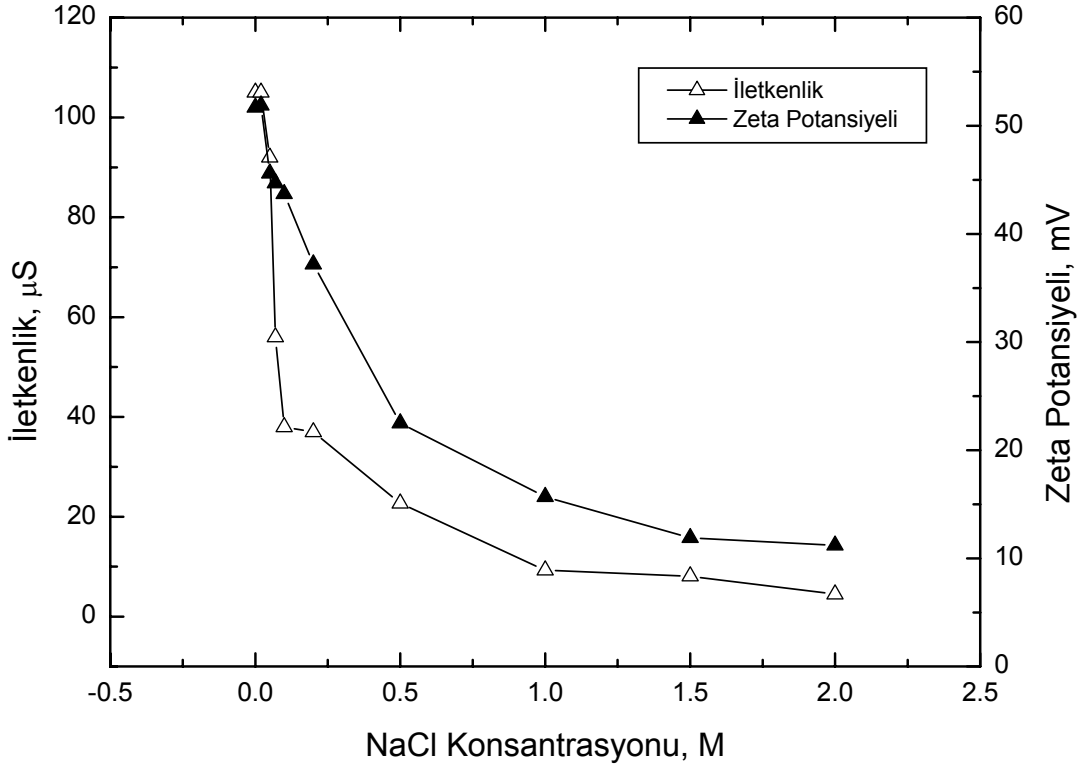
Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, tuz derişimi 0-0.05 M aralığında iken partikül boyunda herhangi bir artış görülmemekte, 0.07-0.2 aralığında ise partikül boyu büyümeye başlayarak yaklaşık iki katına çıkmakta ve 0.2 M'ın üzerindeki tuz derişimlerinde partikül boyu nanometre düzeyinden mikrometre düzeyine yükselmektedir. Dikkat edileceği 0.2 M NaCl derişime kadar oldukça dar bir boy dağılımı elde edilmiştir. Ancak, daha yüksek derişimlerde boy dağılımıda önemli ölçüde genişlemektedir.

İlgili literatürde de tuz derişimi ile partikül boyu arasında benzer ilişkiler gösterilmiştir.Stirenin yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonunda partikül boyu ile sulu ortamın iyonik şiddet arasında logaritmik koordinatlarda doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Smigol ve ark.,1992). Goodwin ve arkadaşlarıda stirenden başlayarak hazırlanan küçük partiküllerin sentezinde aynı eğilimi gördüklerini rapor etmişlerdir (Goodwin ve ark., 1973). Stiren'in PEG-EEM

ile emülsiyon polimerizasyonunun çalışıldığı bir başka çalışmada ise logaritmik koordinatlarda partikül boyu ile sulu ortamın iyonik şiddeti arasında doğrusal bir ilişki olduğu, Smigol ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçların bu sistem içinde geçerli olduğu gösterilmiştir (Tuncel, 2000).

0.5 M NaCl derişimin üzerinde partiküllerin topaklanmaya başladığı not edilmelidir. Yüksek tuz derişimlerinde lateks sisteminin kararlılığının kaybolduğu ve partiküller arasında agregasyon (topaklanma) olduğu daha önce yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir (Xu ve ark., 1997). Ortama NaCl eklenmesiyle partiküllerin kalkanlama etkisi ("Shielding effect") azalmakta ve partiküller arası elektrostatik itme kuvvetleri azalmaktadır Bunun sonucu partiküller bir araya gelerek topaklanmaktadır.

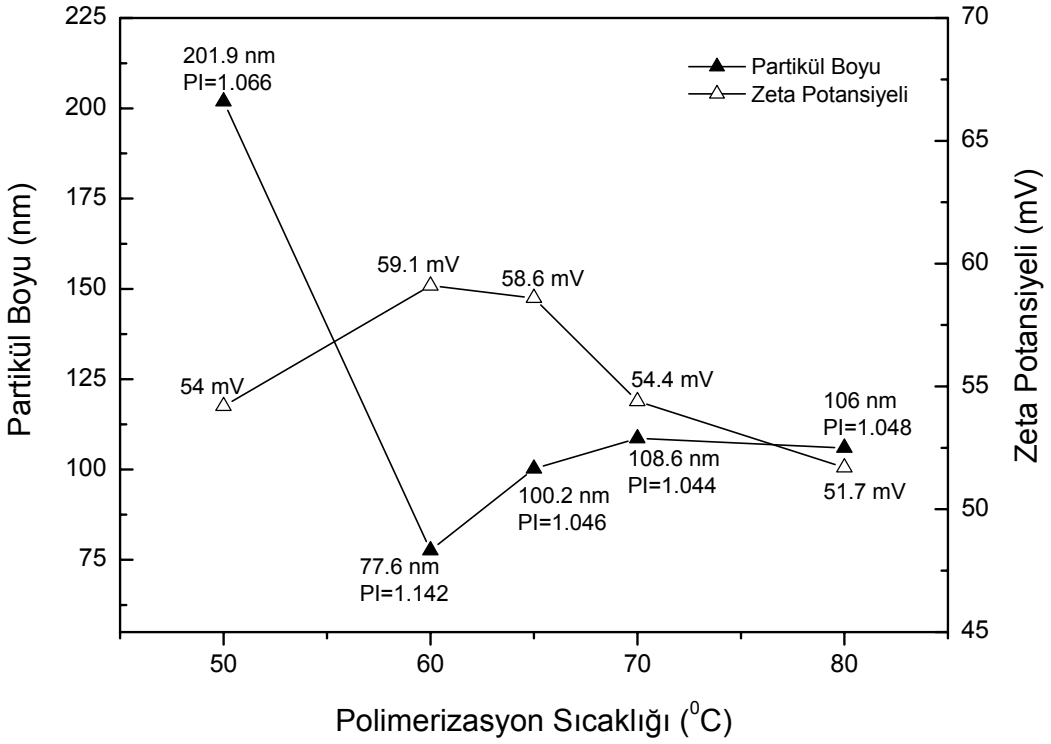
İyonik şiddetin artması ile zeta potansiyeli önemli ölçüde azalmaktadır. Bu da partiküllerin birbirini itme kuvvetlerini kaybetmesi sonucu ortamda artan miktarda bulunan tuz iyonlarının partikülün etrafında toplanması ile açıklanabilir. Partiküller katyonik yüklüdür. NaCl ise ortama pozitif Na^+ ve negatif Cl^- iyonları vermektedir. Pozitif yüklü partikül negatif yüklü Cl^- iyonları ile elektrostatik etkileşim içindedir, dolayısıyla toplam net yük azalmaktadır. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi zeta potansiyeli ölçümlerinde elde edilen sonuçlar iletkenlik ölçümleri ile oldukça iyi bir uyum içerisindedir.



Şekil 4.13. Ortam Tuz (NaCl) derişiminin nanopartikül yüzey yüküne etkisi: İletkenlik ölçümleri ile Zeta Sizer ölçümlerinin sonuçlarının karşılaştırılması.

4.1.9. Sıcaklığın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu gruptaki deneylerde kullanılan reaktifler su, St, PEG-EEM, DMAPM ve V-50 olup reçetedeki miktarları sırasıyla 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, ve 0.03 g dır. Ortam pH'ı 2.5-3 dür. Polimerizasyonlar değişik sıcaklıklarda (50°, 60°, 65°, 70° ve 80°C), azot atmosferinde 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Zeta Sizer'da elde edilen veriler Şekil 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.14. Polimerizasyon sıcaklığının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

Literatürde monomerde veya suda çözünen başlatıcılar varlığında stiren veya MMA polimerizasyonunda sıcaklığın polimerizasyon hızına olan etkisi çalışılmıştır (Guo ve ark.,1989; Gan ve ark.1992). Bu çalışmada toplam reaksiyon hızının her iki stabilizör türü için sıcaklık arttıkça arttığı rapor edilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla başlatıcı parçalanmasının hızlanması nedeniyle reaksiyon hızının arttığı şeklinde açıklanmıştır. Diğer bir çalışmada toplam dönüşümün de sıcaklık artmasıyla arttığı

gösterilmiştir (Rodriquea-Guadarrama ve ark., 1993). Bunun nedeni olarak artan sıcaklıkla, özellikle reaksiyon veren damlacıklardaki polimer monomer karışımının camsı geçiş sıcaklığı üzerindeki reaksiyon sıcaklığı ile makromoleküllerin hareketinin artması gösterilmiştir.

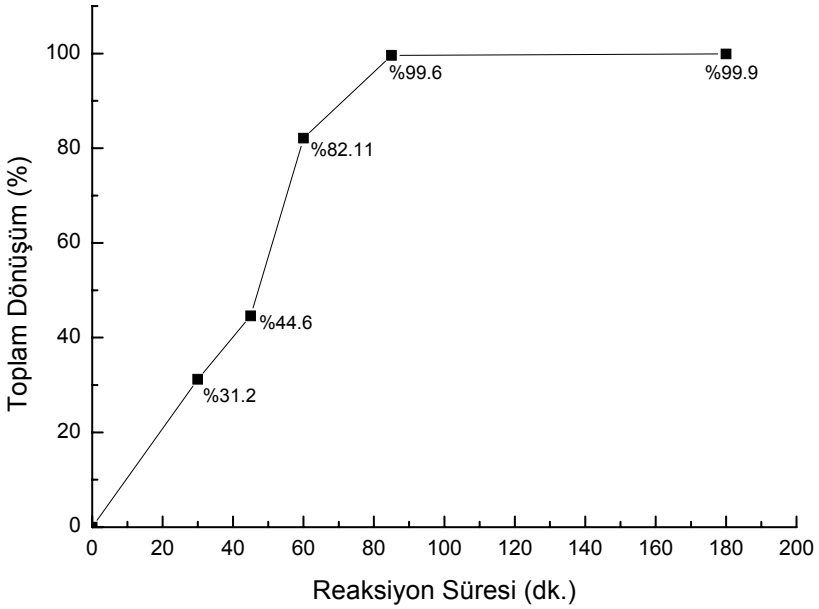
Şekilde görüldüğü gibi, sıcaklığın partikül boy ve dağılımına etkisi oldukça açık görülmektedir. 50°C de, büyük olasılıkla polimerizasyon hızının yavaş olması sonucu, partikül boyu diğer sıcaklıklara göre çok daha yüksek çıkmakta (201.9 nm), elde edilen lateksler mavimsi-şeffaflıktan (diğer sıcaklıklarda gözlenen) opak görünüme gitmektedir. Kullanılan reçete aynı olmasına rağmen partikül boylarının büyük olması şu şekilde açıklanabilir: kullanılan başlatıcı bu sıcaklıkta yeterince hızlı serbest radikal oluşturamadığı için reaksiyon ortamında bulunan radikallerin sayısı azdır. Dolayısıyla az sayıda radikal olması, az sayıda polimer çekirdeklerinin oluşmasına yol açmakta, bu da ortamda bulunan monomerin bu merkezlere difüzlenerek büyük partiküllerin oluşmasına yol açmaktadır.

Şekil 4.14'de görüldüğü gibi partikül boyu sıcaklıkla değişmesine karşın boy dağılımı sıcaklıktan çok fazla etkilenmemektedir, ve oldukça dar boy dağılımlı nanopartiküller üretilmektedir.

Sıcaklığın yüzey yüküne pek fazla etkisi yoktur. Farklı boyda partikül üretilmesine karşın aynı reçete (aynı miktarda katyonik başlatıcı) kullanıldığı için toplam yüzey yükü hemen hemen değişmez kalmaktadır.

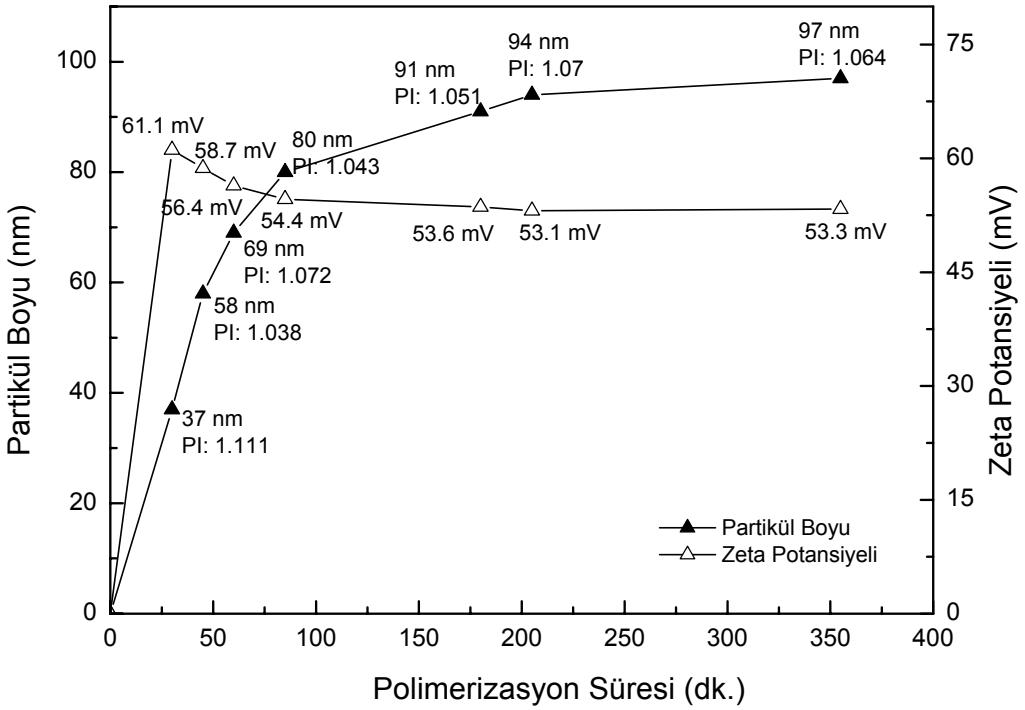
4.1.10. Zamanın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu çalışmada kullanılan reaktifler ve miktarları, sırasıyla, su, St, PEG-EEM, DMAPM ve V-50 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g olarak sabit tutulmuştur. Polimerizasyon pH'ı 2.5-3'e ayarlanmıştır. Polimerizasyonlar 65°C'de, azot atmosferinde sürdürülmüştür. Polimerizasyonlar değişik süreler için (0.5, 1, 3, 6, 12 ve 24 saat) saat aralığında incelenmiştir. Polimerizasyon toplam dönüşümüne zamanın etkisi Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Polimerizasyon süresinin toplam dönüşüme etkisi.

Şekil 4.15'de görülen değerler olarak gravimetrik olarak hesaplanmış yaklaşık değerlerdir. Şekilde görüldüğü gibi ilk üç saatte polimerizasyon tamamlanmıştır. Şekil 4.16'da da reaksiyon süresinin partikül boy/ boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi reaksiyonun ilk üç saati için incelenmiştir.



Şekil 4.16. Reaksiyon zamanının partikül boyuna etkisi

Şekil 4.15 incelendiğinde PEG makromonomerlerinin miktarı sabit tutulduğunda yüksek polimerizasyon hızları elde edilmiştir. Hidrofilisitenin azalmasıyla (PEG-EEM) polimerizasyon hızının azaldığı görülmektedir. Stiren harici tüm komonomerlerin sudaki çözünürlüğü daha yüksektir. Dolayısıyla, oluşan başlangıç emülsiyonunda makromonomerler hem su hem de damlacık fazı içinde belirli oranda dağılmaktadır. Hidrofilik olan makromonomerin başlangıç emülsiyonunda sulu fazda kalan kesrinin daha yüksek olması beklenir. Polimerizasyonda sulu fazda çözünen başlatıcı kullanılmaktadır. Dolayısıyla sulu fazda oluşan başlatıcı radikalleri hidrofilik makromonomer varlığında birim hacimde daha fazla sayıda makromonomer için gözlenen polimerizasyon hızının daha yüksek olmasını gerektirmektedir. Yapılan çalışmada görüldüğü gibi (Şekil 4.16) partikül boyu PEG-EEM makromonomeriyle sentezlenen nanopartiküller için ortalama değerlerine yaklaşık üç saatte ulaşmaktadır. Polidispersite indekslerini incelediğimizde polimerizasyon zamanının çok etkili olmadığını görmekteyiz. Hemen hemen tüm polimerzasyon sürelerinde monodispers partiküller elde edilmektedir. Partiküllerin yüzey yükleri de yüksektir. Bu durum sulu fazda oluşan

başlatıcı radikallerinin suda çözünürlüğü yüksek makromonomer ile başlatıcı makromonomer radikali oluşturma eğiliminin yüksek olması ile açıklanabilir. Dolayısıyla burada elde edilen sonuç, polimerizasyon hızına ait bulguyu destekleyici niteliktedir.

4.1.11. Ana monomer olarak Stiren Yerine Metil Metakrilat Kullanılması

Metil metakrilat (MMA) emülsiyon polimerizasyonunda sıkça kullanılan bir monomerdir. Stiren ile kıyaslandığında daha hidrofilik yapıdadır. Polimetil metakrilat bazlı fonksiyonel nanoküreler emülsiyon polimerizasyonu ile Sparnacci ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (Sparnacci, 2000). Burada ana monomer metil metakrilat'ın, iyonik komonomer 2-(dimetilamino) etil metakrilat ve non-iyonik komonomer poli(etilen glikol) metakrilat ile polimerizasyonu sonucu çekirdek-kabuk tipi nanoküre elde edilmiştir. Nanoküre boyutları 540-1080 nm, boy dağılımını gösteren polidispersite indeksi (PI) ise 1.02-1.93 aralığındadır. Bu çalışmada artan non-iyonik komonomer derişimi ile partikül boyunun büyüdüğü ve artan PEG zincirlerinin partikül kararlılığına sterik olarak katkıda bulunduğu rapor edilmiştir. İyonik komonomerin artışı ile partikül çapının küçüldüğü gösterilmiştir. Oluşan birincil partiküller iyonik komonomerin ortamda artmasıyla lateksler daha kararlı hale gelirken yüksek polaritedeki monomerin fazlalaşması ile çekirdeklenme süresi gecikmeli olarak gerçekleşip ve PI'da artışa neden olduğu belirtilmiştir.

Bu tez kapsamında, bu bölümde stiren yerine metil metakrilat (MMA) kullanılarak poli(MMA/PEG-EEM/DMAPM) nanopartiküler, yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Farklı MMA, PEG-EEM, DMAPM ve dispersiyon ortamı(su) miktarında nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu polimerizasyon reçeteleri Çizelge 4.2'de görülmektedir. Burada pH 2.5-3, sıcaklık 65°C'de ve süre 24 saat dir (azot atmosferinde). Çizelge 4.3'de Zeta Sizer ile elde edilen sonuçlar topluca sunulmuştur.

Çizelge 4.2. St yerine MMA kullanılarak yüzey aktif madde içermeyen polimerizasyonların reçeteleri.

Örnek	Su (ml)	MMA (ml)	DMAPM (ml)	PEG-EEM (ml)	V-50 (gr)
DMAPM Derişiminin Etkisi					
MMA1 (DMAPM 0 ml)	50	1.16	**0**	0.1	0.03
MMA2 (DMAPM 0.1 ml)	50	1.16	**0.1**	0.1	0.03
MMA3 (DMAPM 0.3 ml)	50	1.16	**0.3**	0.1	0.03
MMA4 (DMAPM 0.6 ml)	50	1.16	**0.6**	0.1	0.03
PEG-EEM Derişiminin Etkisi					
MMA2 (PEG-EEM 0.1 ml)	50	1.16	0.1	**0.1**	0.03
MMA5 (PEG-EEM 0.2 ml)	50	1.16	0.1	**0.2**	0.03
MMA6 (PEG-EEM 0.4 ml)	50	1.16	0.1	**0.4**	0.03
Su Derişiminin Etkisi					
MMA2 (Su 50 ml)	**50**	1.16	0.1	0.1	0.03
MMA7 (Su 120 ml)	**120**	1.16	0.1	0.1	0.03
MMA Derişiminin Etkisi					
MMA2 (MMA 1.16 ml)	50	**1.16**	0.1	0.1	0.03
MMA8 (MMA 4.64 ml)	50	**4.64**	0.1	0.1	0.03
V-50 Derişiminin Etkisi					
MMA2 (V-50 0.03 g)	50	1.16	0.1	0.1	**0.03**
MMA9 (V-50 0.01 g)	50	1.16	0.1	0.1	**0.1**

Çizelge 4.3. St yerine MMA kullanılarak yüzey aktif madde içermeyen polimerizasyonların Zeta Sizer ile elde edilen toplu sonuçları.

Örnek	Partikül Boyu (nm)	Polidispersite İndeksi (PI)	Zeta Potansiyeli (mV)
DMAPM Derişiminin Etkisi			
MMA1 (DMAPM 0 ml)	200.1	1.03	45.2
MMA2 (DMAPM 0.1 ml)	188	1.04	50
MMA3 (DMAPM 0.3 ml)	196	1.05	48
MMA4 (DMAPM 0.6 ml)	201	1.06	47
PEG-EEM Derişiminin Etkisi			
MMA2 (PEG-EEM 0.1 ml)	188	1.04	50
MMA5 (PEG-EEM 0.2 ml)	163	1.04	54
MMA6 (PEG-EEM 0.4 ml)	476	1.15	49
Su Derişiminin Etkisi			
MMA2 (Su 50 ml)	188	1.04	50
MMA7 (Su 120 ml)	258	1.05	48
MMA Derişiminin Etkisi			
MMA2 (MMA 1.16 ml)	188	1.04	50
MMA8 (MMA 4.64 ml)	2000	2	40
V-50 Derişiminin Etkisi			
MMA2 (V-50 0.03 g)	188	1.04	50
MMA9 (V-50 0.01 g)	842	1.163	43

Elde edilen önemli sonuçlarda şöyle genel davranış biçimi göze çarpmaktadır: Öncelikli olarak St yerine MMA monomeri kullanılarak elde edilen lateks kararlılıklarının daha kısa sürdüğü not edilmelidir. Bunun yanı sıra aynı polimerizasyon koşullarında ve benzer reçetelerle elde edilen MMA esaslı nanopartiküllerin boyları da St kullanılarak elde edilenlere göre daha büyüktür. Bunun MMA'nın St'ye göre daha hidrofilik olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Başka bir ifadeyle sulu fazdaki MMA monomer, sulu fazda St'ye göre daha fazla çözünmektedir. MMA'nın PEG-EEM radikalleri ile reaksiyona girmesiyle oluşan ve çekirdeklenmeyi başlatan oligoradikaller suda daha iyi çözünmekte, dolayısyla çekirdeklenmenin başlaması için oligomer zincir boyutunun St kullanımında oluşacaklara göre fazla olmaktadır. Çökme gecikmekte, sonuç olarak partiküller büyümektedir.

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi katyonik monomer (DMAPM) miktarının artması ile partikül boyunun çok fazla değişmediği, hatta hafif azaldığı gözlenmiştir. Partikül boyundaki bu azalmaya karşılık PI'da az da olsa bir artış not edilmiştir. PI'daki bu artış yukarıda söz edildiği gibi MMA'nın St'ye göre daha hidrofilik olması sonucu çekirdeklenme süresinin uzamasından kaynaklandığı söylenebilir. Yüzey yükü ise artan DMAPM miktarına bağlı olarak çok az artmaktadır. Oluşan nanopartiküllerin boyuna bağlı olarak yüzey alanı değişmekte ve dolayısıyla üzerine bağlanan başlatıcı ve katyonik monomer miktarı değişerek yüzey yükünü etkilemektedir.
Yüksüz PEG-EEM miktarının artmasıyla partikül boyu önce azalmakta daha sonra artmaktadır. Daha önce de söz edildiği gibi, suda çözünür komonomer varlığında suda çözünür oligoradikaller ve bunun çökmesiyle birincil partiküller oluşur. Burada PEG-EEM miktarının fazla olmasıyla birlikte ortamda bulunan birincil partikül sayısıda fazla olur. Bu partiküllerin büyümesi veya diğer birincil partiküllerle çarpışması sonucu partikül boyları artar. Yüzey yükleri ise partikül boyunun artmasıyla azalmaktadır. Bu da St ile çalışıldığında elde edilen sonuçlara benzerdir.

Dispersiyon ortamının (su) artmasıyla partikül boyunun arttığı, boy dağılımın (PI değerlerinin) ise hafifçe arttığı gözlenmiştir. Burada da oldukça monodispers partiküller elde edilmiştir. Zeta potansiyel değerlerinde önemli bir değişiklik yoktur. 50 mV civarında yüzey yüküne sahip partiküller sentezlenmiştir.

Ortamda bulunan ana monomer, MMA miktarının artmasıyla partikül boyu nanometre düzeyinden mikrometre düzeyine çıkmış ve boy dağılımı çok genişlemiştir. Lateks kararlılığı önemli ölçüde bozulmuştur. Partikül boyunun bu kadar büyümesiyle yüzey yükünde yaklaşık 10 mV'luk bir azalma görülmüştür. Bu da göstermektedir ki çekirdeklenme sırasında katyonik monomerin ve başlatıcının partiküle kazandırdığı yük partikül büyümesi sırasında fazla değişmemektedir.

Katyonik başlatıcı miktarının artmasıyla birlikte partikül boyu artmaktadır, PI değerleri ise biraz artmakla birlikte dar boy dağılımı gözlenmiştir. Yüksek başlatıcı derişimlerinde, az sayıda ama yüksek molekül ağırlıklı zincirler nedeniyle çekirdeklenme sırasında daha az sayıda polimerizasyon çekirdeği üretilmiş, bu da daha büyük partiküllerin oluşmasına yol açmıştır (Tuncel, 2000; Ganachaud ve ark., 1997; Xu ve ark., 1997; Sauzedde ve ark, 1997). Katyonik başlatıcı miktarının artmasıyla partikül yüzey yüklünde önemli bir değişiklik gözlenmemektedir. Ortamda bulunan başlatıcı miktarının artmasıyla birlikte yüzey yükününde artması beklenirken, partikül boyunun büyümesiyle ters olarak başlatıcının bu etkisi bastırılmış ve yüzey yükünde önemli bir değişiklik olmamıştır.

Bu bölüm deneylerde, çalışma kapsamında önerilen MMA bazlı katyonik nanopartiküllerin boy bakımından mikroemülsiyon aralığında olması, boy dağılımının dar (hemen hemen monodispers) ve hemen hemen uygulanan tüm reçetelerde yüksek yüzey yüklerinde üretilmesine karşın yeterli kararlılıkta olmaması nedeniyle çalışmanın devamında kullanılmamasına karar verilmiştir.

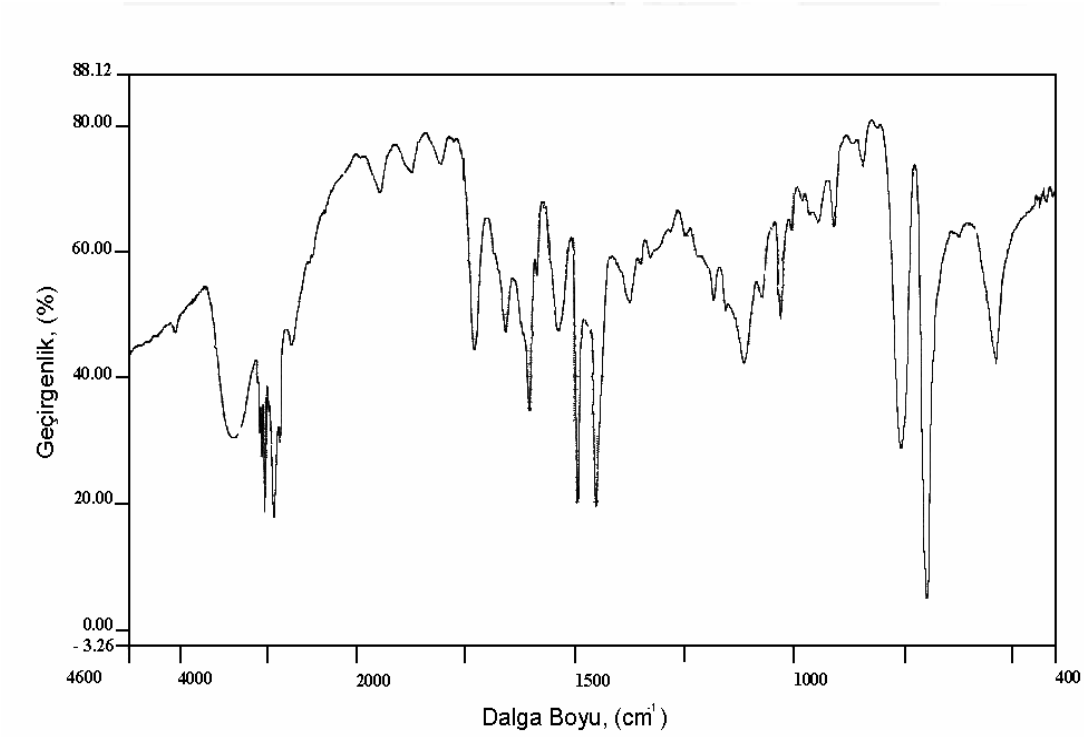
4.1.12. Fonksiyonel Grup İçermeyen Nanopartiküllerin Yapısal Analizi

Sentezlenen poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin yapısal analizi ilk adımda FTIR ile gerçekleştirilmiştir. Yukarıdaki deneyler sonucu elde edilen en küçük partiküle ait FTIR spektrumu örnek olarak Şekil 4.17'de sunulmuştur. Burada KBr peleti üzerinde elde edilen karakteristik pikler Çizelge 4.4'de verilmiştir (Erdik,1993).

Çizelge 4.4. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.

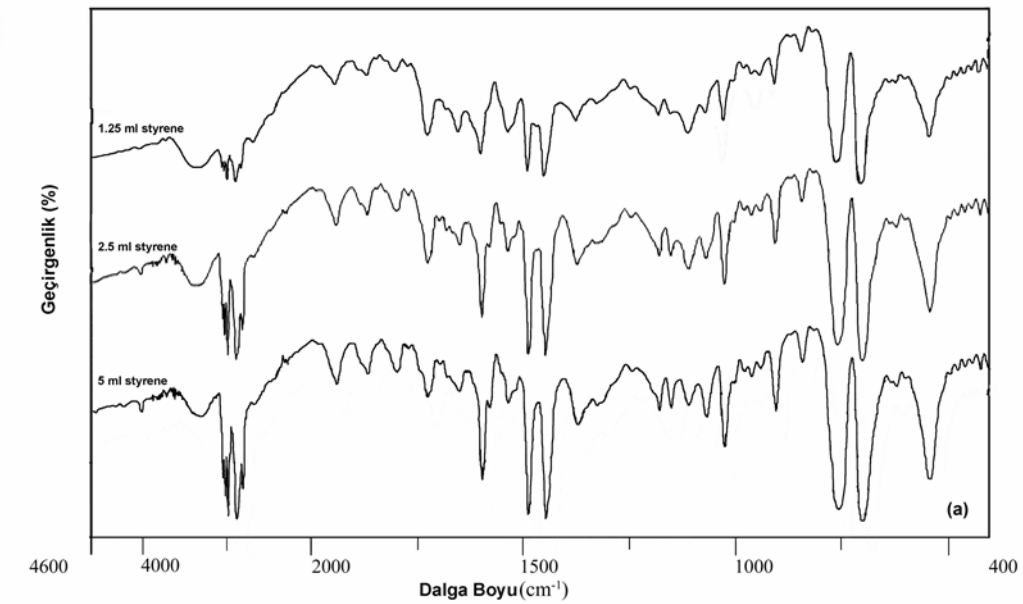
Dalga Boyu, cm^{-1}	**Fonksiyonlu Grup**
3300	Amid II bandı, NH gerilmesi
3100-3300	Aromatik CH
1950	C=O bandının yansıması
1875,1800	C=O gerilmesi
1730	C=O gerilmesi
1650	NH düzlem içi eğilmesi
1600	Aromatik benzen halkası, C=C gerilmesi
1530	NH gerilmesi
1490	NH deformasyonu, amid II bandı
1450	CH_2 makaslaması
1380,1360	CH_3 deformasyonunun çift bükülme bandı
1335	CH_2 eğilmesi
1235	Trans- amid III bandı
1175	CN gerilimi
1160, 1125 , 1075	C-O-C düzlem içi eğilmesi
975-840	Ana zincirdeki C-C gerilmesi
760	Monosübstitüye benzenin düzlem dışı deformasyonu
700	CH eğilmesi
625	Düzlem dışı CH deformasyonu
540	C=O düzlem dışı eğilmeleri

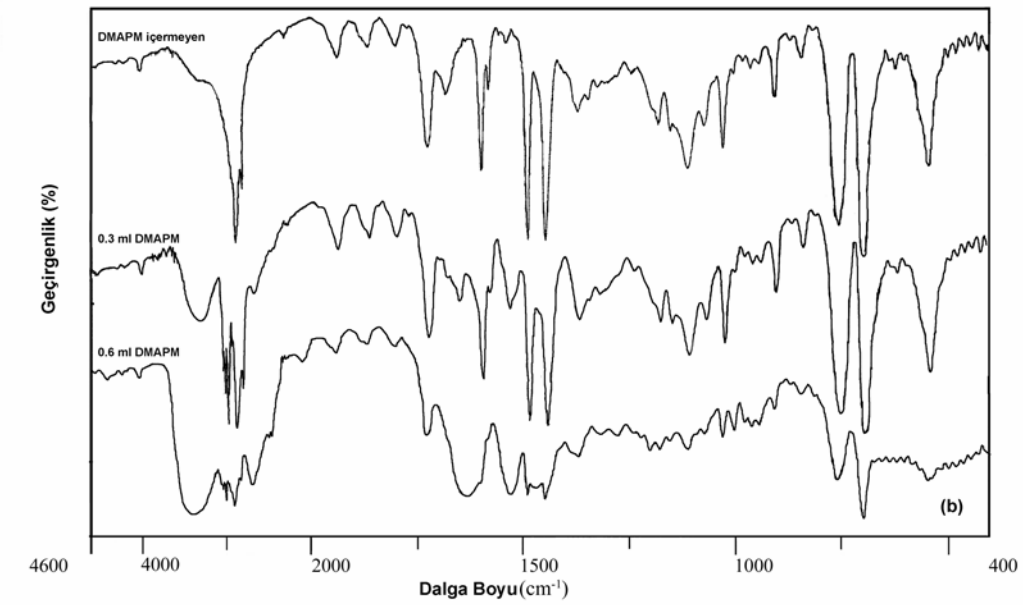
Bu spektrumda karakteristik pikler sırasıyla, St'e ait aromatik benzen halkası (C=C gerilmesi) 1600 cm^{-1} de, DMAPM'ye ait C=O'ya bağlı N-H düzlem içi eğilmesi 1650 cm^{-1} de ve PEG-EEM'e ait C=O piki 1730'da şiddetli şekilde görülmektedir. FTIR spektrumundan St, DMAPM ve PEG-EEM arasında kopolimerizasyonun gerçekleştiği görülmektedir. Burada kopolimerizasyon sırasında dönüşmemiş monomerlerin, kopolimerizasyon sonrası en az üç kez tekrar edilen su ile yıkama işlemlerinde uzaklaştırıldığı not edilmelidir.

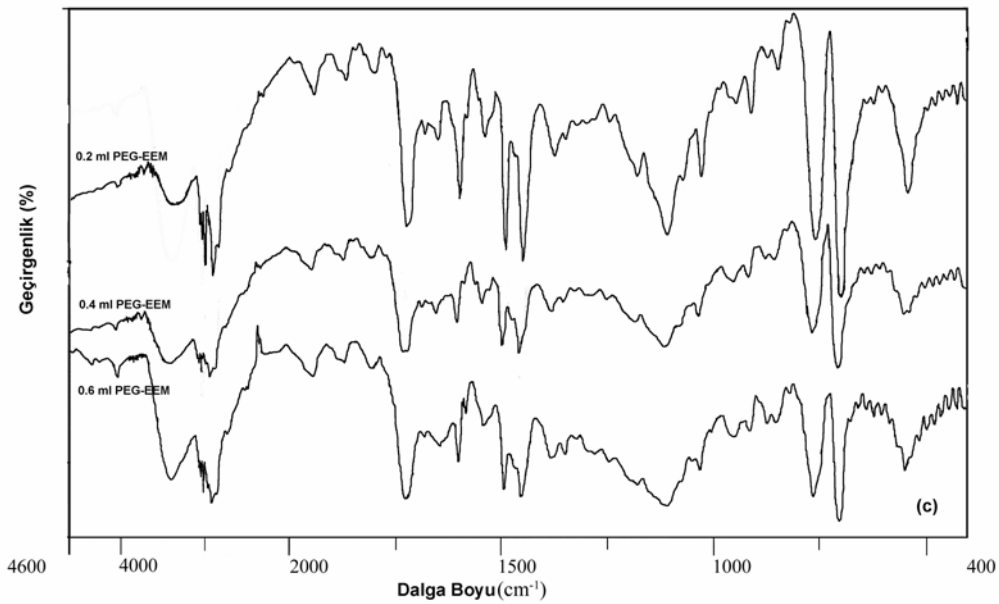


Şekil 4.17. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin FTIR spektrumu.

Ayrıca değişik monomer ve komonomer miktarlarında sentezlenen Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin yapısı FTIR analizi ile incelenmiştir. Burada reaksiyona giren St, DMAPM ve PEG-EEM miktarları değiştirilmiş ve oluşan polimerlerin FTIR spektrumlarında monomerin veya komonomerin karakteristik piklerindeki değişimler izlenmiştir (Şekil 4.18).


1.25 ml styrene
2.5 ml styrene
5 ml styrene
Geçirgenlik (%)
(a)
4600
4000
2000
1500
1000
400
Dalga Boyu(cm-1)


DMAPM içermeyen
0.3 ml DMAPM
0.6 ml DMAPM
Geçirgenlik (%)
(b)
4600
4000
2000
1500
1000
400
Dalga Boyu(cm-1)

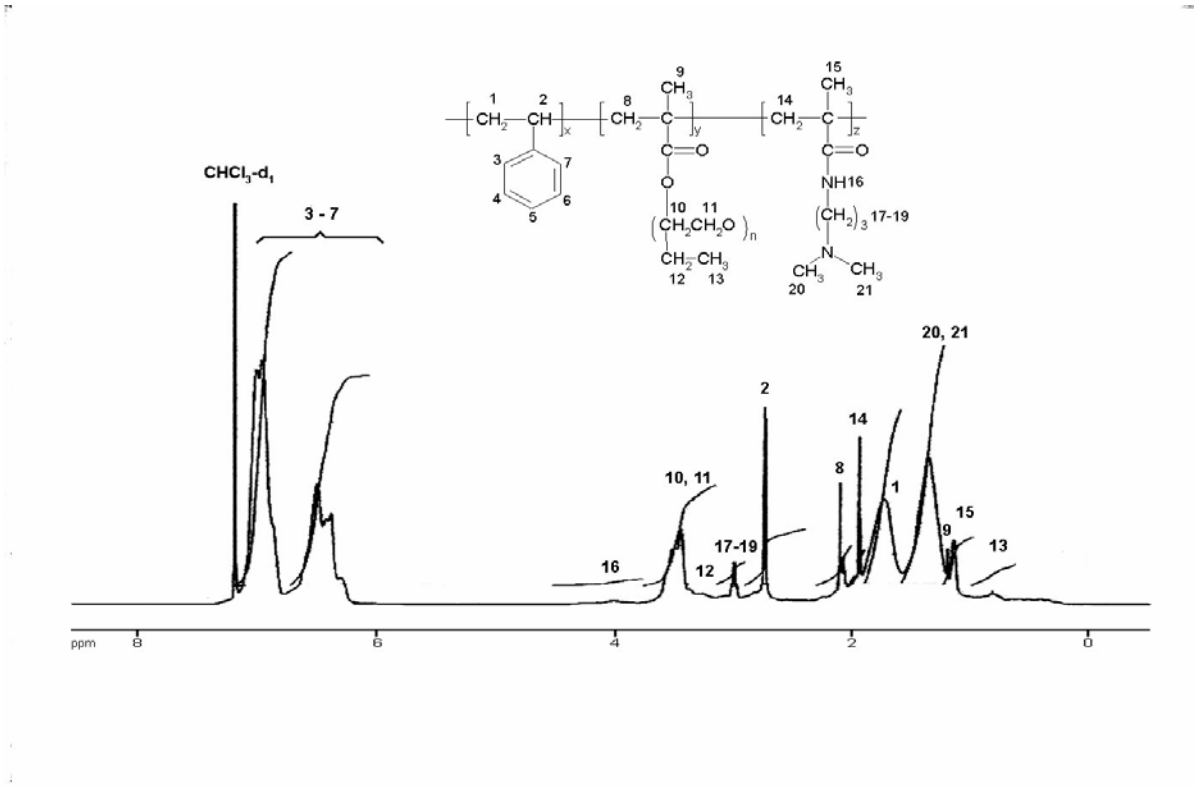


Şekil 4.18. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin değişik monomer ve komonomer miktarları için elde edilen FTIR spektrumları: (a) St miktarına göre; (b) DMAPM miktarına göre; ve (c) PEG-EEM miktarına göre.

Yapılan deneysel çalışmalarda St miktarı 1.25-5 ml aralığında değiştirilmiştir. Buna göre FTIR spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.18a), St ait aromatik benzen halkası (C=C gerilmesi) 1600 cm^{-1} de yer almaktadır. Artan St miktarı ile bu pikin şiddeti de önemli ölçüde artmaktadır. Bu artış, oluşan polimer zincirinde yer alan St moleküllerinin daha fazla sayıda olduğunu göstermektedir. Katyonik monomer DMAPM miktarı ise 0-0.6 ml aralığında değiştirilmiş ve spektrumda (Şekil 4.18b) görüldüğü gibi DMAPM'ye ait karakteristik piklerin (ikinci amid bandı, NH gerilmesi 3300 cm^{-1} ve C=O'ya bağlı N-H düzlem içi eğilmesi 1650 cm^{-1}) hem şiddetleri hem de pik genişlikleri artmış ve bu da polimer zincirine artan miktarda DMAPM girdiğini kanıtlamıştır. PEG-EEM miktarı 0.2-0.6 ml aralığında değiştirilerek sentezlenen polimerlerin de FTIR spektrumları Şekil 4.18c sunulmuştur. Burada PEG-EEM'e ait karakteristik pikin (C=O 1730 cm^{-1}) yine artan PEG-EEM miktarı ile önemli ölçüde şiddetlendiği görülmektedir ki bu da polimer zincirine daha fazla PEG-EEM molekülü bağlandığı ifade etmektedir.

Sentezlenen poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin yapısal analizi için ^{1}H-NMR de gerçekleştirilmiştir. En küçük boyutlu partiküle ait reçeteden elde edilen

terpolimere ait ^{1}H-NMR spektrumu ve kimyasal formülü örnek olarak Şekil 4.19'da verilmiştir. ^{1}H-NMR spektrumunda gözlenen piklerin terpolimer yapısında hangi gruba karşılık geldiği spektrum üzerinde gösterilmiştir. Spektrumda görülen kimyasal kaymalar sırasıyla (27°C de $CHCl_3$ içinde-*d1*), δ ppm: stiren birimine ait (1) 1H, CH (ana zincir) 2.40-2.39, (2) 2H, CH_2 (ana zincir) 1.72, (3-7) 5H, CH (benzen halkası) (geniş pikler) 6.97-7.02 ; PEG-EEM birimine ait (8) 2H, CH_2 (ana zincir) 2.08-2.05, (9) 3H, CH_3 1.19, (10,11) 2H, CH_2 3.76-3.28, (12) 2H, CH_2 3.43, (13) 3H, CH_3 0.85-0.74; DMAPM birimine ait (14) 2H, CH_2 (ana zincir)1.98, (15) 3H, CH_3 1.14, (16) 1H, NH (geniş pik) 4.19-3.90, (17-19) 2H, CH_2 (geniş pik) 3.17-3.02, (20-21) 3H, CH_3 1.35 piklerdir.



Şekil 4.19. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu.

Terpolimerin kompozisyonu St, DMAPM ve PEG-EEM'e ait ^{1}H-NMR spektrumlarındaki fenil (-CH) ve metin(-CH) grubuna ait integral alanlarının karşılaştırılması ile bulunmuştur (Dinçer ve ark., 2002). Terpolimerde spektrumunda görülen fenil piki (δ 6.97 ppm) terpolimerdeki St birimine aittir. DMAPM'e ait $(CH_2)_3$ 2.7 ppm'de ve PEG-EEM'e ait $(CH_2CH_2)_{n=3}$ 3.5 ppm'de görülen spesifik piklerdir. Aynı spektrumda yer alan spesifik piklerin integrasyonlarının oranlanmasıyla kopolimer zinciri üzerindeki komonomer

oranlarını belirlemek mümkündür. Bu yöntem kullanılarak spektrumdaki fenil pikinin (δ 6.97 ppm) alanı, $(CH_2)_3$ (δ 2.7 ppm) ve $(CH_2CH_2)_{n=3}$ (δ 3.5 ppm) piklerinin alanlarına ayrı ayrı oranlanmış, ayrıca $(CH_2)_3$ (δ 2.7 ppm) pikinin alanı $(CH_2CH_2)_{n=3}$ (δ 3.5 ppm) pikinin alanına oranlanarak üretilen terpolimerin mol temelinde yüzdeleri belirlenmiştir.

^{1}H-NMR analizinden poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimeri içerisindeki monomer birimlerinin (St, DMAPM ve PEG-EEM birimi) mol oranı (m_1:m_2:m_3) aşağıda verilen formülden hesaplanabilir (Kesim ve ark., 2003 ve Köseli ve ark., 2003):

$$Am_1 / A_{toplam} = n_1 m_1 /(a_1 m_1 + b_1 m_2 + c_1 m_3)$$

$$Am_2 / A_{toplam} = n_2 m_2 /(a_1 m_1 + b_1 m_2 + c_1 m_3) \qquad (4.1)$$

$$Am_3 / A_{toplam} = n_3 m_3 /(a_1 m_1 + b_1 m_2 + c_1 m_3)$$

Burada Am_1, Am_2 ve Am_3, ^{1}H-NMR spektrumunda monomer birimlerdeki fonksiyonel grupların normalize edilmiş alanları (sırasıyla St, DMAPM ve PEG-EEM), A_{toplam} kopolimerdeki protonların toplam alanını, n_1, n_2 ve n_3 monomerlerin fonksiyonel grubundaki protonların tam sayısı, *a*, *b* ve *c* monomer birimlerindeki protonların tamsayısını gösterir. Yukarıdaki eşitlikler düzenlenerek monomer birimlerinin mol oranları aşağıda verilen formüllerden hesaplanmıştır. Bu yönteme göre terpolimer kompozisyonu stiren için 76.8 % mol, DMAPM için 10 % mol ve PEG-EEM için 13.2 % mol olarak bulunmuştur.

$$m_1 / m_2 = n_2 Am_1 / n_1 Am_2$$

$$m_2 / m_3 = n_3 Am_2 / n_2 Am_3 \qquad (4.2)$$

$$m_1 + m_2 + m_3 = 100$$

Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimeri içerisindeki monomer birimlerinin (St, DMAPM ve PEG-EEM birimi) teorik mol oranları (m_1:m_2:m_3) Alfrey-Goldfinger eşitliği olarak bilinen aşağıdaki formülden hesaplanmıştır (Ham, 1964).

$$m_1 : m_2 : m_3 = M_1[\frac{M_1}{r_{31}r_{21}} + \frac{M_2}{r_{21}r_{32}} + \frac{M_3}{r_{31}r_{23}}][M_1 + \frac{M_2}{r_{12}} + \frac{M_3}{r_{13}}] :$$
$$M_2[\frac{M_1}{r_{12}r_{31}} + \frac{M_2}{r_{12}r_{23}} + \frac{M_3}{r_{32}r_{13}}][M_2 + \frac{M_1}{r_{21}} + \frac{M_3}{r_{23}}] : M_3[\frac{M_1}{r_{13}r_{21}} + \frac{M_2}{r_{23}r_{12}} + \frac{M_3}{r_{13}r_{23}}][M_3 + \frac{M_1}{r_{31}} + \frac{M_2}{r_{32}}] \quad (4.3)$$

Bu eşitlikte m_1, m_2, m_3 terpolimer içerisindeki monomer birimlerinin mol oranlarını, M_1, M_2, M_3 beslemede bulunan monomer birimlerinin mol oranlarını (sırasıyla 91.8, 4.7 ve 3.5) , r değerleri ise monomer birimlerinin birbirlerine göre olan reaktiflik oranlarını (Çizelge 4.5) vermektedir. Literatürden (Brandrup,1989) St/DMAP, St/PEG-EEM ve DMAPM/PEG-EEM monomer birimleri arasındaki reaktiflik oranları bulunamadığı için kimyasal yapılarının benzediği düşünülen DMAPM yerine N,N dimetil akrilamid (DMA) ve PEG-EEM yerine metil metakrilat'a (MMA) ait reaktiflik değerleri kullanılmıştır. Buna göre monomerler arasındaki reaktiflik oranları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Monomerlere ait reaktiflik oranları (Brandrup, 1989).

Monomer Birimi	**Reaktiflik Oranları**
St / DMAPM (r_{12})	1.15
DMAPM / St (r_{21})	0.12
St / PEG-EEM (r_{13})	0.49
PEG-EEM / St (r_{31})	0.42
DMAPM / PEG-EEM (r_{23})	0.41
PEG-EEM / DMAPM (r_{32})	1.65

Ayrıca bir monomer radikalinin reaktiflik değeri ne kadar birden büyükse kendi monomerine, birden ne kadar küçükse diğer monomere katılma isteğinin o derece fazla olduğu not edilmelidir. Yukarıda bulunan reaktiflik oranları ve Alfrey-Goldfinger eşitliği kullanılarak bulunan teorik mol oranları göz önünde

bulundurularak incelenen St/PEG-EEM/DMAPM kopolimerizasyon sisteminde terpolimer yerine homopolimer veya kopolimer oluşturma eğiliminin oldukça düşük olduğu gözlenmişir. Çizelge 4.6'da verilen terpolimer mol oranları incelendiğinde ise ^{1}H-NMR spektrumundan elde edilen monomer birimlerine ait mol oranlarının teorik olarak bulunan mol oranlarından biraz farklı olduğu görülmüştür. Bu farklılığın monomerlerin reaktiflik oranlarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Literatürde her bir monomere ait gerçek reaktiflik değeri bulunamadığı için benzer yapıdaki monomerlerin reaktiflik değerlerini kullanılmış ve hesaplamalar buna dayanarak yapılmıştır. Çalışmanın geri kalan kısmında herhangi bir yaklaşımda bulunulmadan terpolimerin direkt analizi sonucu elde edilen ^{1}H-NMR spektrumundan hesaplanan mol oranları kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. ^{1}H-NMR spektrumundan hesaplanan kopolimer içerikleri

Monomer Birimi	**Teorik, %mol**	**^{1}H-NMR, %mol**
St	89.3	76.8
DMAPM	4	10
PEG-EEM	6.7	13.2

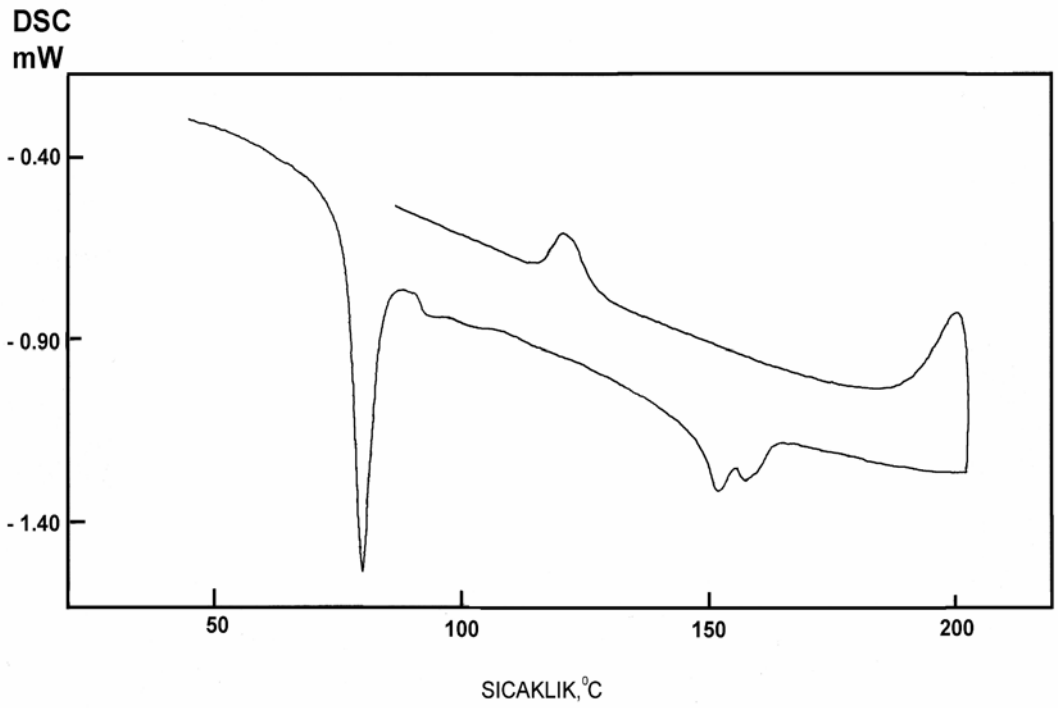
Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin yapısal analizi ayrıca elementel analiz yöntemiyle de gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu kısmında terpolimerin yapısında bulunan C, H ve N içerikleri mol yüzdesi olarak bulunmuştur. Elementel analiz ile elde edilen değerlerin ^{1}H-NMR spektrumundan hesaplanan değerlerle uyum içinde olduğu Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Teorik değerlerin diğerlerinden biraz farklı olması yine monomerlerin reaktiflik oranlarından kaynaklanmaktadır. Literatürden bulunan reaktiflik oranları terpolimerde bulunan monomerlere direkt olarak ait değildir, yapılarının benzediği düşünülen analoglarına ait reaktiflik değerleridir. Dolayısıyla analoglarına dayanılarak yapılan hesaplamalardan elde edilen mol oranları, terpolimerin kendisinin analizi ile elde edilen değerlerden farklılık göstermektedir.

Çizelge 4.7. Terpolimere ait elementel analiz sonuçları

	Teorik, %mol	Elementel Analiz, % mol	^{1}H-NMR, %mol
C	86.1	83.6	76.8
H	7.9	5.8	7.9
N	1.1	1.6	2.2

4.1.13. Termal Analiz

Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin termal özelliklerinin belirlenmesi için "Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)" kullanılmıştır. Elde edilen polimere ait termogram Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin DSC termogramı

Analiz için örnek 200°C'ye kadar ısıtılmış ve bu ısıtma sırasında polimerin sıcaklık davranışı incelenmiştir. Örnek termogramda amorf yapıyı gösteren ikincil geçiş sıcaklığı olarak bilinen camsı geçiş sıcaklığına (T_g) ait endotermik pik yaklaşık

90°C'de görülmüştür. Camsı geçiş sıcaklığına ait literatürde yer alan benzer çalışmalar kıyaslandığında, stiren'e ait camsı geçiş sıcaklığının 102°C 'de (Chen ve ark., 1999) olduğu görülmektedir. Yapılan bir başka çalışmada ise PEG makromeri ile kopolimerleşen *N*-izopropil akrilamid'e ait rapor edilen T_g değeri 95°C'dedir (Leobandung ve ark., 2002). Bu bilgilerin ışığında terpolimer için elde edilen T_g değerinin literatürle uyum içinde olduğu söylenebilir. Yaptığımız çalışmaya ait termogramda aynı polimere ait birisi 150°C'de diğeri 158°C'de olmak üzere iki tane erime piki görülmüştür. Terpolimere ait bu iki erime piki polimerin iki segment halinde eridiğini göstermektedir. Bu erime segmentlerinin birinin stirene diğerinin ise PEG-EEM'e ait olduğu düşünülmektedir. Bu piklerden elde edilen iki tane erime sıcaklığı (T_m) bulunmuştur. Polimerin yarı-kristal yapıda olduğunu gösteren kristalizasyon sıcaklığı (T_c) ise örneğin ısıtıldıktan sonra soğutulması sırasında elde edilen soğuma eğrisi üzerinde, yaklaşık 120 °C'de yer alan pik ile belirgin bir şekilde görülmektedir. Bu yarı-kristal yapının terpolimer zincir yapısında bulunan PEG-EEM'e ait birimlerden geldiği düşünülmektedir.

4.1.14. Molekül Ağırlığı

Araştırma kapsamında sentezlenen kopolimerin ortalama molekül ağırlığının bulunması amacı ile viskozimetrik yöntem kullanılmıştır. Bunun için bir Ubbelohde kapiler viskozimetresi kullanılmıştır.

Kopolimerin intrinsik viskozite değeri, $[\eta]_{in}$ 1.35 dl/g olarak bulunmuştur. Bunun için ölçümler 0.1, 0.2, 0.4 ve 0.6 g/dl olmak üzere dört ayrı derişimde kopolimerlerin kloroform içinde çözeltileri hazırlanıp, 25°C'de bu çözeltilerin akış zamanları (t) ve çözücünün akış zamanı (t_0) belirlenmiştir. Bu iki zamanın oranlanmasıyla bağıl viskozite değeri bulunmuştur ($\eta_{bağıl}= t/t_0$). Özgül viskozite ise bağıl viskozite değerinden bir çıkarılmasıyla bulunur ($\eta_{özgül}= \eta_r-1$). Derişime (C, g/dl) karşı $\ln(\eta_{bağıl})/C$ ve derişime (C, g/dl) karşı $\eta_{özgül}/C$ grafiğe geçirilerek doğrusal regresyon ile doğruların kesişerek y eksenini kestiği noktadan intrinsik viskozite bulunmuştur (Şekil 4.21). Bu iki doğrunun eğimleri arasındaki farkın $\left(k' - k''\right)$ 0.5'e yakın olması doğrusal regresyonun doğruluğunu göstermektedir (Sperling, 1992). Şekil 4.18'de görüldüğü gibi doğruların eğimleri sırasıyla 0.4966 (k') ve -0.3661(k'') dür. Buna göre $\left(k' - k''\right) = 0.8627$ dir. Bulunan bu değer 0.5'e yakın bir değer

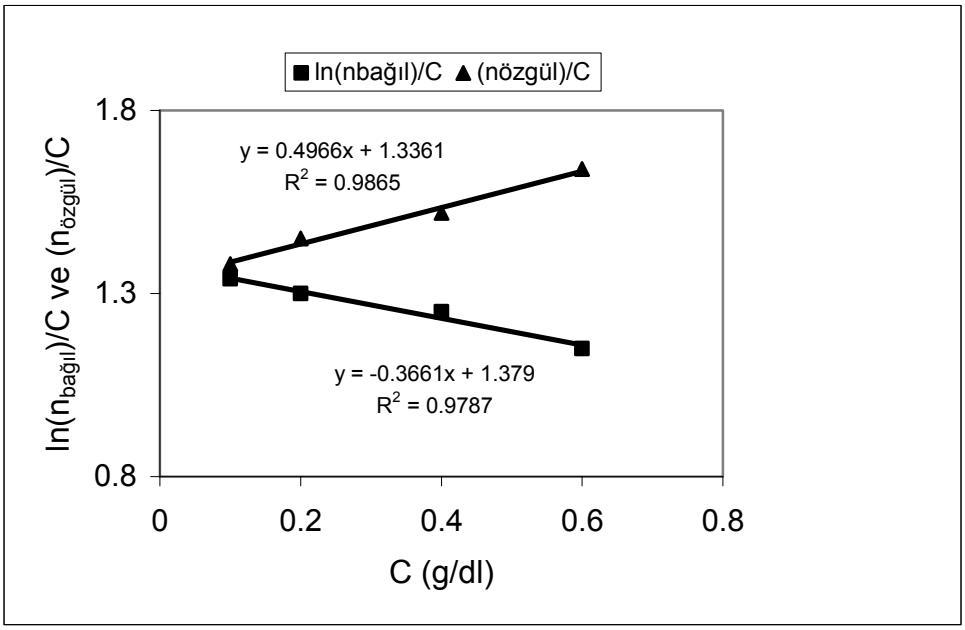
olduğu için doğrusal regresyonun doğruluğu kabul edilmiş ve bu eğim değerleri esas alınarak intrinsik viskozite değeri bulunmuştur. Aşağıdaki eşitlikte görüldüğü gibi intrinsik viskozite ile molekül ağırlığı arasında doğru orantı vardır.

$$\eta = KM^{a} \quad \text{(Mark-Houwink)} \qquad (4.4)$$

Burada, K ve a sıcaklık, çözücü ve polimere göre değişen sabitlerdir. Bu sabitler doğru olarak bulunabilirse, bu eşitlik ve intrinsik viskozite değerinden molekül ağırlığı hesaplanabilir.

Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimeri için literatürde rapor edilen K ve a değerlerine rastlanmamıştır. Bununla birlikte stiren homopolimeri için kloroformda 25°C 'de K ve a sabitleri sırasıyla $1.12X10^{-4}$ cm^3/g ve 0.73 olarak verilmiştir (Brandrup, 1989). Homopolimer ile karşılaştırıldığında terpolimerin K ve a değerleri biraz farklılık gösterebilir ancak terpolimerin yapısında bulunan stiren'in diğer komonomerlere göre oldukça çok miktarda olması nedeniyle polistiren için bulunan bu sabitlerin terpolimer için de kullanılabileceği düşünülmüştür. Birincil kalibrasyon değerleri aşağıda verilen Mark-Houwink eşitliğinde yerine konularak viskozimetrik molekül ağırlığı (M_v) 3.89 X 10^5 olarak bulunmuştur.

$$[\eta] = 1.12X10^{-4} M_v^{0.73} \qquad (4.5)$$



Şekil 4.21. Poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin intrinsik viskozite $[\eta]_{in}$ değerinin belirlenmesi.

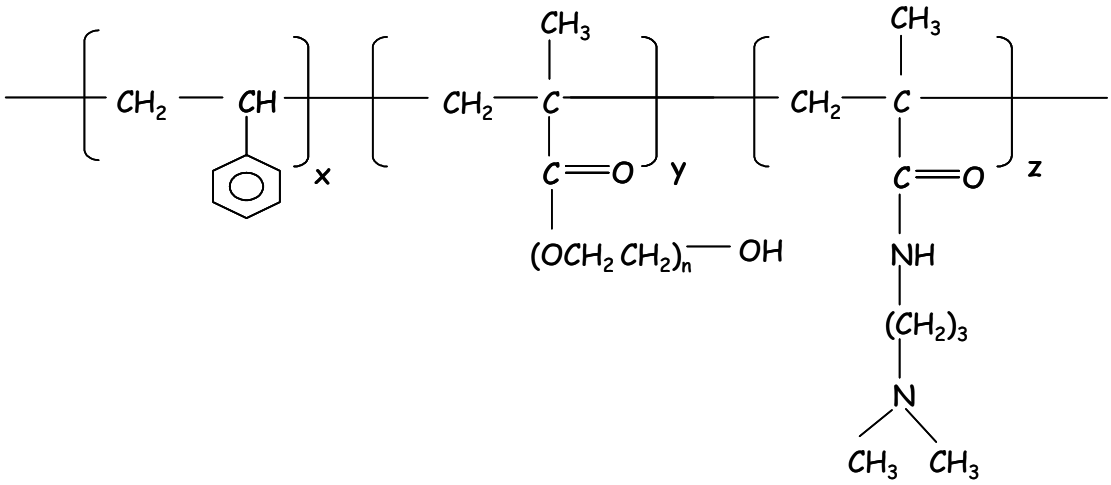
Sentezlenen poli(St/PEG-EEM/DMAPM) terpolimerinin ortalama molekül ağırlığı ve polidispersite indeksi "Jel Geçirgenlik Kromotogrofisi" (GPC) ile de belirlenmiştir. Ölçümlerde çözücü ve taşıyıcı olarak kloroform kullanılmıştır. Sistem sıcaklığı 25 ^{o}C 'de sabit tutulmuştur. 105000, 50000 ve 17500 molekül ağırlıklarına sahip polistiren standartlar kullanılarak, alıkonma süresine karşı molekül ağırlıkları grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Daha sonra polimer hazırlanan polimer çözeltileri sisteme enjekte edilerek orjinal kromatogramlar elde edilmiştir. Bunlar birincil kalibrasyon yöntemine göre değerlendirilerek ağırlıkça (M_w) ve sayıca (M_n) ortalama molekül ağırlıkları ile polidispersite indeksleri ($PI=M_w/M_n$) sırasıyla 7.41 X 10^6, 4.05 X 10^6 ve 1.83 olarak bulunmuştur.

Yukarıda verilen sonuçlara da görüldüğü gibi molekül ağırlığı milyon mertebesindedir. Emülsiyon polimerizasyonunda, ortalama molar kütle ve dağılımları, monomere zincir transfer reaksiyonu ile kontrol edilir (Gilbert ve ark., 1995). Bu nedenle polistiren için beklenen molekül ağırlıkları 10^5-10^6 civarındadır (Sperling, 1992). Her bir mikrolateks partikülünde düşük radikal konsantrasyonundan dolayı yüksek molekül ağırlıklarına ulaşılmaktadır. Bir

mikrolateks partikülünde ne kadar az radikal olursa, tek bir zincir o oranda uzayacak ve dolayısıyla çok yüksek molekül ağırlıklarına ulaşılacaktır.

4.2. Fonksiyonel Grup İçeren Nanopartiküller

Bu bölümde önceki bölümde sentezlenen nanopartiküllerden farklı olarak yüzeylerinde hidroksil grubu (MA'dan gelen) taşıyan nanopartiküller üretilmiştir. Tek fark PEG-EEM oligomeri (makromeri) yerine PEG-MA kullanılmasıdır. Üretilen terpolimer nanopartiküllerin kimyasal yapısının Şekil 4.22'de verilen yapıda olması beklenmektedir.



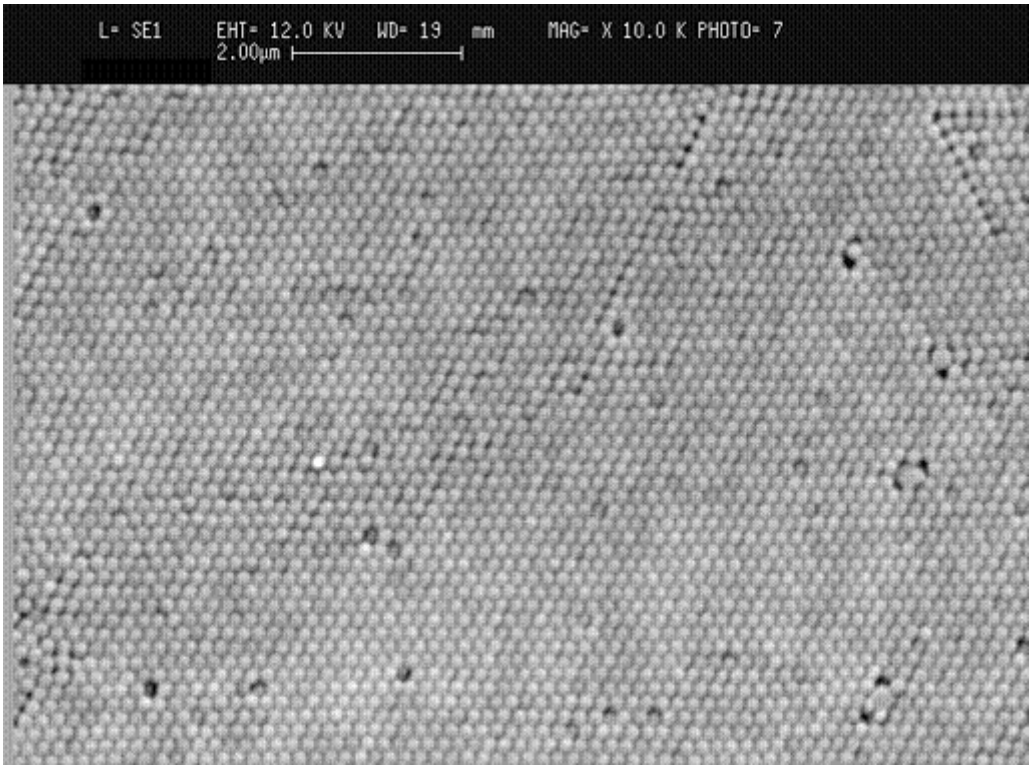
Şekil 4.22. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin kimyasal yapısı.

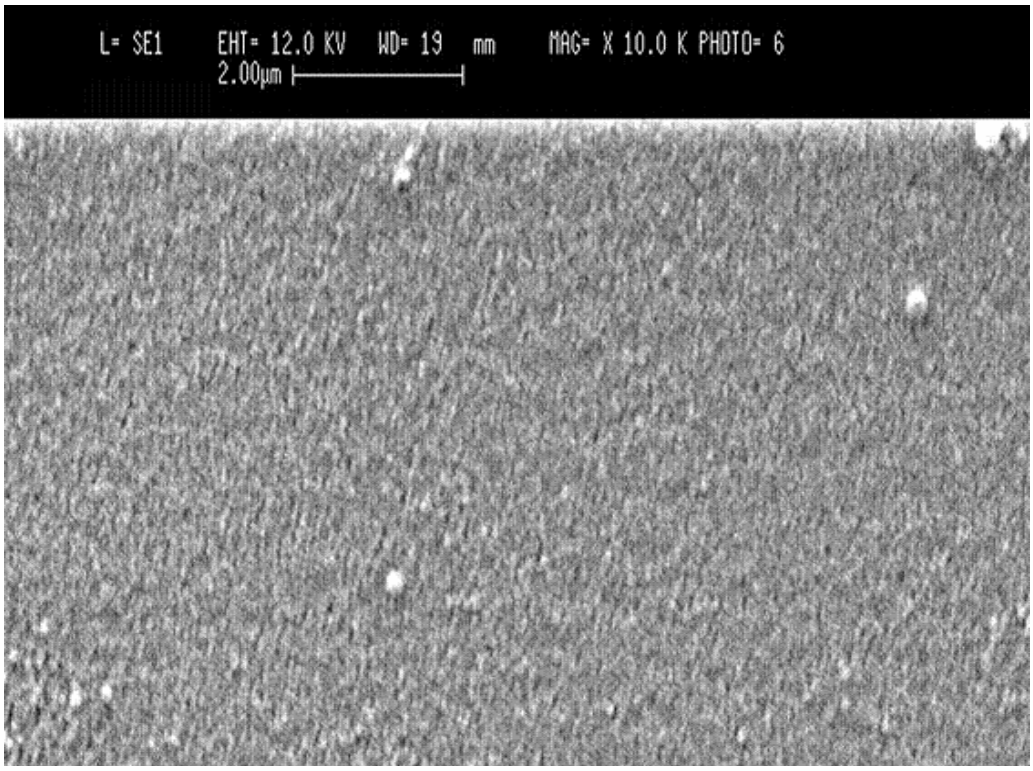
Bu bölüm deneylerde bir önceki bölümde optimize edilen ve en küçük boy/boy dağılımı veren reçete seçilmiş ve çalışmanın geri kalan kısmında bu reçete temel reçete olarak uygulanmıştır: Su, St, DMAPM ve V-50 miktarları sırasıyla 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml ve 0.03 g dır. PEG-MA içeriği 0.1 ml-0.4 ml aralığında değiştirilerek partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne olan etkileri incelenmiştir. Ortam pH'sı 2.5-3 dür ve 0.1 N standard HCl ile ayarlanmıştır. Önceki bölümde olduğu gibi polimerizasyon sıcaklığı ve süresinin de etkileri araştırılmıştır.

Bu grupta iki farklı sıcaklıkta sentezlenen nanopartiküllerin SEM fotoğrafları Şekil 4.23'de örnek olarak sunulmuştur. Şekil 4.23a'da verilen, 60°C'de sentezlenen nanopartiküllerin küresel ve hemen hemen monodispers olduğu görülmektedir. Fotoğraf üzerinden ölçülen ortalama çapları yaklaşık 165 nm dir. Bunların Zeta Sizer ile ölçülen boyları ise 200 nm olup, her iki yöntemin oldukça yakın sonuçlar

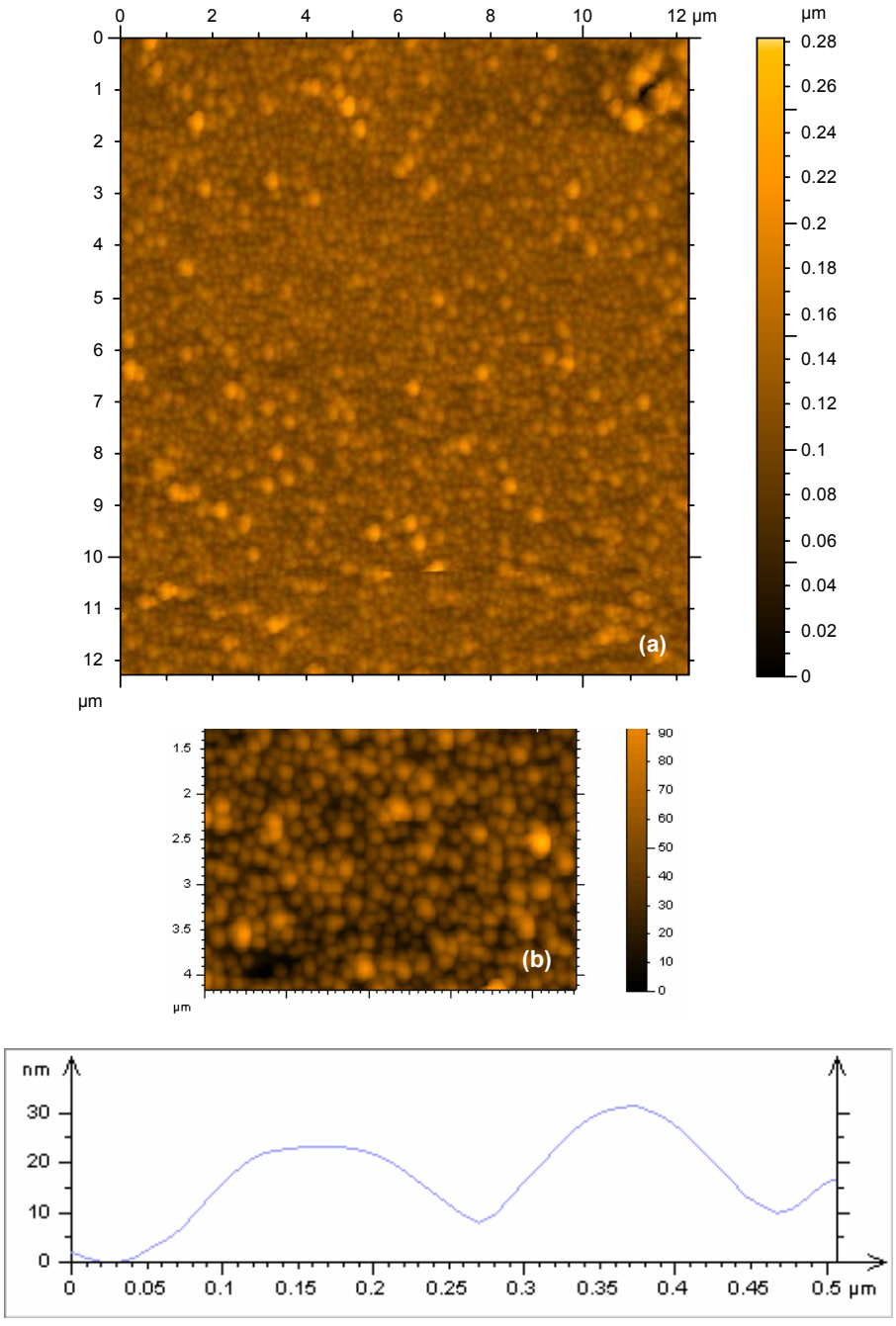
verdiği söylenebilir. 65°C'de üretilen nanopartiküllerin SEM fotoğrafı Şekil 4.23b'de görülmektedir. Bunlarda oldukça monodisperstir, bazı bölgelerde çok az miktarda yığılmalar görülmektedir. Fotoğraftan ölçülen boy 50 nm'den çok daha küçüktür (20-30 nm aralığında). Zeta Sizer ile yapılan ölçümlerde bulunan partikül boyu ise 71.3 nm'dir.

65°C'de sentezlenen nanopartiküllerin AFM fotoğrafı ve partikül boyunu hesaplamada kullanılan "derinlik profili" Şekil 4.24 a ve b'de örnek olarak sunulmuştur. AFM "derinlik profilinden ölçülen ortalama partikül boyları yaklaşık 25-30 nm aralığındadır. Bunların Zeta Sizer ile ölçülen boyları ise 71.3 nm iken SEM görüntüsünden ölçülen boyutları yine 50 nm'nin altında bulunmuştur. SEM ve AFM yönteminin oldukça yakın sonuçlar verdiği söylenebilir. Partiküllerin oldukça monodispers olduğu burada bir kez daha açıkca görülmektedir.





Şekil 4.23. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerinin değişik reaksiyon sıcaklıklarında SEM görüntüleri (a) 60°C (Zeta Sizer'da ölçülen partikül boyu 200 nm), (b) 65°C (Zeta Sizer'da ölçülen partikül boyu 71 nm).



Şekil 4.24. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerinin AFM görüntüleri (Zeta Sizer'da ölçülen partikül boyu 71 nm) (a) tarama alanı 12 µm X12 µm, (b) tarama alanı 4.5 µm X 4.5 µm ve "derinlik profili".

4.2.1. Toplam Monomer Dönüşümü

Farklı besleme bileşimleriyle üç farklı polimerik nanopartikül sentezlenmiştir. Çizelge 4.8'de polimerizasyon besleme ve ulaşılan monomer dönüşümü olarak verimler topluca sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Farklı reçetelerle hazırlanan poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerine ait toplam dönüşüm miktarları.

Örnek	Su (ml)	Stiren (ml)	DMAPM (ml)	PEG-MA (ml)	V-50 (gr)	Toplam Dönüşüm (%)
MA 1	120	1.25	0.1	**0.1**	0.03	99.2
MA 2	120	1.25	0.1	**0.2**	0.03	97.9
MA 3	120	1.25	0.1	**0.4**	0.03	98.6

Çizelgede görüldüğü gibi hemen hemen tüm polimerizasyonlarda toplam dönüşüm değerleri oldukça yüksektir. Dikkat edileceği gibi besleme bileşiminde komonomer oranlarının değişimi toplam monomer dönüşümünü çok belirgin bir şekilde etkilememiştir. Bu değerler yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu ile bir önceki bölümde sentezlenen monomerlerin dönüşüm değerleriyle de uyum içindedir.

4.2.2. PEG-MA Miktarının Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu grup deneylerde üç farklı miktarda (0.1, 0.2 ve 0.4 ml) PEG-MA içeren besleme karışımları kullanılmıştır. Su, DMAPM, PEG-EEM ve V-50 miktarları sırasıyla 120 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g olarak sabit tutulmuştur. Polimerizasyonlar pH 2.5-3 aralığında (0.1 N HCl ile ayarlanmış), 65°C'de azot atmosferinde 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Bu grupta üretilen nanopartiküllerin boy ve boy dağılımı ve zeta potansiyeli, Zeta Sizer ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler Çizelge 4.9'da topluca sunulmuştur. PEG-MA ve PEG-EEM'i karşılaştırmak için çizelgede parantez içinde, aynı koşullarda PEG-EEM kullanılarak yapılan polimerizasyonlarda elde edilen sonuçları vermektedir

.

Çizelge 4.9. PEG-MA miktarının nanopartikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

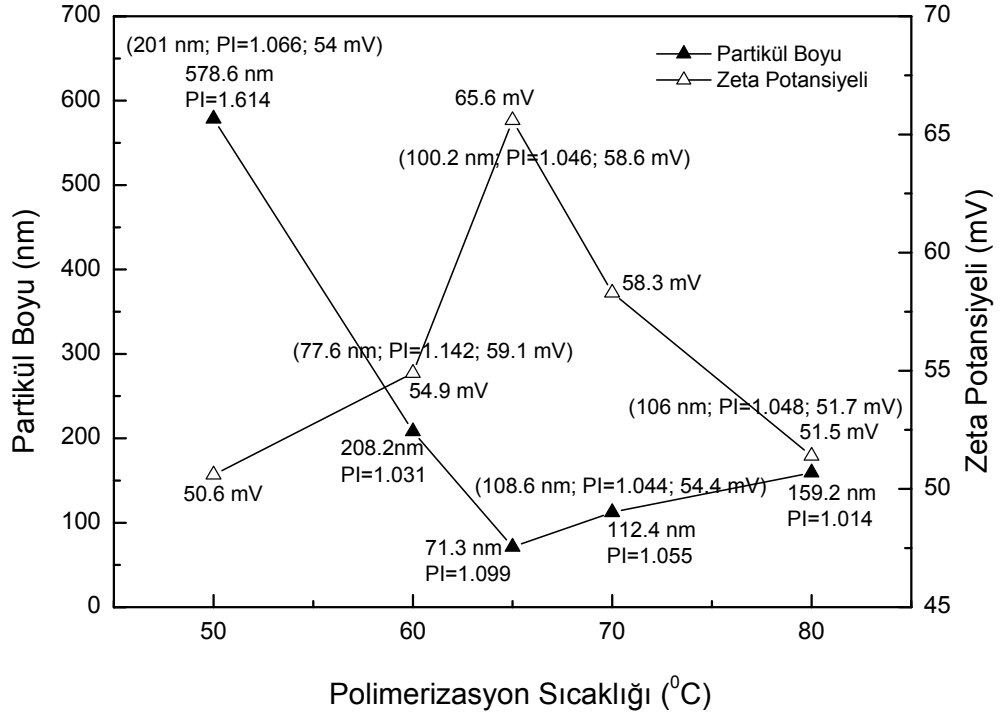
Örnek	PEG-MA (ml)	Partikül Boyu (nm)	Polidispersite İndeksi (PI)	Zeta Potansiyeli (mV)
MA 1	0.1	71 (75.1 nm)	1.110 (1.0809)	55.6 (56.2)
MA 2	0.2	75.8	1.148	52.0
MA 3	0.4	77.3	1.078	51.3

Çizelgeden görüldüğü gibi makromerin (aynı zamanda stabilizör), PEG-MA'nın beslemedeki miktarının artmasıyla birlikte partikül boyunun az da olsa arttığı gözlenmektedir. Oysa PEG-EEM içeriğinin artmasıyla partikül boyunun azaldığı gözlenmiştir. Hem PEG-MA hem de PEG-EEM hidrofilik PEG ve daha hidrofobik MA veya EEM gruplarına sahiptir. MA, EEM'e göre daha hidrofiliktir, dolayısıyla PEG-MA zinciri toplam olarak PEG-EEM'den daha hidrofiliktir. Dolayısıyla polimerizasyon sırasında PEG-MA zincirleri daha fazla uzadıktan sonra çökmekte, ikinci fazı oluşturarak partiküllerin üretimini sağlamaktadır. Bu nedenle PEG-MA miktarının artması ile ortamda daha fazla sayıda, dolayısıyla daha küçük partiküller beklenirken (PEG-EEM'de olduğu gibi), çözünürlüğün ters etkisi ile az da olsa daha büyük partiküller elde edilmektedir. Polidispersite indeksi (PI) ise hemen hemen hiç değişmemekte ve oldukça dar bir dağılımında partiküller üretilmektedir.

Zeta potansiyelini incelediğimizde ise artan PEG-MA miktarı ile partikül yüzey yükünün önemsiz miktarda azaldığı görülmektedir. Partikül yüzey yükündeki bu azalma partikül boyundaki artış ile orantılıdır. Partikül boyu arttıkça yüzey alanı azalmaktadır dolayısıyla yüzeye tutunan katyonik monomer ve başlatıcı miktarı azalmaktadır.

4.2.3. Sıcaklığın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

Bu gruptaki deneylerde kullanılan reaktifler su, St, PEG-MA, DMAPM ve V-50 olup reçetedeki miktarları sırasıyla 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml, ve 0.03 g dır. pH'ı 2.5-3 dür. Polimerizasyonlar değişik sıcaklıklarda (50°, 60°, 65°, 70° ve 80°C), azot atmosferinde 24 saatte geçekleştirilmiştir. Zeta Sizer'da elde edilen veriler Şekil 4.25'de verilmiştir. Karşılaştırma yapmak amacıyla şekilde parantez içine, aynı koşullarda PEG-EEM kullanılarak üretilen nanopartiküllerin sırasıyla ortalama boyutu (nm), PI değeri ve zeta potansiyeli (mV olarak) verilmiştir.



Şekil 4.25. Polimerizasyon sıcaklığının partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi.

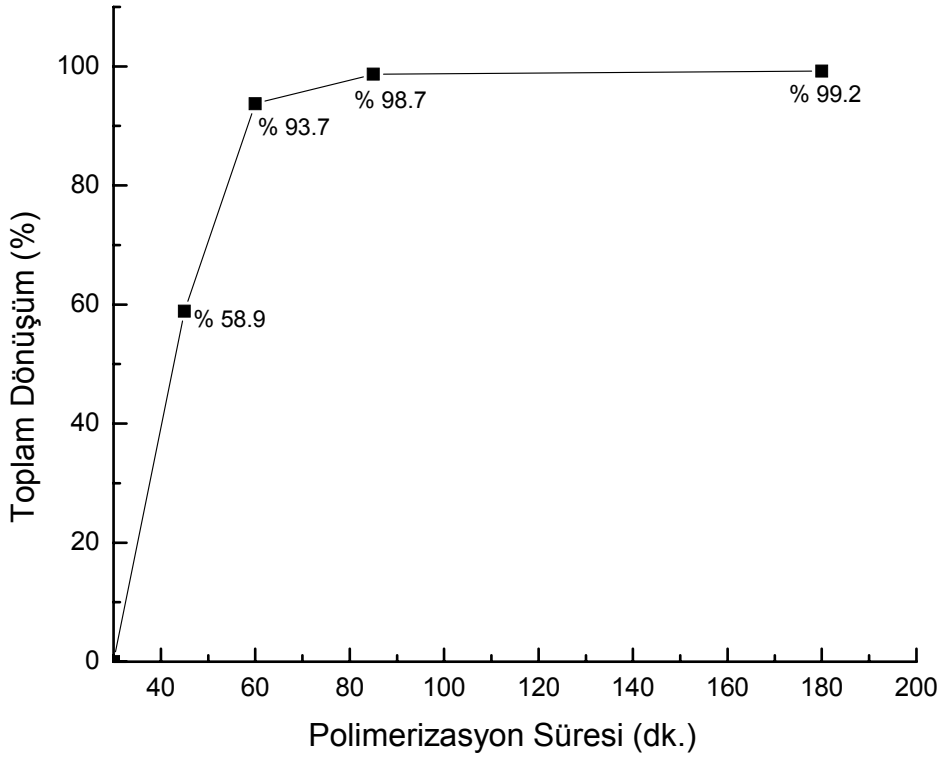
Şekilde görüldüğü gibi, sıcaklığın partikül boy ve dağılımına etkisi PEG-EEM ile üretilen nanopartiküllere çok yakındır. Her iki durumda da 50°C, büyük olasılıkla polimerizasyon hızının yavaş olması sonucu, partikül boyu diğer sıcaklıklara göre çok daha yüksek çıkmakta (PEG-EEM için 200 nm ve PEG-MA için 600 nm civarında), elde edilen lateksler mavimsi-şeffaflıktan (diğer sıcaklıklarda gözlenen) opak görünüme gitmektedir. Kullanılan reçete aynı olmasına rağmen partikül

boylarının büyük olması şu şekilde açıklanabilir: kullanılan başlatıcı bu sıcaklıkta yeterince hızlı serbest radikal oluşturamadığı için reaksiyon ortamında bulunan radikallerin sayısı azdır. Dolayısıyla az sayıda radikal olması, az sayıda polimer çekirdeklerinin oluşmasına yol açmakta, bu da ortamda bulunan monomerin bu merkezlere difüzlenerek büyük partiküllerin oluşmasına yol açmaktadır.

Şekil 4.21'de görüldüğü gibi partikül boyu sıcaklıkla değişmesine karşın boy dağılımı ve toplam yüzey yükü, bölüm 4.1.9'da PEG-EEM partikülleri için belirtildiği gibi, çok fazla değişmemektedir, Burada da oldukça dar boy dağılımlı nanopartiküller üretilmektedir.

4.2.4. Zamanın Partikül Boy/Boy Dağılımı ve Yüzey Yüküne Etkisi

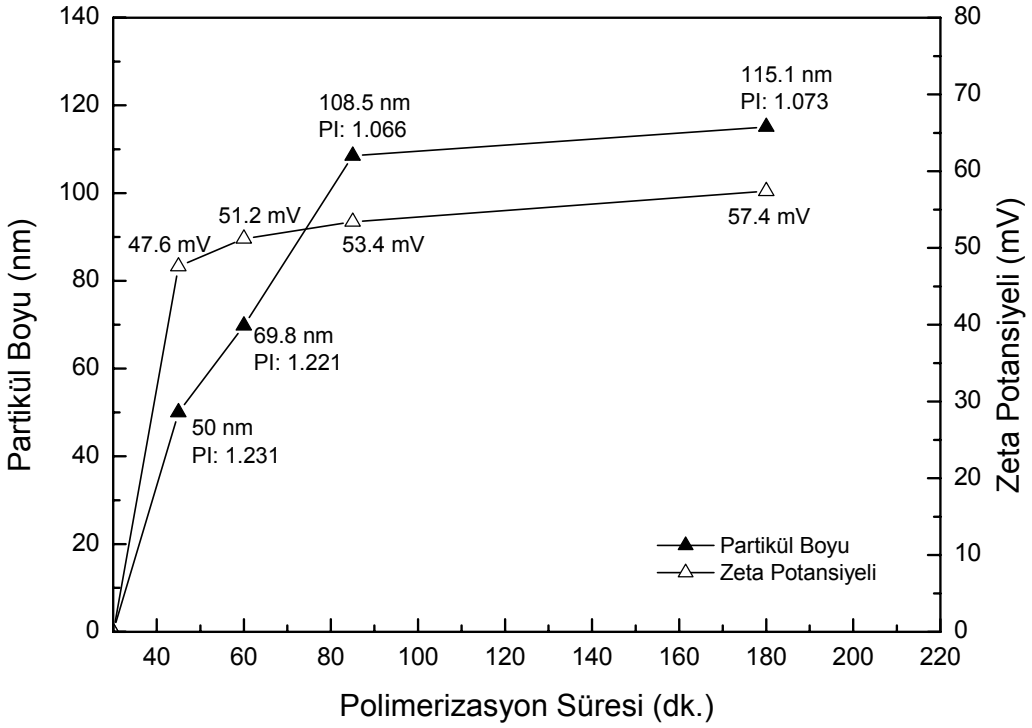
Bu çalışmada kullanılan reaktifler ve miktarları, sırasıyla, su, St, PEG-MA, DMAPM ve V-50 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g olarak sabit tutulmuştur. Polimerizasyon pH'ı 2.5-3'e ayarlanmıştır. Polimerizasyonlar 65°C'de, azot atmosferinde sürdürülmüştür. Polimerizasyon süresi 0-24 saat aralığında değiştirilmiştir. Polimerizasyon toplam dönüşümüne sürenin etkisi Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. Polimerizasyon süresinin toplam dönüşüme etkisi.

Şekil 4.26'da görülen değerler gravimetrik olarak hesaplanmış değerlerdir. Şekilde görüldüğü gibi ilk üç saatte polimerizasyon tamamlanmak üzeredir, kantitatif dönüşüm neredeyse elde edilmiştir. Bu bölgede görülen eğimin dik olması ise bize reaksiyon hızının oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. PEG-MA'ya ait eğim PEG-EEM için elde edilen eğimden biraz daha diktir. Dolayısıyla reaksiyon hızı daha yüksektir. Bu da beklenen bir durumdur. Çünkü daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi PEG-MA, PEG-EEM'e nazaran daha hidrofilik yapıdadır ve sulu fazda daha fazla molekül içerir, reaksiyona daha hızlı girer.

Şekil 4.27'de de reaksiyon süresinin partikül boy/ boy dağılımı ve yüzey yüküne etkisi reaksiyonun ilk üç saati için incelenmiştir.

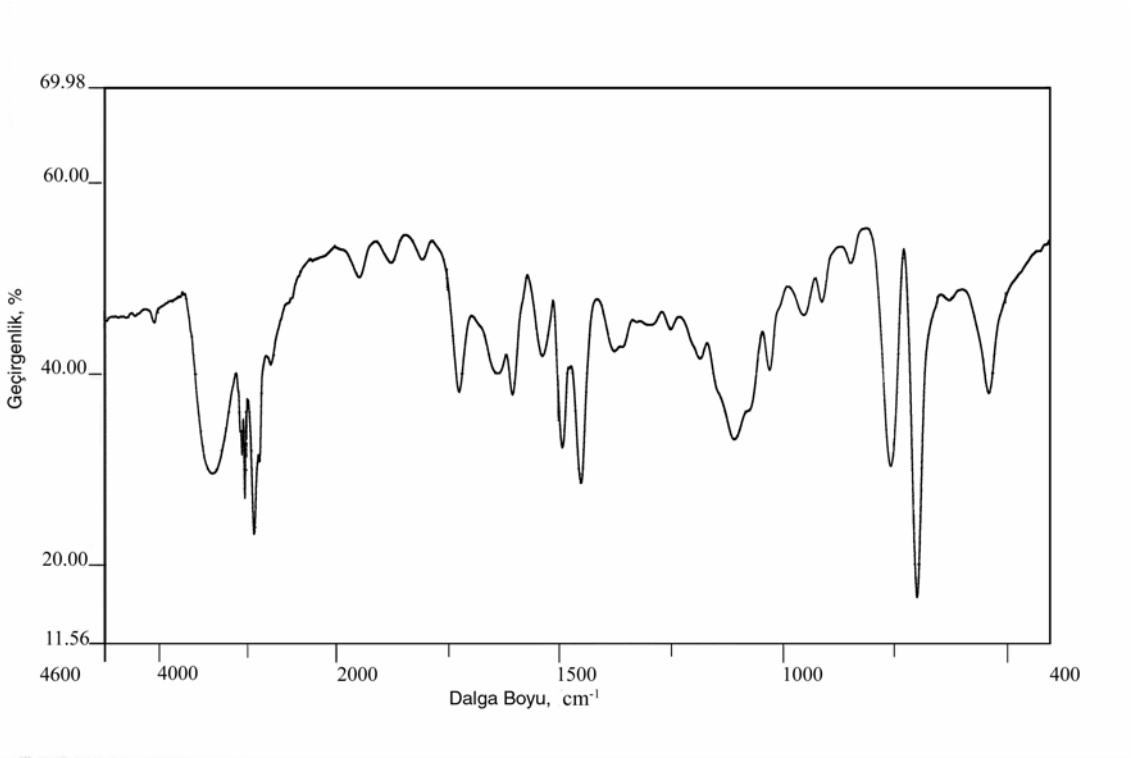


Şekil 4.27. Reaksiyon zamanının partikül boyuna etkisi

Yapılan çalışmada görüldüğü gibi (Şekil 4.27) partikül boyları her iki makromonomerle sentezlenen nanopartiküller için ortalama değerlerine yaklaşık 3 saatte ulaşmaktadır. PEG-MA'nın suda daha çözünür olmasından dolayı partikül çekirdeklenmesi daha hızlı olduğu görülmektedir.

4.2.5. Fonksiyonel Grup İçeren Nanopartiküllerin Yapısal Analizi

Oluşan polimerlerin yapı analizleri 1H-NMR ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Aşağıda sentezlenen terpolimere ait FTIR spektrumu (Şekil 4.28) yer almaktadır. Spektrumların incelenmesi sonucu poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerine ait karakteristik pikler Çizelge 4.10'da verilmiştir (Erdik, 1993).



Şekil 4.28. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerine ait FTIR spektrumu.

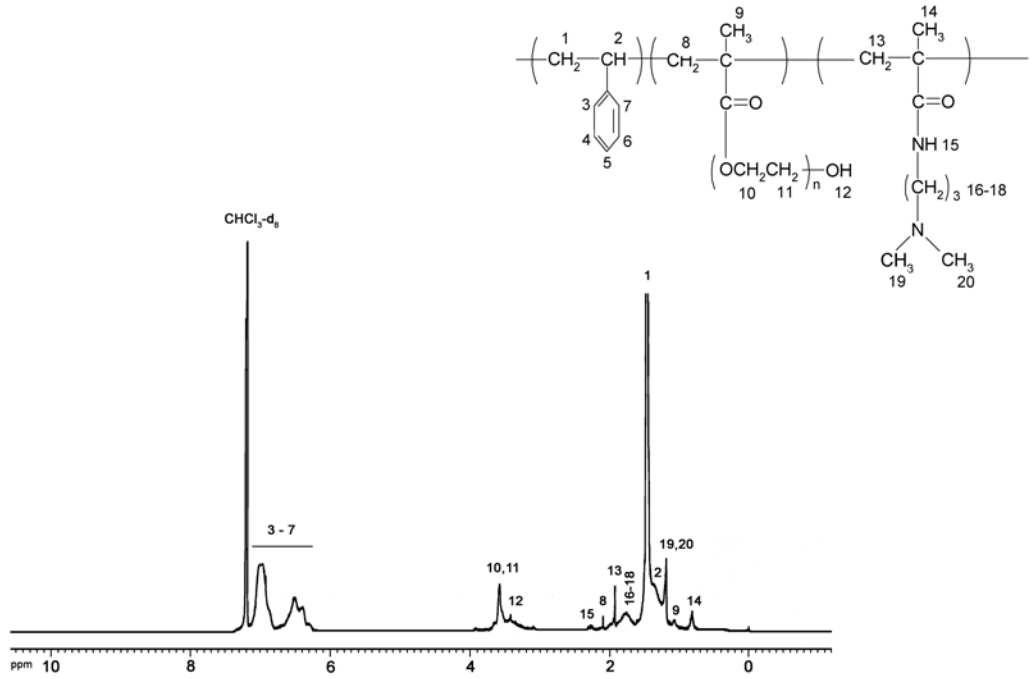
Çizelge 4.10. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler.

Dalga Boyu, cm^{-1}	**Fonksiyonlu Grup**
3395	Amid II bandı, NH gerilmesi ve OH gerilmesi
3100-2900	Aromatik CH
1946	C=O bandının yansıması
1875,1800	C=O gerilmesi
1725	C=O gerilmesi
1640	NH düzlem içi eğilmesi
1603	Aromatik benzen halkası, C=C gerilmesi
1536	NH gerilmesi
1491	NH deformasyonu, amid II bandı
1450	CH_2 makaslaması
1380-1360	CH_3 deformasyonunun çift bükülme bandı
1300	CH_2 eğilmesi
1280	Trans- amid III bandı
1180	CN gerilimi
1100	C-O-C düzlem içi eğilmesi
1028	CH düzlem içi bükülmesi
949-840	Ana zincirdeki C-C gerilmesi
756	Monosübstitüye benzenin düzlem dışı deformasyonu
698	CH eğilmesi
630	Düzlem dışı CH deformasyonu
538	C=O düzlem dışı eğilmeleri

Yukarıdaki FTIR spektrumunda görüldüğü gibi polimerde bulunan amid ve hidroksil gruplarına ait pikler 3395 cm^{-1}'de üst üste gelmiştir. Literatürde hidroksil pikinin şiddetli ve geniş, amid pikinin ise keskin ve şiddetli olduğu not edilmiştir (Erdik, 1993). Bu bilgiye dayanılarak FTIR spektrumunda görülen bu pikin hem şiddetli hem de geniş olması nedeniyle polimerin yapısında bulunan amid ve hidroksil gruplarına ait olduğu düşünülmektedir. PEG-EEM içeren polimere ait

FTIR spektrumu ile kıyaslandığında, 3300 cm^{-1} civarında görülen pikin çok keskin ve şiddetli olması nedeniyle polimerin yapısında bulunan amid pikine ait olduğu düşünülmektedir.

Terpolimere ait ^{1}H-NMR spektrumu ve terpolimerin kimyasal formülü Şekil 4.29'da gösterilmiştir (27 °C'de $CHCl_3$-d_1 içinde), δ ppm: (1) 1H, CH (ana zincir) 1.4, (2) 2H, CH_2 (ana zincir) 1.3, (3-7) 5H, CH (benzen halkası) (geniş pikler) 6.5-6.96 stiren birimindeki; (8) 2H, CH_2 (ana zincir) 2.1, (9) 3H, CH_3 1.15, (10,11) 2H, CH_2 3.6-3.48, (12)1H, OH 3.4 PEG-MA birimindeki; (13) 2H, CH_2 (ana zincir) 1.9, (14) 3H, CH_3 0.8, (15) 1H, NH (geniş pik) 2.1-2.3, (16-18)) 2H, CH_2 (geniş pik) 1.45-1.85, (19,20) 3H, CH_3 1.3 DMAPM birimindeki karakteristik pikleri vermektedir.

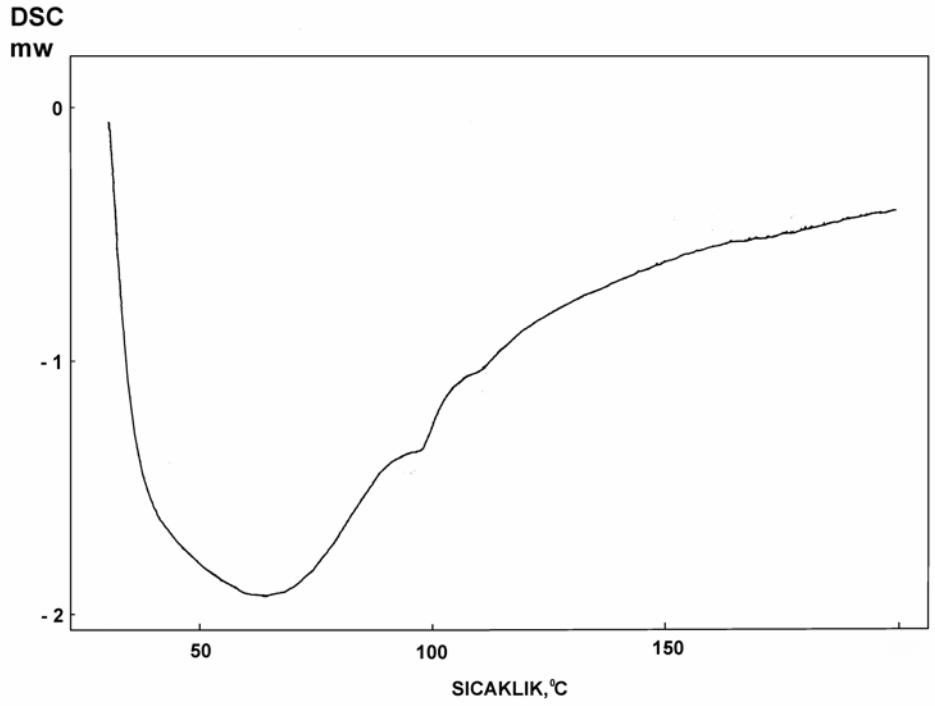


Şekil 4.29. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerine ait ^{1}H-NMR spektrumu terpolimerin kimyasal formülü

Şekil 4.29'da yer alan spektrum incelendiğinde 3.4 ppm'de yer alan kimyasal kayma terpolimerin yapısında bulunan PEG-MA birimine ait OH grubundan gelmektedir.

4.2.6. Termal Analiz

Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin termal özelliklerinin belirlenmesi için "Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC)" kullanılmıştır. Analiz için örnek 200 °C'ye kadar ısıtılmış ve bu ısıtma sırasında polimerin sıcaklık davranışı incelenmiştir. Örnek termogramda (Şekil 4.30) amorf yapıyı gösteren ikincil geçiş sıcaklığı olarak bilinen camsı geçiş sıcaklığına (T_g) ait endotermik pik yaklaşık 95 °C 'de görülmüştür. Camsı geçiş sıcaklığına ait literatürde yer alan benzer çalışmalar kıyaslandığında terpolimer için elde edilen T_g değerinin literatürle uyum içinde olduğu söylenebilir (Chen ve ark., 1999). Polimerin kristal yapıda olduğunu gösteren kristalizasyon sıcaklığı (T_c) ise yaklaşık 115 °C'de yer almaktadır. Kristal yapının terpolimer zincir yapısında bulunan PEG-MA birimlerden geldiği düşünülmektedir. Polimere ait belirgin bir erime piki görülmemiştir.



Şekil 4.30. Poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin DSC termogramı.

4.2.7. Molekül Ağırlığı

Sentezlenen poli(St/PEG-MA/DMAPM) terpolimerinin ortalama molekül ağırlığı ve polidispersite indeksi "Jel Geçirgenlik Kromotogrofisi" (GPC) ile belirlenmiştir. Ölçümlerde çözücü ve taşıyıcı olarak kloroform kullanılmıştır. Sistem sıcaklığı $25^{o}C$'de sabit tutulmuştur. 105000, 50000 ve 17500 molekül ağırlıklarına sahip polistiren standartlar kullanılarak, alıkonma süresine karşı molekül ağırlıkları grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Daha sonra polimer hazırlanan polimer çözeltileri sisteme enjekte edilerek orjinal kromatogramlar elde edilmiştir. Bunlar birincil kalibrasyon yöntemine göre değerlendirilerek ağırlıkça (M_w) ve sayıca (M_n) ortalama molekül ağırlıkları ile polidispersite indeksleri ($PI=M_w/M_n$) sırasıyla 9.12×10^4, 7.22×10^4 ve 1.263 olarak bulunmuştur.

4.3. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik özellik taşıyan inorganik maddeler ile yüklü sentetik ve doğal polimerik partiküller üretilmiştir ve bunları ticari olarak bulmak mümkündür. Sentetik polimer bazlı manyetik partiküller, manyetik hücre ayrılması ve saflaştırılması, ilaç salımı, manyetik hedefleme (ilaçlar ve radyofarmösetikler), immunotestler, moleküler biyoloji, RNA-DNA saflaştırılması, manyetik rezonans görüntüleme ajanı ve diagnostik kitler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Chatterjee, 2002). Bu amaçla literatürde birçok çalışmalar yapılmıştır. Ramirez ve arkadaşları miniemülsiyon prosesi ile yüksek manyetit içerikli manyetik polistiren nanopartikülleri sentezlemiş ve karakterize etmişlerdir (Ramirez ve ark., 2003). Kondo ve arkadaşları, emülsiyon polimerizasyonu ile sıcaklık duyarlı manyetik poli(St/NIPAM/MAA) terpolimerini sentezleyip bunların biyoproseslerdeki uygulamalarını incelemişlerdir (Kondo ve ark., 1999). Arias ve arkadaşları, ilaç salımında kullanılmak üzere manyetik bir çekirdek ve biyobozunur PE-2-CA kabuktan oluşan polimerik nanopartiküller sentezlemişlerdir (Arias ve ark., 2001). Dresco ve arkadaşları mikroemülsiyon polimerizasyonuyla manyetit-MAA/HEMA kopolimerini sentezleyip manyetik özelliklerini incelemişlerdir. Ayrıca monomer derişiminin ve su/yüzey aktif madde oranının partikül boyuna etkisini araştırmışlardır (Dresco ve ark., 1999). Zhang, sentezledikleri manyetitleri biyouyumlu PEG ve PEG-folik asit konjugatları ile kaplamıştır. Buradaki amaçları koagüle olan çıplak manyetit partiküllerin aglomerasyonlarını engellemek ve manyetik görüntüleme tekniği ile kanser hücrelerinin görülmesini sağlamaktır (Zhang ve ark, 2003). Wang, 1 Tesla'lık manyetik alan ortamında manyetit kristellerini büyütmüştür, böylece daha güçlü manyetik özellik gösteren nanopartiküller elde etmiştir (Wang ve ark., 2004). Huang ve Tang yaptıkları çalışmada manyetit parçacıklarını polistiren ile emülsiyon polimerizasyonu yöntemiyle kaplamıştır. Burada elde ettikleri "core-shell" yapısındaki nanopartiküllerin boy aralığı 10-65 nm'dir (Huang ve Tang, 2004). Bir başka çalışmada ise manyetit partikülleri stiren monomeri ile miniemülsiyon yöntemi ile kaplanmıştır. CTAB kullanılarak elde edilen kararlı lateksleri oluşturan nanopartikül boyu 12 nm'dir (Betancourt-Galindo ve ark., 2004).

4.3.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

İlgili literatürde ikili çöktürme yöntemiyle farklı demir tuzlarından farklı oranlarda kullanılarak manyetit oluşumu ile ilgili çeşitli yayınlar vardır (Babes ve ark., 1999; Zhu ve ark., 1999; Pardoe ve ark., 2001). Laboratuvar ölçekli üretimlerde manyetit, genellikle iyi karıştırılan demir tuzları çözeltisine manyetitin oluştuğu pH 9-14 aralığına kadar bir baz ilave edilmesiyle hazırlanmaktadır. Baz ilavesinin ilave edilme hızının yüksek olması (genellikle 1-2 saniye) gerektiği aksi durumda manyetik ve homojen olmayan ürünlerin elde edileceği rapor edilmiştir.

Manyetit (Fe_3O_4) oluşum reaksiyonu aşağıdaki gibidir:

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \longrightarrow Fe_3O_4 + 4\,H_2O \qquad (4.6)$$

Bu reaksiyona göre stokiyometrik dönüşüm için ortama 1 mol Fe^{2+} için 2 mol Fe^{3+} ilavesinin gerektiği söylenebilir. Fazla ilave edilen Fe^{2+} iyonu oksitlenerek Fe^{3+} iyonlarına dönüşür, veya NaOH ile reaksiyona girerek manyetik olmayan demir oksihidroksitlerin ($Fe(OH)_2$) oluşumuna yol açar. Bu da havada oksitlenerek manyetite dönüşür.

$$Fe^{2+} + NaOH \longrightarrow Fe(OH)_2$$

$$Fe(OH)_2 \longrightarrow \text{“yeşil pas”} \longrightarrow Fe_3O_4 \qquad (4.7)$$

Bu şekilde $Fe(OH)_2$'in oksidasyonu ile oluşan manyetitin partikül boyunun 0.1-0.2 μm daha büyük olduğu belirlenmiştir (Zhu ve ark., 1999).

Grubumuzda yapılan bir başka tez kapsamında ikili çöktürme yöntemiyle manyetit nanopartiküller üretilmiştir. Farklı boylarda nanopartiküller üretebilmek için Fe^{2+}/Fe^{3+} mol oranı, sıcaklık, pH, karıştırma hızı, ve çöktürme ajanı (NaOH) derişimi gibi parametreler değiştirilerek bir seri deney yapılmıştır. Bu parametrelerin esas olarak partikül boy ve boy dağılımına etkileri ayrıntılı olarak çalışılmış ve sunulmuştur (Sayar, 2004). Çalışılan koşullarda en küçük boy ve boy dağılımını verebilecek manyetit sentezine ait polimerizasyon koşulları ve parametreleri belirlenmiştir. Daha sonraki aşamalarda polimer tabakası ile

kaplanması hedeflenen manyetik çekirdek üretiminde kullanılan çeşitli ajanların miktarları ve koşullar şöyledir: Fe^{2+}/Fe^{3+} mol oranı:0.5; karıştırma hızı: 3000 devir/dk; çöktürme ajanı (NaOH) derişimi: 5 M; sıcaklık: 80ºC; pH:12. Burada 5 dk da reaksiyonlar oda sıcaklığında gerçekleştirildikten sonra belirtilen karıştırma hızında ve sıcaklıkta 2 saat karıştırma yapıldığı not edilmelidir. Nanopartiküller 1M'lık Tetrametil amonyum hidroksit (TMAOH) çözeltisi ile kararlı hale getirilmiştir. Bu reçete ile en küçük boyda (40 nm) ve dar boy dağılımında (PI:0.194) manyetit nanopartiküller üretimi mümkün olmuştur. Parametrelerin değiştirilmesi ile manyetit boyu kolaylıkla ayarlanmaktadır. Manyetit partiküllerin yükü boyuna göre –30--40 mV aralığında değişmektedir.

Sunulan çalışmanın bu bölümünde, yukarıdaki yöntemle farklı boylarda (77-180 nm) manyetit nanopartiküller çekirdek olarak kullanılmıştır. Bu partiküller mikroemülsiyon polimerizasyonu ile önceki bölümlerde belirtilen hem fonksiyonel gruplar içermeyen hem de içeren terpolimerler ile kaplanmıştır. Uygulanan polimerizasyon reçetesi şöyledir: Su, St, DMA65PM, PEG-EEM veya PEG-MA ve V-50 miktarları sırasıyla 120 ml, 1.25 ml, 0.1 ml, 0.1 ml ve 0.03 g dır. Burada kullanılan manyetit (Fe_3O_4) miktarı su miktarına göre %1 olup, bu oran hem önceki çalışmalarımız hem de ilgili literatür göz önünde tutularak seçilmiştir (Asmatulu, 2004; Marutani, 2004). Hazırlanan karışım sonikatörde yaklaşık 30 dk tutulduktan sonra, polimerizasyıon çalkalamalı su banyosunda 65°C sıcaklıkta azot atmosferinde 24 saatte gerçekleştirilmiştir.

4.3.2. Manyetik Nanopartikül Karakterizasyonu

Polimerizasyon sonunda açık kahverengi renkli lateksler elde edilmiştir. Latekslerde herhangi bir çökme veya topaklanma gözlenmemiştir. Partikül boy ve boy dağılımları saptanması için Zeta Sizer kullanılmıştır. Manyetit (180 nm, PI=1.2, -35 mV) ile yapılan ön çalışmada polimerik kaplamanın ince bir tabaka halinde olduğu (polimer kaplı nanopartikül 195 nm, PI=1.0444, 49.3 mV) ve manyetite ait polidispersite indeksin kaplama sonrası daha da azalarak monodispers hale geldiği görülmüştür. Bu ön denemeler sonrasında, iki farklı boyda (77 ve 130 nm) manyetitler fonksiyonel grup içermeyen (PEG-EEM kullanılarak) ve fonksiyonel grup içeren (PEG-EEM yerine PEG-MA kullanılarak)

terpolimerler ile kaplanmıştır. Zeta Sizer ile ölçülen partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne ait sonuçlar Çizelge 11'de topluca verilmiştir.

Çizelge 4.11. Üretilen nanopartiküllere ait Zeta Sizer'da elde edilen boy/boy dağılımı ve yüzey yükü.

Örnek	Polimer kaplı nanopartikül boyu* (nm)	Polidispersite İndeksi* (PI)	Zeta Potansiyeli* (mV)
PEG-EEM ile	155.7 (77)	1.355 (1.236)	53.4 (-48.5)
PEG-MA ile	89.3 (77)	1.617 (1.236)	54.6 (-48.5)
PEG-EEM ile	200.6 (130)	1.141 (1.317)	47.6 (-42.3)
PEG-MA ile	164.9 (130)	1.105 (1.317)	50.9 (-42.3)

- Parantez içindeki değerler çekirdek olarak kullanılan manyetite aittir.

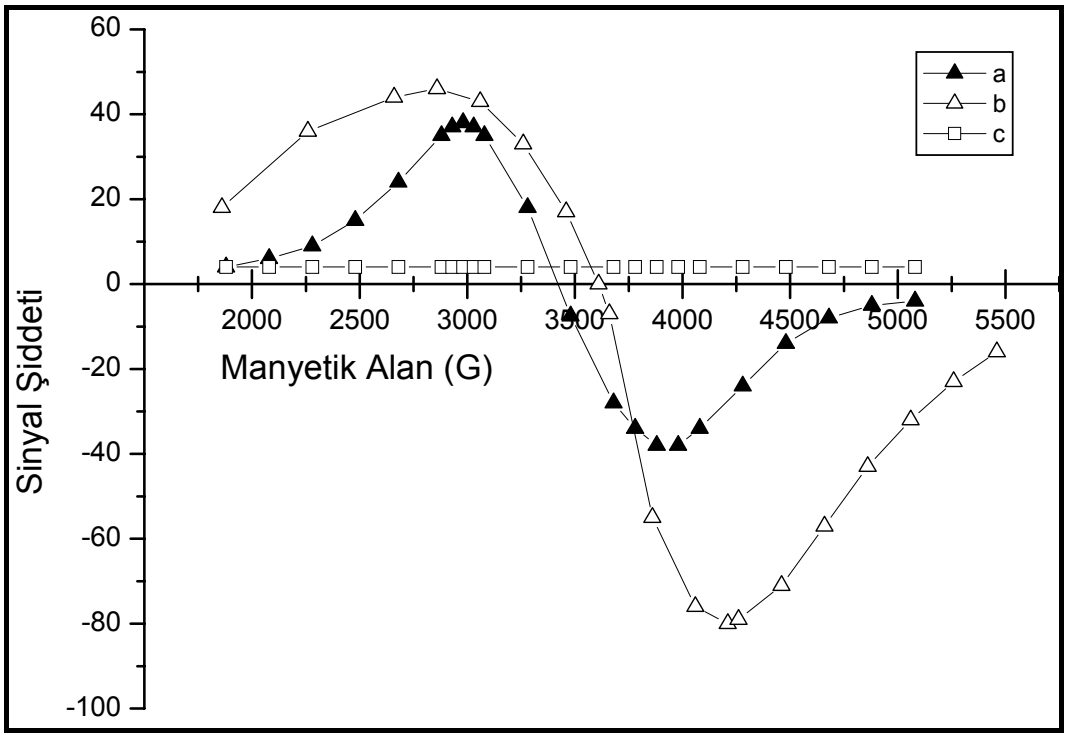
Çizelge 11'de görüldüğü gibi polimer kaplama sonucunda manyetit boyutu önemli şekilde büyümektedir. Bu kaplamanın oluştuğunu gösteren önemli bir bulgudur. Bu ölçümler alınmadan önce kaplanmayan ve manyetik çekirdek içermeyen partiküllerin, "Deneysel Çalışmalar" bölümünde verilen yöntemle ortamdan tamamen uzaklaştırıldığı not edilmelidir. Aynı polimerizasyon reçetesi ve koşullar uygulanmasına karşın, PEG-EEM ile elde edilen manyetik yüklü polimerik partiküllerin PEG-MA kullanıldığı duruma göre çok daha büyük olması (diğer bir ifadeyle daha kalın polimerik kabuk oluşması) ilginç bir bulgudur. PEG-EEM oligomerleri PEG-MA oligomerlerine göre daha hidrofobiktir. Manyetit ise hidrofiliktir. Sulu ortamda gerçekleşen bu polimerizasyon sırasında hidrofilik-hidrofobik etkileşim nedeniyle PEG-EEM'in manyetit partiküllerin etrafına daha çok yığıldığını bunun da daha kalın kaplamaya yol açtığını söylemek mümkündür.

Daha küçük manyetit kullanıldığında polimer kaplama ile boy dağılımının manyetite göre biraz arttığını, büyük partikülerde ise tersi bir durum gözlendiği

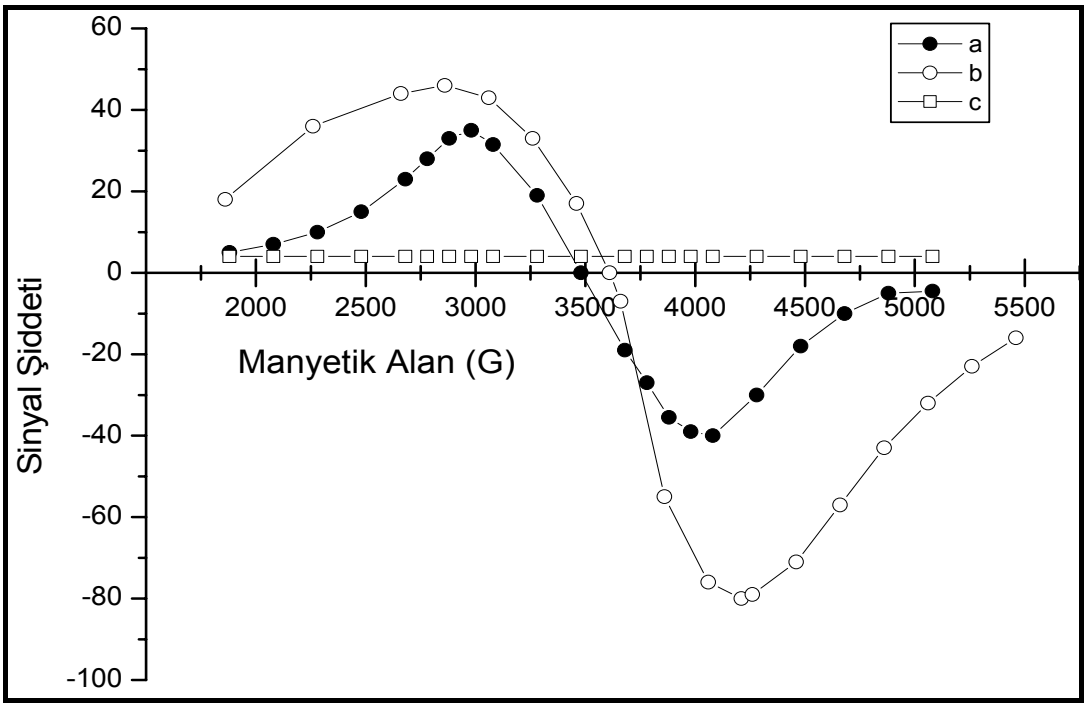
dikkati çekmektedir. Bu büyük olasılıkla ortamda bulunan partikül sayısına göre diğerlerinin miktarının (özellikle monomerlerin ve stabilizörün miktarının) büyük boyutlu manyetit durumunda daha yeterli durumda olması sonucudur.

Çizelgede görüldüğü gibi manyetit yüzey yükü -30 ve -40 mV aralığındadır. Polimer kaplamada katyonik başlatıcı ve katyonik komonomer nedeniyle, beklendiği gibi partiküllerin yüzey yükü 45 - 55 mV arasına çıkmaktadır. Bu da manyetit partiküllerin oldukça homojen kaplandığını gösteren bir bulgu olarak değendirilebilir.

Sentezlenen manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) polimerik nanopartiküllerin manyetik özelliği ESR (Elektron Spin Rezonans) ile analiz edilmiştir. Şekil 4.31 ve 4.32'de manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, manyetik ve manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) kopolimerlerinin ESR spektrumları birlikte verilmektedir. Çizelge 4.12'de manyetit partiküllerinin ESR spektrumundan elde edilen spektroskopi özellikleri verilmiştir. Çizelge 4.12'deki g değeri spektroskopik yarılma çarpanını, ΔH yarı eğri genişliğini, Hr rezonans manyetik alanı belirtmektedir.



Şekil 4.31. ESR spektrumları: (a) manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM) nanopartikül (200.6 nm); (b) manyetit nanopartikülü (130 nm); ve (c) manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-EEM/DMAPM) nanopartikül (75.1 nm)



Şekil 4.32. ESR spektrumları: (a) manyetik yüklü poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartikül (164.9 nm); b) manyetit nanopartikülü (130 nm); ve (c) manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartikül (71.3 nm).

ESR ile çiftleşmemiş elektronlara sahip molekül yada molekül parçaları analiz edilmektedir. Çiftleşmemiş elektronlara sahip moleküllerin manyetik özellik göstermeleri nedeniyle bu yöntemle maddelerin manyetik özellikte olup olmadığı belirlenebilmektedir. Şekil 4.31 ve 4.32'de görüldüğü gibi manyetit nanopartiküllerinin geniş ve asimetrik tek çizgili bir rezonans eğrisine sahip olduğu belirlenmiştir. Manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerinin ESR spektrumunda ise herhangi bir rezonans eğrisi gözlenmemiştir. Şekil 4.31 ve 4.32'de görüldüğü gibi manyetit nanopartikülü polimer ile kaplandıktan sonrada geniş ve asimetrik tek çizgili bir rezonans eğrisi göstermektedir. Dolayısıyla polimerin kendisi herhangi bir manyetik özelliğe sahip değilken yapı içine manyetik özellik taşıyan manyetit çekirdeğin girmesiyle manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküller elde edilmektedir. Elektron spin rezonansla polimerik yapı içinde manyetit partiküllerin varlığı gözlenmiştir.

Şekil 4.31 ve 4.32'de görülen ESR spektrumlarında manyetit nanopartikülü uygulanan manyetik alana karşı büyük sinyal şiddeti gösterirken polimerle

kaplandıktan sonra sinyal şiddetinde azalma gözlenmektedir. Manyetit partiküllerinin polimerle kaplanmasıyla manyetik birimler arasına polimerik bir tabaka girmesinden bu birimler arası manyetik etkileşim kuvveti azalır. Bu nedenle de sinyal şiddetinde azalma gözlenmiştir. Literatürde Pt nanopartiküllerinin ESR spektrumu ile bu partiküllerin poli(N-vinil-2-pirolidon) polimeri ile kaplanmasından sonraki ESR spektrumununda da benzer sonuçlar alınmıştır (Yamamoto ve ark., 2002).

Çiftleşmemiş elektron içeren bir maddeye uygulanan dış manyetik alan, manyetik momentlerle bağlantılı ΔE kadar enerji farkı olan enerji düzeyleri yaratır. Bu enerji düzeyleri arasındaki fark, $\Delta E=g.\beta.H$ kadardır. Bu enerji farkı mikro dalga enerjisine eşit olduğundaki manyetik alan rezonans alanı (H_r) olarak tanımlanmaktadır. Rezonans alanı ESR spektrumunda sinyal şiddetinin sıfır olduğundaki yani maksimum mikrodalga enerjisi soğurduğundaki manyetik alan değeridir. g ise spektroskopik yarılma çarpanı olup her maddenin kendine özgü karakteristik bir özelliğidir ve demir için bu değer 1.94 ve kobalt için 1.87'dir (Edwards, J.,1996). Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi farklı boydaki manyetit nanopartiküllerinin farklı g ve H_r değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir.

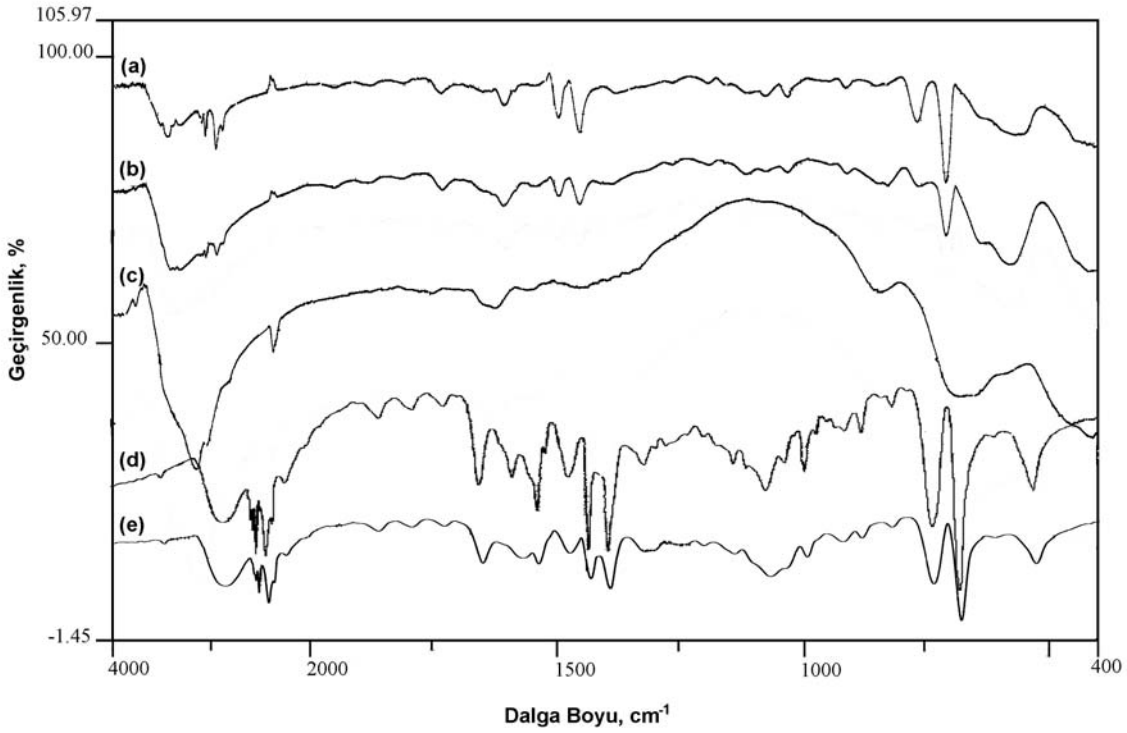
Literatürde Fe^{3+} iyonu için g faktörü düşük spin kompleksi için 1.4-3.1 ve yüksek spin kompleksi için 2.0-9.7 aralığında belirtilmektedir. Manyetit nanopartikülü ve polimer kaplı manyetik nanopartiküller için g faktörü, düşük spinli Fe^{3+} kompleksi için belirtilen aralığa girdiği bulunmuştur.

ESR spektrumundaki eğrinin iki tepesi arasındaki uzaklık yarı eğri genişliği (ΔH) olarak tanımlanmaktadır. Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi manyetit nanopartiküllerinin polimerle kaplanması sonucu partikül boyu arttıkça yarı eğri genişliğinin (ΔH) azaldığı gözlenmiştir. Yarı eğri genişliğindeki bu azalma manyetik birimler arasına polimerin girmesi nedeniyle etkileşimin azaldığını göstermektedir.

Çizelge 4.12. Manyetit ve manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerin ESR spektroskopik özellikleri

Nanopartiküller	g	ΔH (G)	H_r (G)
Manyetit (Fe_3O_4) **(77 nm)**	1.97	1000	3700
Manyetit (Fe_3O_4) **(130 nm)**	1.99	1500	3750
PEG-EEM ile **(manyetit çekirdek 77 nm)**	1.92	540	3650
PEG-MA ile **(manyetit çekirdek 77 nm)**	1.96	670	3650
PEG-EEM ile **(manyetit çekirdek 130 nm)**	1.94	850	3450
PEG-MA ile **(manyetit çekirdek 130 nm)**	1.95	1000	3500

Sentezlenen manyetit ve polimer kaplı manyetik partiküller FTIR (şekil 4.33) ile de analiz edilmiştir. Bu amaçla ilk önce FTIR spekturumundan manyetit çekirdeğe ait karakteristik pikler belirlenmiştir. 670 cm^{-1} ve 417 cm^{-1} dalga boylarında oktahedral Fe-O ve tetrahedral Fe-O'e ait pikler sırasıyla yer almaktadır, elde edilen bu piklerin ilgili literatürde (Bocanegra-Diaz, ve ark., 2003) manyetit için verilen değerlerle oldukça iyi bir uyum içinde olduğu not edilmelidir. Daha sonra polimer kaplı nanopartiküllere ait FTIR spektrumunda daha önceki bölümlerde verilen yalnızca polimere ait karakteristik piklerin yanı sıra manyetite ait Fe-O geriliminden kaynaklanan pıklerinde (yaklaşık 640 ve 425 cm^{-1} dalga boylarında) yer aldığı ancak şiddetlerinin çok azaldığı açıkca görülmektedir. Dolayısıyla FTIR spekturumuna dayanarak manyetit nanopartiküllerinin poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) ile kaplandığı söylenebilir. Ayrıca manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküller ile manyetit içermeyen aynı nanopartiküllerin FTIR spektrumundaki karakteristik piklerinin aynı olduğu görülmektedir.



Şekil 4.33. Nanopartiküllerin FTIR spektrumlarına ait örnekler: (a) Manyetik yüklü poli(St/PEG-MA/DMAPM); (b) Manyetik yüklü poli(St/PEG-EEM/DMAPM); (c) manyetit (Fe_3O_4); (d) Manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-EEM/DMAPM); (e) Manyetik yüklü olmayan poli(St/PEG-MA/DMAPM).

4.4. Nanopartikül Nükleik Asit Etkileşimi

Sunulan tez kapsamında önceki bölümlerde ayrıntılı olarak tartışıldığı gibi çeşitli boy ve yüzey yüklerinde, fonksiyonel gruplar taşıyan ve taşımayan, manyetik olarak yüklü ve yüksüz nanopartiküller üretilmiştir. Bu bölümde seçilen partiküllerin nükleik asitlerin kullanıldığı uygulamalarda yer alabileceklerini göstermek amacıyla önce, esas olarak ön denemeler sayılabilecek bölümde, nanopartiküllerin farklı pH'larda genomik DNA ile etkileşimleri incelenmiştir. Sonraki bölümde, grubumuzda devam eden gen transferi ile ilgili çalışmalara katkı vermek üzere, sunulan tezde de temel hedef olan, nanopartiküllerin plazmid DNA ile etkileşimi ve bunların örnek hücrelere örnek plazmid DNA aktarılmasında kullanımı araştırılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları aşağıdaki alt gruplarda ayrı ayrı sunulmuş ve tartışılmıştır.

4.4.1. Nanopartikül Genomik DNA Etkileşimi

Bu bölümde önceki bölümlerde üretimi ve karakterizasyonu verilen 75.1 nm boyutlu 56.2 mV yüzey yüküne sahip katyonik poli(St/PEG-EEM/DMAPM) partikülleri ile negatif yüklü genomik DNA (gDNA) (kaynağı Ringa balığı testisi olup Sigma (ABD) tarafından tanımlanan boyu 250-300 baz çiftidir) arasında iyonik etkileşimler incelenmiştir. Bunun için 10 mg genomik DNA 10 ml sulu tampon çözeltisinde çözülmüştür. Çözeltinin pH'sı şu tamponlar kullanılarak 3.0-10.0 aralığında istenilen değere ayarlanmıştır: pH 4.0-6.0 için 0.1 M CH_3COONa-CH_3COOH; pH 7.0-8.0 için 0.1 M K_2HPO_4-KH_2PO_4, pH 9.0-10.0 için 0.2 M Na_2HPO_4-$Na_2B_4O_7.10H_2O$. Daha düşük ve yüksek pH'larda DNA'nın denatürasyona uğraması, çökmeler ve bağlanma veriminin çok düşük olması nedeniyle bu aralıkta çalışılmıştır. pH deneyleri 25°C sabit sıcaklıkta yapılmıştır. Etkileşim süresi 2 saat olarak belirlenmiştir. Etkileşim sonunda nanopartikül-DNA konjugatlarının boy ve boy dağılımı ve yükleri de Zeta Sizer ile ölçülmüştür. Etkileşim süresi sonunda ortamdaki DNA derişimi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. DNA'nın başlangıç derişim değerleri de kullanılıp birim ağırlıkta polimer başına bağlanan DNA miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

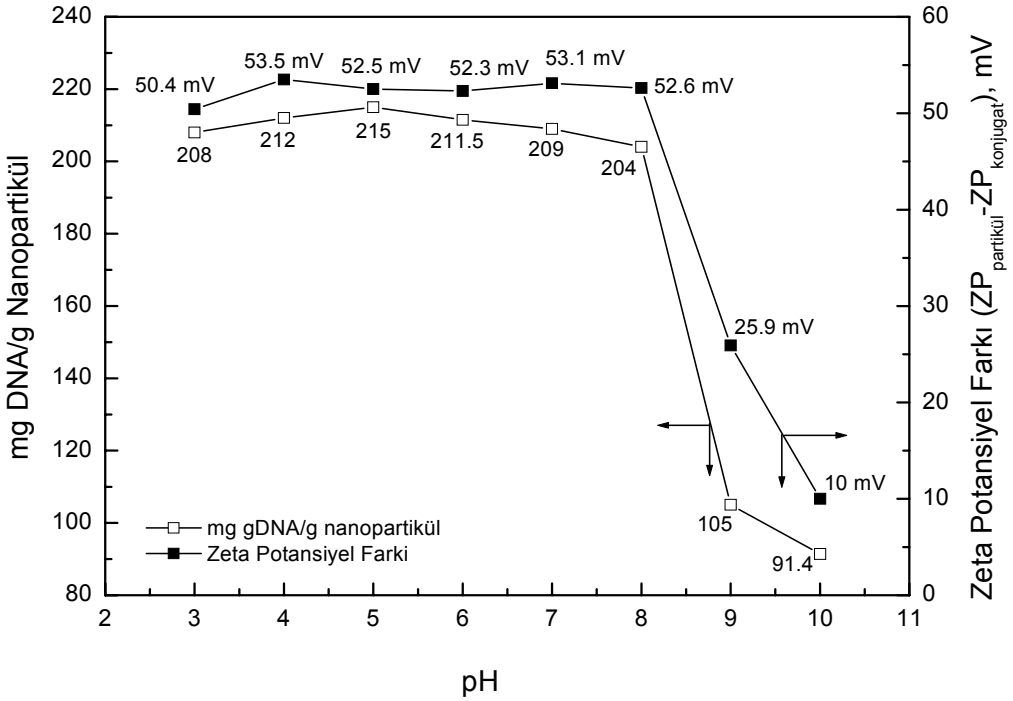
DNA(mg/g polimer)=[$(\frac{A_1 - A_2}{A_1})$ XDNA DerişimiXToplam Hacim]/Partikül miktarı (mg/g) (4.8)

Burada, A_1 ve A_2 sırasıyla DNA 'nın partiküle bağlanmasından önce ve sonraki absorbans değerleridir.

Şekil 4.34'de farklı pH'larda birim nanopartikül başına polimerle birleşen (konjugat oluşturan) gDNA miktarı ve bu konjugatların boyutları topluca sunulmuştur. Kullanılan gDNA'nın boy ve boy dağılımı ve zeta potansiyeli de Zeta Sizer ile ölçülmüştür. Saf su içindeki ortalama boyu 1-2 μm, boy dağılımı 2.0, zeta potansiyeli -24 mV olarak bulunmuştur. Aynı gDNA'nın çeşitli tampon çözeltileri içindeki davranışları da incelenmiştir. pH 3.0'de DNA'nın boyunun 2.5-3.5 μm'a çıktığı görülmüştür. pH 4.0-8.0 aralığında ise DNA'nın su içindeki boyutlarının aynı olduğu not edilmelidir. pH 9.0 ve 10.0 da 1.5-2.5 μm aralığındadır. Literatürde de DNA'nın pH 3.0'ün altında ve 10.0'un üzerinde denatüre olduğu rapor edilmiştir, dolayısıyla bu sınırlar dışında çalışılmamıştır (Husler ve ark., 1995; Batel ve ark., 1999; Wolf ve ark., 1999; Wood ve ark., 2005).

Şekil 4.34'de görüldüğü gibi gDNA'nın birim ağırlıktaki nanopartikülle etkileşim miktarı pH: 3.0-8.0 arasında hemen hemen aynıdır ve 204-215 mg gDNA/g nanopartikül arasında değişmektedir. Önceki bölümlerde rapor edildiği gibi bu pH aralığında nanopartiküller pozitif yüklüdür (zeta potansiyel farkı olarak tanımlanan, partikül zeta potansiyeli ile partikül/DNA konjugatının zeta potansiyeli arasındaki fark, 55–48.4 mV), dolayısıyla negatif yüklü gDNA ile elektrostatik olarak etkileşmekte ve konjugatları oluşturmaktadır. Dikkat edileceği gibi partikül konjugat arasındaki potansiyel farkı oldukça yüksektir (50.4-53.5 mV aralığında) bu da konjugat oluşumunda nanopartiküllerin gDNA'yı negatif yüklerini kapatacak şekilde yakaladığı anlamına gelmektedir. Dikkat edileceği gibi konjugatların yükleri de pozitiftir (zeta potansiyelleri 50.4-53.5 mV aralığında), bu da konjugat oluşumunda nanopartiküllerin gDNA'yı negatif yüklerini kapatacak şekilde yakaladığı ve fazla yükleri nedeniyle konjugat yükünün de pozitif olduğu söylenebilir. pH: 9.0 ve 10.0 da hem etkileşme miktarı hem de konjugatın yükü önemli miktarda düşmektedir. Bunu önceki bölümlerde de açıklandığı gibi, yüksek pH'lara gidildikçe katyonik nanopartiküllerin yüzeylerindeki amino grupların belli bölümünün hidroliz ile

karboksilik asite (negatif yük getirmesi beklenir) dönüşmesi sonucu partikülün net pozitif yükünün önemli miktarda düşmesi ile açıklamak mümkündür.



Şekil 4.34. Değişik pH değerlerinde gDNA-nanopartikül etkileşimi.

Partikül DNA etkileşimi tamamlandıktan sonra partikül boy/ boy dağılımı da Zeta Sizer ile ölçülmüştür. Zeta Sizer ölçümlerinde alınan sonuçlar Çizelge 4.13'de verilmiştir. Şekilde bir partikülün bir de DNA-partikül konjugatının değişik tampon ortamlarında davranışı görülmektedir. Nanopartikül boyunun pH 3.0-8.0 aralığında neredeyse sabit kaldığını buna paralel olarak partikül boy dağılımının oldukça dar ve partiküllerin hemen hemen monodispers olduğunu söylemek mümkündür. pH 9.0 da nanopartiküllerin boyu hemen hemen 2 katına çıkmaktadır. pH:10.0' da ise, daha önce söz edildiği gibi partikül hidrolizi nedeniyle kararlılık bozulmakta ve yığılmalar sonucu ölçülen boy 2000 nm'nin üzerine çıkmaktadır. DNA-partikül konjugatına ait değerler incelendiğinde, pH: 3.0' da ölçülen boy çok yüksektir (2339.4 nm). Büyük olasılıkla ilgili literatürde de söz edildiği gibi bu pH'da gDNA zincirleri açık durumdadır ve ortamdaki nanopartiküller (70 nm) ile (birden fazlasıyla) ve bunların üzerinden birbirleriyle etkileşerek yığınlar oluşturmaktadır.

pH: 4.0-8.0 aralığında ise konjugat boyunun 111.4-256.8 nm olduğu görülmektedir. Bu bölgede negatif yüklü DNA zincirlerinin pozitif yüklü nanopartikülün etkileşme sonucu katlanarak kompak yapıda konjugat oluşturduğunu söylemek mümkündür. Bu pH aralığında konjugat boyutunun çoğu durumda 2 katı olması bu etkileşmenin oldukça güçlü olduğunu ifade etmektedir. pH:9.0'da yine yığınlaşma eğilimi sonucunda çökme ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bu pH ve daha yüksek değerlerde çökme nedeniyle konjugat boyutu ölçülememiştir.

Çizelge 4.13. Nanopartikül ve DNA-nanopartikül konjugatlarının değişik tamponlardaki davranışlarına ait Zeta Sizer ölçümlerinden alınan sonuçlar.

pH	Nanopartikül Boyu* (nm)	DNA-Nanopartikül Konjugat Boyu* (nm)
3.0	70 (1.101)	2339.4 (2.0)
4.0	90.1 (1.075)	256.8 (1.366)
5.0	92.4 (1.156)	321.2 (1.415)
6.0	112 (1.425)	180.2 (1.198)
7.0	72.8 (1.104)	107.8 (1.127)
8.0	92.6 (1.165)	111.4 (1.140)
9.0	176.9 (1.375)	Çöktü
10.0	2044 (2.0)	Çöktü

* Parantez içindeki değerler polidispersite indeksini (PI) vermektedir.

Spektroskopik ölçümlerden yapılan hesaplamalar ve Zeta Sizer ölçümlerinden elde edilen sonuçlara dayanılarak en güçlü etkileşimin pH:7.0 civarında olduğu söylenebilir. Bu gruptaki deneysel çalışmaların en önemli sonucunun, fizyolojik pH'nın 7.4 olduğu göz önünde bulundurulduğunda, aşağıdaki bölümde ayrıntılı olarak incelendiği gibi bu nanopartiküllerin hücreye plazmid DNA aktarımında başarılı olacağı öngörüsüne ulaşılmasıdır.

4.4.2. Nanopartikül ile Hücreye Plazmid DNA Aktarımı

Sunulan tezin bu bölümünde, tez kapsamında geliştirilen katyonik nanopartiküllerin hücreye gen aktarımında (gen terapisinde) plazmid DNA (pDNA) taşıyıcı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması hedeflenmiştir. Suda çözünen polikatyonlar (polisin (PL), polietilenimin (PEI), vb.) gen terapisinde pDNA aktarımında yaygın olarak kullanılan ancak önemli yan etkileri ve sorunları olmasına karşılık viral vektörlere alternatif kullanılan "non-viral vektörler" arasında en önde yer alanlardır (Garnett, 1999; Nguyen ve ark., 2000; Han ve ark., 2000; Behr, 1993). Polikatyonlar, negatif yüklü pDNA ile konjugatlar oluştururken onların boyutunu oldukça küçültmekte (kondanse etmekte) hücre içine çok daha kolay alınmalarını sağlamaktadır. Bu konjugatların net yükü pozitiftir. Bu da konjugatların negatif yüklü hücre duvarıyla etkileşmelerini ve bunun sonucu çok daha kolaylıkla endositoz ile hücre içine alınmalarını sağlamaktadır. Ayrıca, bu fazla pozitif yük fizyolojik şartlarda taşıdıkları pozitif yük sayesinde endositoz pH'ı tamponlama etkisi ile yüksek kalmakta ve lizozomlar ile birleşip düşük pH'da enzim aktivitesi sonucu pDNA degredasyonunun oluşmasını engellemektedir. Polikatyonların bu önemli avantajlarına karşın, hücre içine taşıdıkları pDNA'yı kolay salmamaları sonucu transfeksiyonun ve plazmidin taşıdığı genin okunarak ilgili proteinin eksprese edilemediği, daha kısa bir ifadeyle transfeksiyon/ekspresyon veriminin viral vektörlere göre oldukça düşük olduğunu (genellikle %30'un alında) ifade etmek gerekir. Plazmid DNA ile değişik boy ve yüzey yüklerinde konjugat oluştururlar. Ayrıca, fazla pozitif yükün hücre toksisitesine yol açması da bu taşıyıcıların (vektörlerin) en önemli dezavantajlarındandır. Dolayısıyla viral vektörler yerine kullanılacak, onlar kadar etkin transfeksiyon/ekspresyon yapabilen ancak yan etkileri olmayan non-viral vektörlerin geliştirilmesi üzerine yoğun araştırmalar vardır. Sunulan çalışmanın bu bölümünde de tez kapsamında geliştirilen katyonik nanopartiküllerin non-viral vektörler olarak etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Non viral vektörün hücreye girişinde boyut çok önemli rol oynamaktadır. Bu konuyla ilgli literatürde çok sayıda çalışma vardır. Bunların bazıları şöyle özetlenebilir: Erbacher ve arkadaşları toroid yapıda ve 40-60 nm boyutunda PEI/DNA kompleksler elde etmişlerdir (Erbacher, 1999). Wightman ve arkadaşları, kompleks boyutlarının lineer PEI ile 121 nm, dallanmış PEI ile 200 nm civarında

olduğunu belirtmiştir (Wightman, 2001). Erbacher ve arkadaşları, PEI-*g*-glikoz/plazmid DNA kompleksinin boyut ve morfolojisinin N/P oranına, yapıdaki glikoz miktarına ve sakkaritin zincir uzunluğuna bağlı olduğu rapor etmiştir (Erbacher, 1999). Hinrichs, poli(DMAEMA-co-NIPA)/plazmid DNA kompleks boyutunu 200 nm boyutunda ölçmüştür (Hinrichs, 1999). Ahn, PEG-PEI/DNA kompleksinin tamamıyle nötral forma geçmesinin polimer/plazmid DNA oranı 0.8'de gerçekleştiğini, kompleks boyutlarının 129 nm ile 151 +/-3 nm arasında değiştiğini ve bu komplekslerin hücre içine yeterli miktarda girdiğini rapor etmiştir (Ahn, 2002). PEI/DNA ile yapılan çalışmada oluşan kompleksin agregasyona eğilimli olması ve hücrelere toksik olması nedeniyle ortama PEG eklemiştir. PEG eklenen polikatyonun kompleks boyu ve yüzey yükü biraz daha azalmıştır (100 nm civarında) (Boussif ve ark.,1995; Ogris ve ark., 1999; Nguyen ve ark., 2000). Zhu ve arkadaşları, PMMA çekirdeğe graft edilmiş PEI kabuğundan oluşan nanopartikülleri DNA ile etkileştirerek, 120 nm boyutlu monodispers kompleksler oluşturmuştur (Zhu ve ark., 2005). Kim ve arkadaşları, Dioksikolik asid modifiye-kitosan (DMAC)/plazmid DNA kompleksinin boyutunun kitosanın molekül ağırlığına bağlı olarak 130-300 nm aralığında değiştiği tesbit edilmiştir (Kim ve ark., 2001). Yıldız yapısındaki poliamidoamin dendrimeri ile yapılan çalışmalarda elde edilen kompleks (4 yada 6 kollu) boyutunun 600 nm'den büyük olduğu, transfeksiyon etkinliğinin ise kullanılan dendirimerin konsantrasyonuna bağlı olduğu rapor edilmiştir (Haensler ve ark., 1993; Kukowska-Latallo ve ark., 1996). Zuidam ve arkadaşları, 150 nm boyutta Poli(2-dimetil amino)etil metakrilat (pDMAEMA)/DNA kompleksleri elde etmiş ve tersiyer amin gruplarının kuaterner amin gruplarına göre daha etkin transfeksiyon sağladığını görmüştür (Zuidam ve ark., 2000;). Polietilenoksit/poli L-lizin (PEO-*b*-PLL) çekirdek-kabuk (core-shell) yapısınının yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu gösterilmiştir (Kwon ve ark., 1991; Kataoka ve ark., 2000). Prabha ve arkadaşları, biyouyumlu, 200 nm boyutta, poli(D,L-laktat-*co*-glikolat) (PLGA) nanopartikülleri plazmid DNA ile p53 geninin aktarılmasında kullanılmışlardır (Prabha ve ark., 2004). Zobel ve arkadaşları, katyonik *N*-monometilaminoetilmetakrilat hidroklorür (MMAEMA) ve metilmetakrilat (MMA) kopolimerlerinden hazırlanan nanopartikülleri oligonükleotid adsorpsiyonu ve oluşan konjugatın hücre içine aktarılmasında kullanılmıştır (Zobel ve ark., 2000). Poli(stiren/dimetilaminoetilmetakrilat) (poli(St/DMAEMA))

nanopartikülleri (250 nm) DNA'nın in-vitro transfeksiyonunda kullanılmış ve oldukça etkin transfeksiyona sahip olduğu görülmüştür (Pang ve ark., 2002).

4.4.2.1. Nanopartikül ile Plazmid DNA Etkileşimi

Tez kapsamında, önceki bölümlerde üretimleri ve özellikleri verilen iki farklı boyda ve türde (fonksiyonel grup içeren veya içermeyen) nanopartiküllerin pDNA aktarımında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bunlar, 50° ve 60°C'de sentezlenen partikül boyu 200 nm ve 77 nm olan poli(St/PEG-EEM/DMAPM) ve hem de 60° ve 65°C'de sentezlenen partikül boyu 200 nm ve 70 nm olan poli(St/PEG-MA/DMAPM) nanopartiküllerdir. Bu nanopartiküller, "Deneysel Çalışmalar" bölümünde ayrıntılı olarak sunulduğu gibi, pH 7.4'de (0.15 M NaCl ortamı) pDNA ile konjugatları hazırlanmış ve bunların Zeta Sizer ile boyutları ve zeta potansiyelleri (yükleri) ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.14'de topluca sunulmuştur. Kullanılan pDNA'nın yine Zeta Sizer ile ölçülen boy ve zeta potansiyeli (yükü), sırasıyla 740 nm ve -21 mV dir.

Çizelge 4.14. Partikül/DNA konjugatına ait Zeta Sizer ölçümleri.

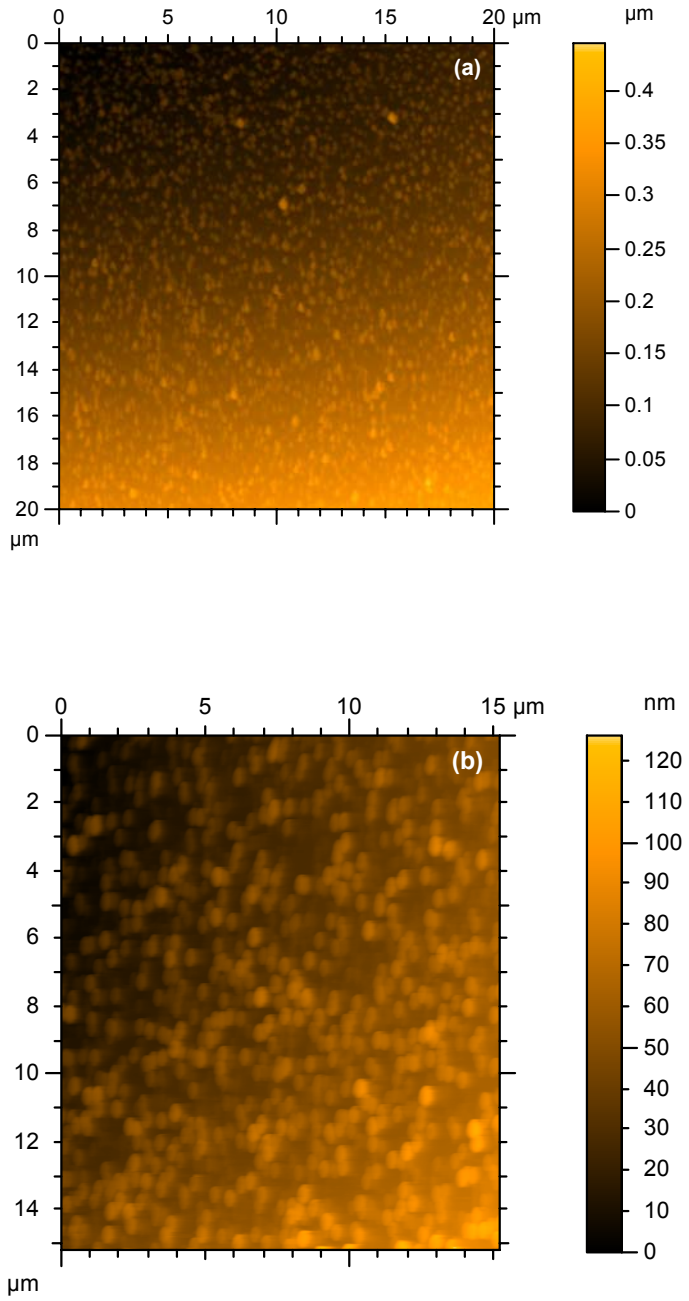
Nanopartikül Türü	Nanopartikül		Konjugat	
	Boyu* (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)	Boyu* (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
PEG-EEM/77	77.6 (1.142)	59	104.6 (1.175)	46
PEG-EEM/200	201.9(1.066)	54	378.3 (1.761)	43
PEG-MA/70	71.3 (1.099)	65	226.2 (1.554)	35
PEG-MA/200	208.2 (1.031)	55	Çöktü	20

* Parantez içindeki değerler polidispersite indeksini (PI) vermektedir.

Çizelge 14'de görüldüğü gibi yalnızca PEG-EEM ile hazırlanan iki farklı boydaki (77 ve 200 nm) nanopartiküller ve PEG-MA ile hazırlanan yalnız 70 nm boyutlu nanopartiküller ile konjugat oluşumu sağlanmıştır. Beklendiği gibi konjugat oluşumu ile ölçülen partikül boyu büyümüştür. Özellikle küçük partiküller kullanıldığında büyüme daha azdır. Konjugat oluşumu ile 740 nm boyutlu pDNA kondanse olmuş küçülmüştür. Hem PEG-EEM hem de PEG-MA ile hazırlanan daha küçük boyutlu nanopartiküllerin pDNA'yı çok daha iyi kondanse ettiği

anlaşılmaktadır. Yukarıda ilgili literatür tartışılırken belirtildiği gibi, küçük boyutlu konjugatlar ile hücre içine daha iyi aktarım beklenmelidir (Godbey ve ark., 1999; Dawson ve ark., 2004; Vijayanathan, 2002). Çizelgede gözlenen ikinci önemli bulgu, konjugat oluşumu ile partikül yükünün azalmasına karşın zeta potansiyel değerlerinin hala yüksek olması, başka bir ifadeyle konjugatların hala net pozitif yüklü olmasıdır ki bunun da hücre içine pDNA aktarımında başarı için önemli bir özellik olduğu ifade edilebilir (Zhue ve ark., 2005, Vijayanathan, 2002). Konjugat oluşumunda polidispersite indeksinin çok fazla değişmemesi, başka bir ifadeyle monodispersliğin korunmuş olması da homogen transfeksiyon sağlamak için pozitif bir özellik olduğu not edilmelidir.

Yapılan çalışmada AFM kullanılarak nanopartikül/pDNA konjugatının oluşumu takip edilmiştir. Şekil 4.35a ve b'de PEG-MA/70 (70 nm boyutlu) ile hazırlanan MA70 polimerine ve MA70/DNA konjugatına ait elde edilen görüntüler örnek olarak verilmiştir. İlk fotoğrafta görüldüğü gibi nanopartiküller mika yüzeyinde homojen bir şekilde dağılmıştır. Partiküller üzerlerinde taşıdıkları yükten dolayı birbirlerini itmekte ve aralarında bir mesafe bulunmaktadır. Şekil 4.35b'de ise konjugat oluşumuna bağlı olarak dağınık durumda bulunan partiküller gruplar oluşturmaktadır. Yalnız başına DNA nanopartiküllerden çok daha küçüktür. Bir tane negatif yüklü DNA'yı küçültmek için birden fazla sayıda pozitif yüklü partikülün bu DNA'nın etrafına toplanması beklenen bir durumdur. Bu görüntüde de gruplar halinde bulunan partiküllerin her bir DNA'yı saran partiküller olduğu düşünülmektedir. DNA'nın partiküllerle etkileşmesi ile kondenzat olacağı daha öncede belirtilmişti, dolayısıyla her bir partikül demetinin arasında kondenze olmuş DNA da yeralmaktadır.



Şekil 4.35. Örnek AFM görüntüleri (a) PEG-MA70 nanopartikülleri; ve (b) PEG-MA70/pDNA konjugatı.

4.4.2.2. Nanopartiküllerinin Toksisitesi

Nanopartiküllerin hücreye gen aktarımında kullanılmasında en önemli noktalardan birisi de toksisitesidir. Özellikle polikatyonik taşıyıcıların toksisitesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Poli(L-lisin) polikatyonik non-viral vektörler arasında en yaygın olarak kullanılan doğrusal zincirli suda çözünen bir polikatyondur. Üçüncül amino gruplarının protonlanmasıyla ortaya çıkan pozitif yükü pDNA ile konjugat oluşturmasına rağmen toksik etki yapmaktadır ve bunun azaltılması için çeşitli yaklaşımlar (PEG takma, vb. gibi) denenmiştir (Erbacher ve ark., 1999; Ahn ve ark., 2002; Benns ve ark., 2000). Suda çözünür formda farklı molekül ağırlığında düz ve dallanmış polietilenimin (PEI) hücre toksisitesi çeşitli yöntemlerle çok sayıda araştırıcı tarafından farklı hücre türleri üzerinde ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Boussif ve ark., 1995; Kircheis ve ark., 1997, 1999; Goula ve ark., 1998; Godbey ve ark., 1999; Wightman ve ark., 2001). Genel sonuç olarak yüksek molekül ağırlığında ve dallanmış PEI'ların diğerlerine göre daha toksik olduğu, özellikle toksik olanların düşük derişimlerde kullanılmaları gerektiği rapor edilmiştir. DNA ile konjugatlarının pozitif yükü DNA'nın negatif yükü ile etkileşme sonucu azalmasının toksisiteyi azalttığı bildirilmiştir. PMMA-PEI nanopartiküllerin çözünür PEI'den üç kez daha az toksik olduğu gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2005). Sıcaklık duyarlı poli(DMAEMA-co-NIPA)/plazmid komplekslerinin toksisitesinin kopolimer yapısındaki NIPA konsantrasyonunun artmasıyla azaldığını rapor edilmiştir. (Hinrichs, 1999). 150-200 nm partikül boyundaki polistiren nanopartiküllerle yapılan çalışmada partikül boy ve boy dağılımının hücre ölümlerinde etkin olduğu gösterilmiştir (Fritz ve ark., 1997). Nanopartiküllerin yalnızca materyalin türünden değil diğer katkı maddeleri veya bozunur ise bozunma ürünleri nedeniyle toksik olabileceği ifade edilmiştir. Poli(St/DMAEMA) nanopartikülleri ile yapılan çalışmada toksisiteye canlı hücre sayısı ile bakılmıştır ve nanopartikülün hücre içine aktarılmasından sonra hücre canlılığının %75 civarında olduğu dolayısıyla bu partiküllerin ılımlı toksisiteleri nedeniyle kullanılabilecekleri bildirilmiştir. (Pang ve ark., 2002).

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada seçilen nanopartiküllerin (PEG-EEM/77, PEG-EEM/200 ve PEG-MA/70) HeLa hücre hattı üzerindeki toksisiteleri incelenmiştir. Daha önce belirtildiği gibi, çok gözlü kaplara bölme başına 60×10^3 hücre HeLa hücresi konmuş (10% FCS ve 10 μl/ml penisilin-streptomisin içeren,

DMEMF besi yerinde), üzerlerine farklı miktarlarda (bölme başına 18-324 µg) nanopartikül konmuş, ve kaplar %5 CO_2 altında 37^{o}C sabit sıcaklıkta 48 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda her bir bölmeye 13 µl metilthiazolole tetrazolium (5 mg MTT/ml) eklenmiş ve 37°C'de %5 CO_2 içeren nemli atmosferde 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra MTT çözeltisinin yerine oluşan formazen kristallerini çözmek için her bir bölmeye 100 µl izopropanol eklenmiştir. Canlı hücre sayısı 570 nm'de UV ile hesaplanmıştır. Çizelge 4.15'de bu koşullarda verilen sürede kaplarda kalan hücre sayısı ve yüzde olarak hücre kaybı topluca sunulmuştur.

Görüldüğü gibi kültür ortamına eklenen nanopartikül miktarı arttıkça, canlı hücre sayısı azalmış yani toksisite artmıştır. En fazla hücre kaybının PEG-EEM/200 partikülleri ile olduğu gözlenmektedir. Bu partiküllerin hücre içine aktarılmasından sonra hücre canlılığı, aktarılan partikül miktarına bağlı olarak, %85-60 aralığında değişmektedir. PEG-EEM/70 ve PEG-MA/77 nanopartiküllerinin hücre içine aktarılmasından sonra hücre canlılığının sırasıyla %96-70 ve %95-67 civarında olduğu görülmektedir. 540 µg'ın üzerinde eklenen tüm polimerler hücreler için tamamen toksik gelmektedir. Gen transferi deneylerinde kullanılacak olan polimer miktarına denk gelen 180 µg polimer/bölme için elde edilen hücre canlılığı yüzdesi sırasıyla PEG-MA/70 için %84, PEG-EEM/77 için %81 ve PEG-EEM/200 için %74 olarak bulunmuştur. Bu değerler literatür ile oldukça iyi uyum içindedir (Pang ve ark., 2002). Nanopartiküllerin (PEG-EEM/200, PEG-EEM/70 ve PEG-MA/77) hücre içine aktarılmasından sonra görülen bu ılımlı toksisiteleri nedeniyle gen transferi deneylerinde kullanılabilecekleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.15. Nanopartiküllerin toksisitesi. Hücre hattı: HeLa; bölme başına konulan toplam hücre miktarı $60X10^3$; inkübasyon koşulları: besi yeri: 10% FCS ve 10 μl/ml penisilin-streptomisin içeren DMEMF, atmosfer: %5 CO_2; sıcaklık: 37°C ve süre: 48 saat.

Nanopartikül Özellik	Ortama Konulan Nanopartikül Miktarı (μg/bölme) 18	36	54	72	144	216	288	324
PEG-EEM/77								
Canlı Hücre Sayısı*	57.6	54	53	52	51	46	43	42
Hücre Kaybı (%)**	4.2	10	11.7	13.3	15	23.3	28.3	30
PEG-EMM/200								
Canlı Hücre Sayısı*	51	50	49	47	45	43	37	36
Hücre Kaybı (%)**	15	16.7	18.3	21.7	25	28.3	38.3	40
PEG-MA/70								
Canlı Hücre Sayısı*	57	54	52	52	51	49	41	40
Hücre Kaybı (%)**	5	10	13.3	13.3	15	18.3	31.7	33.3

* ($x10^3$ olarak)

** {(Başlangıç Sayısı-Son Sayı)/Başlangıç Sayısı} x 100

4.4.2.3. Nanopartiküller ile Gen Aktarımı ve Ekspresyon

Sunulan çalışmanın bu bölümünde seçilen ve yukarda pDNA ile konjugat oluşturma kabiliyetleri verilen nanopartiküller kullanılarak örnek hücrelere gen aktarım ve ekspresyonu incelenmiştir. Önceki bölümlerde söz edildiği gibi çok yüksek gen aktarım ve ekspresyon yeteneklerine karşın çok önemli yan etkileri nedeniyle viral vektörlerin yerine gen aktarımı için çeşitli non-viral vektörler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Genel olarak pDNA'nın hücre içine alınmasında başarılı olan, çoğu polimerik ve katyonik non-viral vektörler, gen ekspresyonunda başarısızdır. Bunun artırılması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Çözünür veya partikül formundaki bu vektörlerin yükleri, orjinal boyutları, pDNA ile konjugat oluşturma şekilleri ve etkileşim güçleri, bu konjugatların boy ve yüzey yükleri, ve hücre başına ortama ilave ediliş şekil ve miktarına göre gen aktarımı genellikle %5-70 civarında çıksa da gen ekspresyonu %5-35 civarında kalmaktadır (Dincer ve ark., 2005; Molas ve ark., 2003; Vijayanathan ve ark., 2002). Yapılan çalışmalar ve kısaca tartışmaları şöyle özetlenebilir:

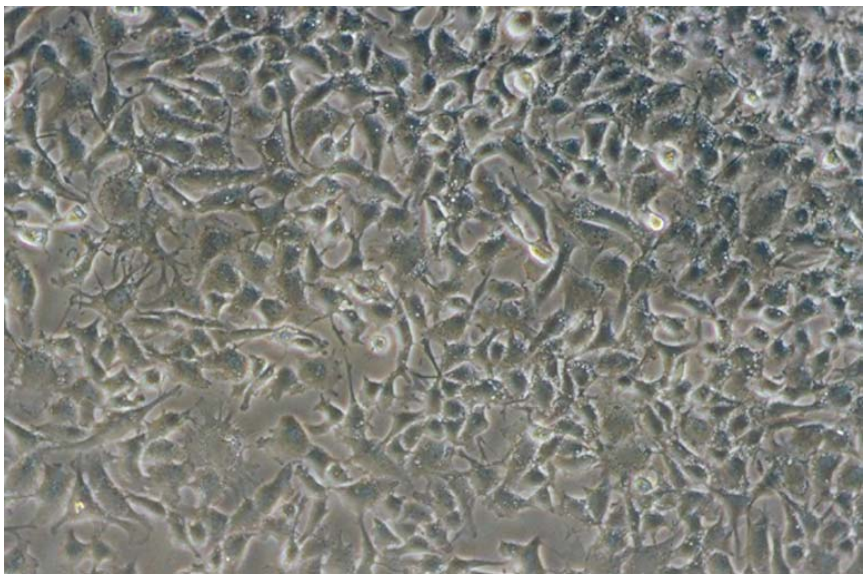
Godbey ve arkadaşları, farklı yapıda PEI'lerden farklı N/P oranlarında hazırladığı komplekslerin transfeksiyon yeteneklerini incelemiş ve transfeksiyonun 1.8 μg PEI/μg plazmid (N/P= 13.33) oranına kadar arttığını, düşük N/P oranlarında transfeksiyonun çok az gerçekleştiğini ve bu oranın üzerindeki oranlarda (N/P=20) da ise transfeksiyonun önemli derecede azaldığını rapor etmiştir. (Godbey, 1999). Wrightman, lineer ve dallanmış PEI25'in gen transfeksiyon özelliklerini karşılaştırmış ve lineer PEI25'in daha fazla gen ekspresyonu sağladığı sonucunu elde etmiştir (Wightman, 2001). Kim, lipoprotein/poli L-lizin/LDL terpolimeri plazmid DNA ile endotel ve düz kas hücrelerinin transfeksiyonu için kullanmış ve farklı oranlarda polimer/plazmid komplekslerini araştırmıştır. Öncesinde 100 μM klorokuin ile etkileşime tabi tutulan hücrelerde transfeksiyon oranı %30 civarında bulunmuştur (Kim,1997). Horbinski, lineer polietilenimin ile nöron hücrelerine polimer/plazmid oranı 0.2'de maksimum transfeksiyona ulaşılmıştır (Horbinski, 2001). Godbey, PEI ile endotel hücreleri transfekte ettiğinde çıplak plazmid DNA ile transfekte edilenlere oranla 16, 8.3, 6, 7 kat daha fazla transfeksiyon elde etmiştir. (Godbey ve ark, 2001). Bos ve ark., pDMAEMA/plazmid DNA ile yapılan transfeksiyonlar da optimal başarı polimer/plazmid oranı 3:1 (w/w)'da yüksek bulunmuştur (Bos ve ark., 2004). Ogris ve arkadaşları, polikatyonik peptid mellitin ile kovalent olarak bağlı PEI'nin transfeksiyon yeteneklerini araştırmıştır. Mellitin/PEI/plazmid DNA ile endotel hücrelerin transfeksiyonun da gen ekspresyon oranı %40 iken PEI/plazmid DNA komplekslerinin transfeksiyon oranı %10 olarak elde etmiştir (Ogris, 2001). Min ve arkadaşları, GV1 ve GV2 hedef peptidleri takılı HA20(protein)/poli-L-lizin taşıyıcı olarak kullanıldığında , %50-60 oranında gen ekspresyonu elde edilmiştir. Özellikle GV1/HA20/poli L-lizin ile plazmid DNA endotel hücrelere aktarıldığında transfeksiyon oranı %70 civarında, aynı plazmid HA20/protamin taşıyıcısı ile aktarıldığında gen transfeksiyon oranı %30 civarında olduğunu rapor etmiştir (Min, 1999). Kim, deoksikolikasit modifiye kitosan (DMAC) ile yaptığı COS-1 hücrelerine transfeksiyon çalışmasında polimerin yapısında artan kitosan molekül ağırlığının transfeksiyonu etkilediğini göstermiştir. En yüksek transfeksiyon DMAC ana zincirinde bulunan kitosan molekül ağırlığı 40 kDa iken elde edilmiştir. (Kim ve ark., 2001). Sıcaklık ve pH'ya duyarlı sistemler ile DNA aktarımı ve transfeksiyonun kontrol edilebilecegi fikrinden yola çıkılarak, NIPA bazlı polimerler geliştirilmiş ve transfeksiyon kabiliyetleri

incelenmiştir. Hinrichs ve arkadaşları, DMAEMA-co-NIPA kopolimerleri ile transfeksiyon çalışmaları sonucunda, maksimum transfeksiyonun polimer/plazmid DNA oranı 4'de elde edildiğini, oranın 4'ün üzerine çıktığında toksisiteden dolayı transfeksiyonun düştüğünü gözlemiştir. Poli(DMAEMA-co-NIPA) kopolimeri ile DMAEMA homo polimerinin transfeksiyon yeteneklerini karşılaştırdığında homo polimerin transfeksiyon oranı daha yüksek bulmuştur (Hinrich, 1999). Kurisawa ve arkadaşları, sıcaklık duyarlı NIPA, hidrofobik BMA'dan oluşan poli(NIPA)-co-DMAEMA-co-BMA(bütilmetakrilat) terpolimeri sentezlemiş. Terpolimer/plazmid DNA 37^{o}C'de 48 saat hücrelerle etkileştirildiğinde transfeksiyon oranı 20^{o}C'de 3 saat ve 37^{o}C'de 45 saat hücrelerle etkileştirildiğindeki transfeksiyon oranından yüksek bulunmuştur. Bu sonucun aksine terpolimer/plazmid DNA 20^{o}C'de 3 saat daha sonra 37^{o}C'de 45 saat etkileştirildiğinde elde edilen transfeksiyon oranı 37^{o}C'de 48 saat etkileştirildiğindeki transfeksiyon oranından yüksek olduğunu rapor etmiştir. (Kurisawa, 2000).

Zhu ve arkadaşları, PMMA/PEI nanopartikülleri DNA ile etkileştirerek HeLa hücre kültürlerinde denemiş ve PEI25K ile kıyaslamıştır. PMMA/PEI nanopartikülleri MMA/PEI (w/w) oranı 1:2 iken PEI'ne kıyasla daha çok transfeksiyon elde edilmiştir. N/P oranı 5.5:1 olan PMMA/PEI/DNA kompleksinin N/P oranı 5.3:1 oranında PEI/DNA kompleksinde üç kez daha etkin transfekte ettiği gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2005). Prabha ve arkadaşları, PLGA/DNA nanopartiküllerinin DNA'yı güçlü bir şekilde tutttuğunu, hücre içine aktarılırken endozomal bölümden kaçan nanopartiküllerin sitozolik kısma yerleştiğini buna bağlı olarak, DNA'nın nanopartikülden çok yavaş ayrıldığını ve gecikmeli gen transferinin (transfeksiyondan 3 gün sonra) oluştuğunu belirtmişlerdir. (Prabha ve ark., 2004). Pang ve arkadaşları, PS/DMAEM nanopartikülleri ile yaptığı transfeksiyon çalışmalarında transfeksiyonun endositoz yoluyla hücre çekirdeğinde gerçekleştiğini, hem kompleks boyuna hemde yüklenen DNA miktarına bağlı olduğunu göstermiştir. β galaktosidaz aktivitesinin PS/DMAEM nanopartiküllerine yüklenen DNA miktarı ile arttığı ancak PS ile yapılan deneylerde artan DNA miktarı ile aktivitenin düştüğü gözlemlenmiştir (Pang ve ark., 2002). Olbrich, katı-lipid nanopartikülün (SLN) PEI ve poli L-lizin'e göre transfeksiyon yeteneğini araştırmış ve transfeksiyon oranını %20 daha yüksek bulmuştur (Olbrich, 2001). Yu,

polikatyonik terpleks sistem kullandığında ticari olarak satılan lipofektaminden çok yüksek oranda transfeksiyon yaptığını tesbit etmiştir (Yu, 2001).

Sunulan çalışmada örnek hücre hattı olarak daha önce benzer çalışmalarda kullanılan HeLa seçilmiştir. Bu hücre hattının kültür kaplarının yüzeylerinde oluşturdukları tek tabakanın görüntüsü Şekil 4.36'da örnek olarak sunulmuştur. Özellikle gen ekspresyonunun izlenmesinde kolaylık sağlamak üzere, aktarıldığı hücrede ekspresyonunun gerçekleştiğinin floresan mikroskop altında hücrelerin yeşile boyanması ile belirlenmesini sağlayan yeşil florasan proteini (GFP) geni taşıyan plazmid (GFP-pDNA) kullanılmıştır. Bu plazmid satın alınma yoluyla temin edilmiş, istenilen miktarlarda kullanım için *E.Coli* içinde üretilmiş ve saflaştırılmıştır. Bu bölüm halen devam eden başka bir doktora çalışmasının konusudur.



Şekil 4.36. Kültür kabında tek tabaka oluşturmuş HeLa hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü

Gen aktarımının incelendiği deneylerde önce 3 farklı nanopartikül ile pDNA konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun için pH 7.4'de (0.15 M NaCl ortamı) pDNA ile konjugatları hazırlanmış ve bunların Zeta Sizer ile boyutları ve zeta potansiyelleri (yükleri) ölçülmüştür. Daha sonra floresan işaretli nanopartiküller (PEG-EEM/77, PEG-EEM/200 ve PEG-MA/70) HeLa hücrelerinin (bölme başına $15X10^3$ hücre) tek tabaka ile kapladığı doku kültür kaplarına ilave edilmiş (bölme başına 18, 54, 108, 162, 216, 360 μg polimer) ve 37°C'de, %5 CO_2 ortamında inkübasyon sağlanmıştır. İşaretli partiküller hücrelerle 3 saat etkileştirilmiştir.

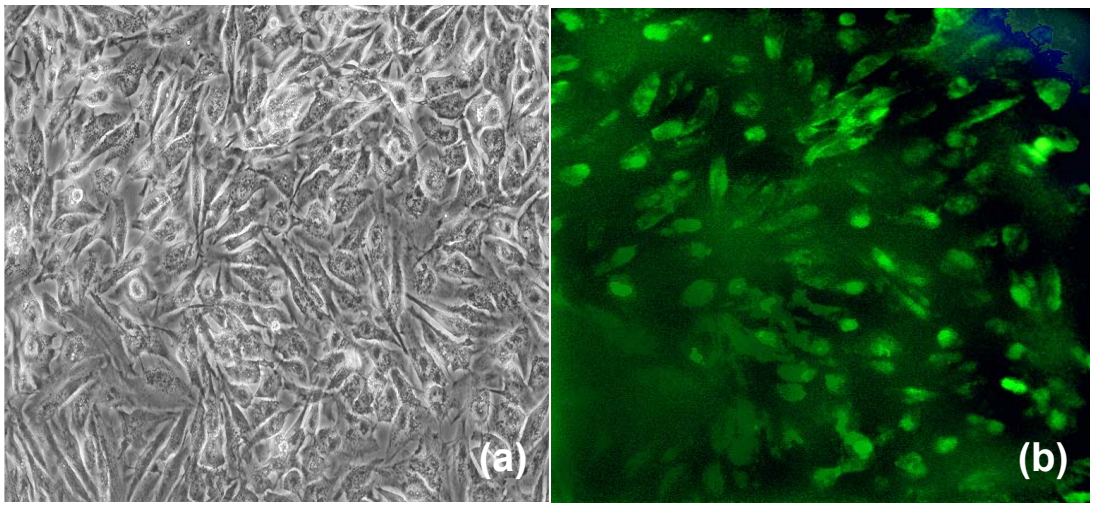
İnkübasyon sonrası her kapta işaretlenen hücrelerin sayısı Floresan ataçmanlı inverted mikroskop altında sayılmış ve % aktarım değerleri, floresan ışık altında parlayan hücre sayısının toplam hücre sayısına oranlanmasıyla bulunmuştur. Burada en az 5 sayıda paralel çalışma yapıldığı ve bunların ortalamalarının alınarak çizelgeye yerleştirildiği not edilmelidir. Sonuçlar Çizelge 4.16'da topluca sunulmuştur. Başarılı bir partikül aktarım işleminde aktarım sonrası hücrelerin floresan mikroskop altında çekilen görüntüsü Şekil 4.37a ve b de verilmiştir. Floresan işaretli partiküllerin hücrelere aktarımında elde edilen bu yüksek partikül aktarım yüzdeleri sonucu yapılan gen ekspresyonu deneylerinde ekspresyon çok yüksek (%85-90 civarında) çıkmıştır. Dolayısıyla gen aktarımının da en az %85-90 civarında olduğu tahmin edildiğinden, genin hücreye aktarımı ayrıca incelenmemiştir.

Çizelgede görüldüğü gibi partiküller (PEG-EEM/77, PEG-EEM/200 ve PEG-MA70) için gözlenenen gen aktarımı, literatürde verilen çalışmalarla (Kim, 1997; Ogris, 2001; Min, 1999) kıyaslandığında oldukça yüksektir. Literatürde verilen en yüksek gen aktarımı %70 civarında iken yapılan çalışmada elde edilen partikül aktarımı %91-93 aralığında, kabul edilen gen aktarımı ise %85-90 üzerindedir. Nanopartiküllerin yüzeylerinde taşıdığı yüksek yük miktarı buna neden olarak gösterilebilir. Ayrıca nanopartiküllerde yer alan PEG zincirinin toksisiteyi azaltarak, gen aktarım kapasitesini arttırdığı da düşünülmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmada taşıyıcı polimere PEG eklenmesinin ya da PEG miktarının arttırılmasının toksisiteyi düşürüp gen aktarımını arttırdığı not edilmektedir (Caputo, 2003; Bos, 2004). Yapılan çalışmada %93'lük en yüksek partikül aktarımı küçük boyutlu partiküller ile elde edilmektedir. Küçük partiküller hem taşıdıkları yüksek yüzey yükü hem de partikül boyutlarının küçüklüğü nedeniyle hücre zarından daha rahatlıkla hücre içine girebilmektedir ve yüksek aktarım sağlamaktadır. Partikül aktarımının izlendiği floresan mikroskobunda bölme başına 180 μg polimer eklendiğinde %91'in üzerindeki bu partikül aktarımlarında çok parlak floresan ışıma görülmüştür. Ancak, ortama eklenen polimer miktarının arttırılmasıyla birlikte artan toksik etki nedeniyle transfeksiyon veriminin düşmeye başladığı görüldüğünden, transfeksiyon çalışmalarında bölme başına 180 μg polimer kullanılmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.16. HeLa hücrelerine partikül aktarımı ve GFP-pDNA konjugatının GFP ekspresyonu.

Nanopartikül Türü	Partikül Aktarımı (%)	Gen Ekspresyonu (%)
PEG-EEM/77	93	90
PEG-EMM/200	91	85
PEG-MA/70	93	90

* Yakjlaşık 5 tekrar deneyin ortalaması ± 5 standart sapmaları.



Şekil 4.37. Kültür kabında tek tabaka oluşturmuş HeLa hücrelerine partikül aktarımı: (a) Işık mikroskobu ve (b) Floresan mikroskobu

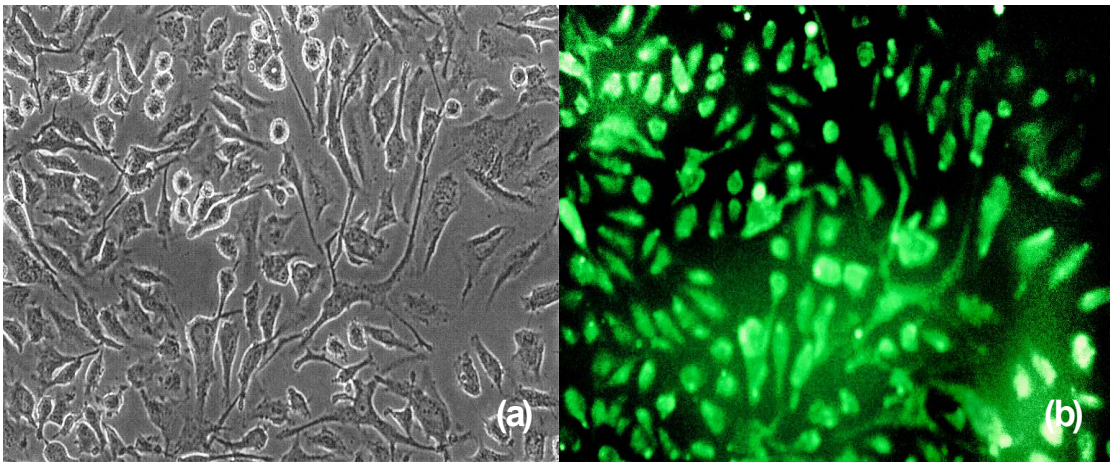
Gen ekspresyon deneylerinde ise floresan ile işaretleme yapılmamış nanopartiküller (PEG-EEM/77, PEG-EEM/200 ve PEG-MA/70) HeLa hücrelerinin (bölme başına $60X10^3$ hücre) tek tabaka ile kapladığı doku kültür kaplarına ilave edilmiş (bölme başına 180 μg polimer) ve 37°C'de, %5 CO_2 ortamında inkübasyon sağlanmıştır. İnkübasyon süresi 3.5 saattir. Kopolimerin içeri alınmasından 4 saat sonra ve GFP ekspresyonunun başlamasından 72 saat sonraki transfeksiyonlar floresan ataçmanlı inverted mikroskop ile izlenmiştir. GFP ekspresyonu olan yeşil renkli hücrelerin sayısı mikroskop altında sayılarak belirlenmiş ve toplam hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpılarak gen ekspresyon yüzdesi bulunmuştur. Sonuçlar yine Çizelge 4.16'ın sağ taraftaki son kolonunda topluca sunulmuştur. Başarılı bir gen ekspresyon işleminde ekspresyon öncesi ve sonrası hücrelerin ışık ve floresan mikroskop altında çekilen görüntüsü Şekil 4.38a ve b de verilmiştir.

Çizelgede görüldüğü gibi tüm partiküller (PEG-EEM/77, PEG-EEM/200 ve PEG-MA70) için gen ekspresyon yüzdeleri literatürde verilen değerlerden oldukça yüksektir (Dincer ve ark., 2005). Literatürde rapor edilen polimer/plazmid komplekslerine ait GFP ekspresyon yüzdesi genellikle %5-35 civarındadır. Yapılan çalışmada gözlenen gen ekspresyonu %85-90 civarındadır. En düşük ekspresyon %85 ile yine PEG-EEM/200 nanopartikülüne aittir. Bunun nedeni nanopartiküllerin toksisitelerinin diğer partiküllere oranla daha yüksek olması olabilir. Ayrıca bu partiküllerin oluşturdukları polimer/plazmid komplekslerinin boyutları (378.3 nm) ideal bir gen ekspresyonu için gerekli olan boyuttan (200-300 nm) biraz daha büyüktür.

Küçük boyutlu nanopartiküllerin pDNA'yı çok daha iyi kondanze ettiği buna bağlı olarakta küçük boyutlu konjugatlar ile daha yüksek aktarım elde edildiği ilgili literatürde belirtilmiştir (Godbey ve ark., 1999; Dawson ve ark., 2004; Vijayanathan, 2002). Konjugat oluşumu ile partikül yükü azalmasına karşın zeta potansiyel değerlerinin hala yüksek olması, başka bir ifadeyle konjugatların hala net pozitif yüklü olmasıdır ki bunun da hücre içine pDNA aktarımında başarı için önemli bir özellik olduğu ifade edilebilir (Zhue ve ark., 2005, Vijayanathan, 2002). Konjugat oluşumunda polidispersite indeksinin çok fazla değişmemesi, başka bir ifadeyle monodispersliğin korunmuş olması da homojen transfeksiyon sağlamak için pozitif bir özellik olduğu not edilmelidir. Yapılan çalışmada kullanılan küçük

boyutlu nanopartiküller (PEG-EEM/77 ve PEG-MA/70) en yüksek gen ekspresyonu (%90) etkinliğine sahiptir. Bu partiküllerin oluşturduğu polimer/plazmid kompleksleri daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi oldukça küçüktür (PEG-EEM/77 için 104.6 nm ve PEG-MA/70 226.2 nm) ve kompleks oluşturmalarına rağmen yüzeylerinde önemli ölçüde pozitif yüke (sırasıyla 46 mV ve 35mV) sahiptir. Ayrıca bu partiküllerin düşük toksisiteleri de gen ekspresyonu etkinliklerini daha da arttırmaktadır.

Sonuç olarak, literatürde yapılan diğer çalışmalarla kıyaslandığında oldukça yüksek gen aktarım ve gen ekspresyonu kapasitesine sahip bu polimerik nanopartiküllerin ideal bir gen taşıyıcı olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.38. Kültür kabında tek tabaka oluşturmuş HeLa hücrelerinde gen ekspresyonu: (a) Işık mikroskobu ve (b) Floresan mikroskobu

5. SONUÇLAR

Sunulan araştırmada elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile daha saf ve eşboyutlu nanopartiküller üretilmiş ve detaylı olarak karakterize edilmiştir. Oluşan nanopartiküller bu yöntemle çalışmalara göre çok daha küçük boyutludur ve üzerlerinde yüksek katyonik yüke sahiptir toplam dönüşüm yüzdeleri %79-99% aralığındadır.

- İlk grup deneylerde, yüzeylerinde fonksiyonel grup taşımayan katyonik nanopartiküller üretilmiştir. Daha sonra bu reçetede yer alan stabilizörün değiştirilmesiyle taşıdıkları katyonik yükün yanısıra hidroksil uç grupları da taşıyan partiküller hazırlanmştır. Polimerizasyon koşulları reçetelerde yer alan ana monomer, katyonik monomer, polietilen bazlı stabilizör, başlatıcı ve monomer/dispersiyon oranı değiştirilerek taranmıştır. Her birinin partikül boy/boy dağılımında etkisi olduğu görülmüştür.

- Zeta Sizer ile yapılan karakterizasyonda, en küçük boyutlu partikül 120 ml su, 1.25 ml St, 0.1 ml DMAPM, 0.1 ml PEG-EEM veya PEG-MA ve 0.03 g V-50 reçetesiyle elde edilmiştir. Buradaki katyonik poli(St/DMAPM/PEG-EEM) partiküllerin zeta potansiyeli: 56.2 mV, ortalama çap: 75.1 nm ve boy dağılımı PI: 1.081 dir. Aynı şekilde poli(St/DMAPM/PEG-MA) partiküllerinin boyu 71.3 nm, PI: 1.110 ve zeta potansiyeli 55.6 mV olarak bulunmuştur.

- Katyonik monomer ve stabilizör miktarının artmasıyla partikül boyu önemli ölçüde azalmaktadır. Artan ana monomer ve dispersiyon ortamı ile partikül boyunun arttığı görülmüştür. Başlatıcı miktarının artmasıyla partikül boyunda önemli bir artış görülmemiştir.

- Daha sonra bu reçeteye bağlı kalınarak polimerizasyon sıcaklığı, süresi, ortam pH ve iyonik gücü değiştirilmiş, bunların partikül boy/boy dağılımı ve yüzey yüküne olan etkileri araştırılmıştır. 60°C de poli(St/DMAPM/PEG-EEM), 65°C de poli(St/DMAPM/PEG-MA) partikülleri en küçük boyutta elde edilmiştir. İlk 3 saatlik polimerizasyon süresinde partiküller oluşmuştur. pH'nın artmasıyla birlikte partikül boyu artmaktadır. Partikül boyu pH 2-9 aralığında 80-90 nm

olarak bulunmuştur, zeta potansiyeli ise 50-60 mV civarındadır. Polimerin izoelektrik noktası pH 10.5 olarak bulunmuştur. Ortamdaki tuzun artmasıyla birlikte partikül boyuda büyümektedir. Yüksek tuz derişimlerinde lateks kararlılığı bozulmaktadır.

- Ana monomer olarak MMA kullanılmasının uygun olmadığı yapılan optimizasyon çalışmasıyla gösterilmiştir. MMA elde edilen partiküller oldukça yüksek yüzey yüküne sahip olmasına rağmen, lateks kararlılıkları yeterli değildir.

- Manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Yukarıda verilen reçete kullanılarak 77 ve 130 nm lik manyetitler polimer ile kaplanmıştır. Üretilen manyetik poli(St/DMAPM/PEG-EEM) ve poli(St/DMAPM/PEG-MA) nanopartiküllerin boy/boy dağılımı 155.7 nm/1.355, 89.3 nm/1.617, 200.6 nm/1.141, 164.9 nm/1.105 ve yükleri 53.4, 54.6, 47.6, 50.9 mV dur.

- Polimer ile kaplama öncesi ve sonrası elde edilen ESR spektrumlarından sentezlenen nanopartiküllerin geniş ve asimetrik tek çizgili bir rezonans eğrisine sahip olduğu belirlenmiştir. Burada yapı içinde yer alan manyetitlerin varlığı saptanmıştır.

- Önceki bölümlerde sentezlenen nanopartiküller nükleik asitlerle etkileştirilerek çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- Sentezlenen katyonik nanopartiküller (poli(St/DMAPM/PEG-EEM)) ilk önce gDNA ile etkileştirilmiş maksimum etkileşim gösterdiği pH aralığı 3.0-8.0 olarak bulunmuştur. Bu aralıkta gDNA'nın birim ağırlıktaki nanopartikülle etkileşim miktarı 204-215 mg gDNA/g nanopartiküldür. Oluşan konjugatların boyları, pH 4.0-8.0 aralığında 111.4-256.8 nm dir

İki farklı boyda (70 ve 200 nm) üretilen fonksiyonel grup içeren ve içermeyen nanopartiküller GFP sentezleme geni taşıyan pDNA ile etkileştirilmiştir. Oluşan konjugatların boyları PEG-EEm/77, PEG-EEM/200 ve PEG-MA/70 için sırasıyla 104.6, 378.3 ve 226.2 nm olarak bulunmuştur. Yüzey yükleri ise 35-46 mV aralığındadır. Nanopartiküllerin HeLa hücre hattı üzerindeki toksik etkileri

incelenmiştir. Toksisite PEG-MA/70 için %16, PEG-EEM/77 için %19 ve PEG-EEM/200 için %26 olarak bulunmuştur. Konjugatların hücre kültür ortamlarında HeLa hücre hattını transfeksiyonu ve GFP ekspresyonu incelenmiştir. Gen ekspresyonunun %85-90 civarında olduğu bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

Abdallah, B., Sachs, L., Demeneix, B.A., 1995, Biol. Cell, 85, 1-7.

Ahn, C.H., Chae, S.Y., Bae, Y.H., Kim, S.W., 2002, Biodegradable poli(ethylenimine) for plazmit DNA delivery. Journaj of Control. Rel. 80, 273-282.

Anderson, W.F., 1998, Human gene therapy, Nature 392, 25-30.

Anderson, W.F.,1992, Human gene therapy Science, 256, 808.

Anderson, W.F., 199 4, Gene theray for AIDS. Human Gene Therapy, 5, 149.

Antonietti, M., 1995, Macromol. Chem. Phys., 196, 441.

Arda., E., Özer, F., Pişkin, E., Pekcan, Ö., 2001, J.Colloid Interface Sci., 233, 271.

Arda, M., 1985, Genel Bakteriyoloji, A.Ü. Vet. Fak . Yayınları.

Arias, J.L., Gallardo, V., Gomez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A.V., 2001, , Journal of Controlled Release, 77, 309-321.

Asmatulu, R., Claus, R. O., 2004, Materials Research Soc. Symp. Proceedings, 788, 479-484.

Atik, S.S, Thomas, J.K., 1981, J. Am. Chem. Soc.,103, 4279.

Babaç, C., et al, 2004, European Polymer Journal, 40, 1947-1952.

Babes, L., Denizot, B., ve ark., 1999, j. Of Colloid and And Interface Science, 212, 474.

Bacri, J., Perzynski, R., Salin, D., Cabuil, V., Massart, R.,1990, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 85, 27.

Bailey A., Sullivan S.M., 2000, Biochim Biophys Acta, 1468, 239-252.

Batel, R., Jaksic, Z., Bihari, N., Hamer, B., Fafandel, M., Chauvin, C., Schröder, H.C., Müller, W.E.G., Zahn, R.K., 1999, Analytical Biochem., 270, 195-200.

Behr, J.P., 1993, Acc. Chem. Res., 26, 274-278.

Behr, J.P. 1996, Med. Sci. 12,56-58.

Benns, J. M., Choi, J. S., Mahato, R. I., Park, J. S., Kim, S. W., 2000, Bioconjug. Chem. 11, 637–645.

Betancourt-Galindo, R., Saldivar, R., Rodriguez-Fernandez, O. S., 2004, Polymer Bulletin, 6, 395-402.

Bielinska, A.U., Kukowskalatallo, J.F., Baker, J.R. 1997, Biochim.Biophys. Acta, 1353, 180–190.

Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N., 2002, Transport Phenomena. New York: Wiley.

Bleger, F., Murthy, A.K., Pla, F., Kaler, E.W., 1994, Macromolecules, 27, 2559.

Blesa, M.A., Matijevic, E., 1985, Adv. Colloid. Interf. Sci. 29, 173.

Blessing, T., Remy, J.S, Behr, J.P., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci., 95, 1427-1431.

Bocanegra-Diaz, A., Mohallem, N.D.S., Sinisterra, R.D., 2003, Preparation of a ferrofluid using cyclodextrin and magnetite, J. Braz. Chem. Soc., 14, 936-941.

Bos, G.W., Kanellos, T., Crommelin, D.J.A., Hennink, W.E., Howard, C.R., 2004, Vaccine, 23, 460-469.

Boussif, O., Lezualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J.P., 1995, Proc. Natl. Acad., Sci. U.S.A., 92, 7297-7301.

Boussif, O., Zanta M. A., Behr, J. P., 1996, Gene Ther., 3, 1074–1080.

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 7297-7031.

Brabers, V.A.M., 1995, in Handbook of Magnetic Materials, Vol. 8 (Ed.: K. H. J. Buschow), Elsevier Science, pp. 189.

Brandrup, J., Immergut, E.H., 1989, Polymer Handbook, 3rd edition, John Wiley: New York.

Brunner, S., Fürtbauer, E., Sauer, T., Kursa M., Wagner. E., 2002, Gene Therapy, 7, 401-407.

Bulte, J.W., de Cuyper, M.M., Despres, D., Frank, J.A., 1999, Journal of Magnetism and Magnetic Materials,194, 204.

Candau, F., Yong, Y.S., Fitch, R.M., 1985, J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 23, 193.

Candau, F., 1987, Encyclopedia of Polymer Sci. and Engineering, John Wiley: New York, Vol. 9, pp. 718-724.

Candau, F., 1992, Polymerization in Organized Media, Gordon and Breach: Paris, Chapter 4.

Cannon, P.M., Anderson, W.F., 2000, In: Smyth Templeton, N., Lasic, D.D. (Eds), Gene Therapy:Therapeutic Mechanisms an Strategies, Marcel Dekker: New York.

Capec, I., 2000, Eur. Polym. J., 36, 255.

Capecchi, M., 1980, Cell, 22, 479.

Caputo, A., et al, 2003, Tat. Vaccine, 21, 1103-1111.

Champe, S.P., Lewis, C., 1995, Microbiology, 141, 1821–1828.

Chatterjee, J., Haik, Y., Chen, C., 2002, Journal of Magnetic Materials, 246, 382-391.

Chatterjee, J., Haik, Y., Chen, C., 2003, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 257, 113-118.

Chatterjee, J., Haik, Y., Chen, C., 2001, Journal of Magnetic Materials, 225, 21.

Chatterjee, J., Haik, Y., Chen, C., 2001, Colloid Polym. Sci., 279, 11073.

Charmot, D., 1989, Progr. Colloid Polym. Sci., 76, 94.

Chavany, C., Le Doan, T., Couvreur, P., Puisieux, F., Helene, C., 1992, Pharm. Res., 9, 441-449.

Chen, C.Y., Piirma, I., 1980, J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 18, 1979.

Chen, Q., Rondinone, A.J., Chakoumakos, B.C., Zhang, Z. J., 1999, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 194, 1-7.

Chesnoy S., Durand D., Doucet J., Beer Stolz D., Huang L., 2001, Pharmaceutical Research, 18, 1480-1484.

Cho, H., Harrıson, K., Schwartz, O., Kehrl, J.H., 2003, Biochem. J., 371, 973-980.

Choi, Y. H., Liu, F., Choi, J. S., Kim, S. W., Park, J. S., 1999, Hum. Gene Ther., 10, 2657–2665.

Cornell, R. M., Schertmann, U., 1996, The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses, VCH Publishers, Weinheim.

Cornell, R.M., Schertmann, U.,1991, Iron Oxides in the Laboratory; Preparation and Characterization., VCH, Weinheim.

Crook, K., McLachlan, G., Stevenson, B. J., Porteous, D. L., 1996, Gene Ther. 3: 834–839.

Dash, P.R., Toncheva, V., Schacht, E., Seymour, L.W., 1997, J. Controlled Release, 48: 269.

Dass, C.R., et al, 1997, Drug Deliv., 4, 151.

David, G. Özer, F., Simionescu, B.C., Zarei, H., Pişkin, E., 2002, Eur.Polym. J., 38, 73.

Dawson, M., Krauland, E., Wirtz, D., Hanes, J., Biotechol. Prog., 2004, 20, 850-857.

Deng, J., Peng, Y., He, C., Long, X., Li, P and Chan, A., 2003, Polymer International. 52, 1182-1187.

Deng, Y., Wang, L., Yang, W., Fu, S., Elaissari, A., 2001, J. Magn. Magn. Mater,225, 127.

Deminie, C.A., Emerman, M., 1993, J. Virol., 67, 6460.

Dickson, D.P.E., Walton, S.A., Mann,S., Wong, K., 1997, Nanostructured Materials, 9, 595.

Dincer, S., Koseli, V., Kesim, H., Rzaev, Z.M.O., Piskin, E., 2002, Eur. Polym., J., 38, 2143.

Dinçer, S., Tuncel, A, Pişkin, E., 2002, Macromol. Chem. Phys., 203, 1460-1465.

Dinçer, S, et al, 2005, Gene Therapy, baskıda.

Dresco, P.A., Zaitsev, V.S., Gambino, R.J., Chu, B., 1999, Langmuir, 15, 1945-1951.

Duguid, J.G., Li, C., Shi, M., Logan, M.J., Alila, H., Rolland, A., Tomlinson, E., Sparrow, J.T., Smith, L.C., 1998, Biophys. J., 74, 2802-2814.

Dyer, M. R., Herrling, P.L., 2000, Mol. Ther. 1, 213-224.

Edwards, T.M., ve ark., 1996, Planet. Space Sci., 44, 371-386.

Elaissari, A., Cros, P., Pichot, C., Laurent, B., Mandrand, B., 1993, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 83, 25-31.

Elaissari, A., Rodrigue, M., Meunier, F., Herve, C., 2001, J. Magn. Magn. Mater., 225, 127.

Erbacher, P., Bettinger, T., Belguise, V. P., 1999, J Gene Med., 1, 210–222.

Erbacher, P., Zou, S., Bettinger, T., Steffan, A. M., Remy, J. S., 1998, Pharm. Res., 15,1332–1339.

Erbacher, P., Bousser, M.T., Raimond, J., Monsigny, M., Midoux P., Roche. A.C., 1996, Hum. Gene Ther. 7, 721- 729.

Erbacher, P., Roche, A.C., Monsigny, M., Midoux, P., 1997, Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 1324, 27-36.

Erbacher, P., Remy, J.S., Behr, J.P., 1999, Gene Ther., 6, 138-145.

Erdik, E., 1993, Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Gazi Büro Kitabevi: Ankara.

Farhood, H., Serbina, N., Huang, L., 1995, Biochim.Biophys.Acta, 1235, 289–295.

Felgner, P.L., Rhodes,G., 1991, Nature, 349, 351.

Feng, L., Ng, Y.K., 1990, Macromolecules, 23, 1048.

Ferrari, S., Pettenazzo, A., Garbati, N., Zacchello, F., Behr, J. P., Scarpa, M., 1999, Biochim. Biophys. Acta 1447, 219–225.

Ferrari, S., Moro, E., Pettenazzo, A., Behr, J. P., Zacchello, F., Scarpa, M., 1997, Gene Ther. 4,1100–1106.

Fitch, R.M., 1982, Eds: Benoit, H., Remp, P., In:Macromolecules, Pergamon Press.

Fitch, R.M., Tsai, C.H., 1971, Polym. Colloid I, R.M. Fitch, editor, Plenum Pres, Chapter 5, New York.

Filion M. C., Phillips, N.C., 1998, Int. J. Pharm., 162,159–170.

Fischer, D., Bieber, T., Li, Y., Elsasser, H.P., Kissel, T., 1999, Pharm. Res. 16, 1273–1279.

Fischer, D., Zange, R., Kissel, T., 1997, Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24 , 527-528.

Fischer, D., Bieber, T., Elasser, H.P., Kissel, T., 1998, Eur. J. Cell. Biol., 75, 108-116.

Friedmann, T., 1992, Nature Gene Therapy, 2, 93.

Fritz, H., Maier, M., Bayer, E., 1997, J. of Colloid and Interface Sci., 195, 272-288.

Full, A.P., Puig, J.E., Gron, L.U., Kaler, E.W., Minter, J.R., Mourey, T.H., Texter, J., 1992, Macromolecules, 25, 5157.

Furusawa, K., Nagashima, K., Anzai, C., 1994, Colloid and Polymer Science, 272, 1104.

Gan, L.M., Chew, C.H., Friberg, S.E., 1983, J. Macromol. Chem., Chem. A19, 739.

Gan, L., Chew, C.H., Lye, I., Imae, T., 1991, polym. Bull., 25, 193.

Gan , L., Chew, C.H., Lye, I., 1992, Macromol. Chem., 193, 1249.

Gan , L., Chew, C.H., Lee, K.C., Ng, S.C., 1993, Polymer, 34, 3064.

Gan, L., Chew, C.H., Lee, K.C., Ng, S.C., 1996, Langmuir, 12, 319.

Ganachaud, F., Sauzedde, F., Elaissari, A., Pichot, C., 1997, J. Appl. Polym. Sci., 65, 2315-2330.

Ganachaud, F., Monterio, M.J., Gilbert, R.G., Dourges, M.A., Thang S.H., Rizzardo, E., 2000, Macromol., 33, 6738-6745.

Garnett, M., 1999, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys., 16, 147-207.

Gao, L., Wagner, E., Cotten, M., 1995, Human Gene therapy, 4, 714.

Gao, X. A., Huang, L., 1991, Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 280–285.

Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G., 1999, J. Controlled Release, 60, 149-160.

Godbey, W.T., Wu, K.K., Hirasaki, G.J., Mikos, A.G., 1999, Gene Therapy, 6, 1380-1388.

Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos A.G., 2001, Biomaterials. 22, 471-480.

Godbey, W.T., Wu, K.K., Mikos, A.G., 1999, J. Biomed. Mater. Res. 45, 268-275.

Goula, D., Remy J. S., Erbacher, P., 1998, Gene Ther., 5, 712–717.

Goodwin, J.W., Ottewill R.H., Pelton, R., Vionello, G., Yates, D.E.,1978, Brit. Polym. J., 10, 173.

Goodwin, J.W., Ottewill R.H., Pelton, R., 1979, Colloid Poylm. Sci., 257, 61.

Goodwin, J.W., Hear, J., Ho, C.C., Ottewil R.H., 1973, Brit. Polym. J.,5, 347.

Gribanov, N.M., Bibik, E.E., Buzunov, O.V., Naumov, V.N., 1990, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 85, 7.

Guo, J.S., El-Aasser, M.S., Vanderhoff, J.W., 1989, J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 27, 691.

Güven, G., Tuncel, A., Piskin, E., 2004, Colloid Polym. Sci., 282, 708-715.

Haensler, J., Szoka, F.C.Jr., 1993, Bioconj. Chem., 4, 372-379i

Ham, G.E., editor, 1964, Copolymerization, Interscience: New York.

Han, S., Mahato, R.I., Sung, Y.K, Kim, S.W., 2000, Molecular Therapy, 2, 302.

Hansen, F.K., Ugelstad, J., 1979, J. Poylm. Sci, Polym. Chem. Ed., 17, 3069.

Harris, J.D., Lemoine, N.R., 1996, Trends Gen, 12, 400-4005.

Harris, J.M.,1992, Poly(ethylene glycol) Chemistry, Plenum Press, New York.

Hennink, W. E., Cherng, J. Y., Jiskoot, W., Talsma H., Crommelin, D. J. A., 2001, STP Pharma Sci., 11, 11–19.

Hinrichs, W.L.J., Schurmans-Nieuwenbroek, N. M. E., van de Wetering, P., Hennink, W. E., 1999, J. Control. Rel.. 60: 249–259.

Holtzscherer, C., Candau, F., 1988, J. Colloid Interface Sci., 125,87.

Holderoff, S., Guillet, J.E., 1990, J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 28, 1823.

Horbinski C., Stachowiak M.K., Higgins D., Finnegan S.G., 2001, BMC Neuroscience 2, 2-16.

Huang, Z.B., Tang, F.Q., 2004, Journal of Magnetism & Magnetic Materials., 280, 412-418.

Husler, P.L., Klump, H.H., Biochem. And Biophysics, 1995, 317,46-56.

Kaler, E.W., Herrington, K.L., Murthy, A.K., Zasadzinski, J.A.N., 1992, J. Phys. Chem, 96, 6698.

Kandori, K., Fukuoka, M., Ishikawa, T., 1991, Journal of Materials Scienc, 26, 3313.

Kandori, K., Kawashima,Y., Ishikawa, T.,1992, Journal of Colloid and Interface Science,125, 284.

Kataoka, K., et al, 2000, Macromolecules, 29, 8556-8557.

Kim J.S., Maruyama A., Akaike T., Kim S.W., 1997, Journal of Controlled Release, 47, 51-59.

Kim, D. K., Zhang,Y., Kehr, J., Klason, T., Bjelke, B., Muhammed, M., 2001, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 225, 256.

Kim, D. K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K.V., Muahmmed, M., 2001, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 225, 30-36.

Kim, D.K., Mikhaylova, M., Zhang, Y., and Muhammed, M., 2003, Chem. Mater, 15, 1617-1627.

Kim, Y.H., Gihm, S.H., Park, C.R., 2001, Bioconjugate Chem., 12, 932-938.

Kim, J.J., Weiner, D.B., 2000, In: Smyth Templeton, N., Lasic, D.D. (Eds), Gene Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies. Marcel Dekker, New York, pp. 549,568.

Kircheis, R., 1999, J. Gene Med. 1**,** 111–120.

Kircheis, R., et al, 1997, Gene Ther., 4, 409.

Koçum,C., Zareie, H., Özer, F., Pişkin, E., 2000, Colloid And Polym. Sci., 278, 587.

Kondo, A., ve ark., 1999, Colloids Surfaces A, 153, 435-438.

Kukowska-Latallo, J.F., Bielinska, A.U., Johnson, J., Spindler, R., Tomalia, D.A., Baker, J.B., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 4897-4902.

Kurisawa, M., 2000, J. Control. Rel., 69, 127-137.

Kwon, I.C., et al. 1991, Nature, 354: 291.

Kyriakides, T.R., Cheung, C:Y., Murthy,N., Bornstein, P., Stayton, P.S., Hoffman, A.S., 2000, J. Control. Release, 78, 295-303.

Kyriakides, T.R., Cheung, C.Y., Murthy, N., Bornstein, P., Stayton, P.S., Hoffman, A.S., 2002, J. of Controlled Release, 78, 295-303.

Lappainen, K., Urtti, E., Soderling, E., Jaaskelainen, I, Syrjanen, K, Syrjanen, S., 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1196, 201-208.

Latchman, D.S., 1994, From Genetics to Gene Therapy.

Lee, J., Isobe, T., Senna, M.,1996, Journal of Colloid and Interface Science, 177, 490.

Lee, J., Senna, M.,1995, Colloid and Polymer Science, 273, 76.

Lee, J.H., Jung, S.W., Kim, I., Jeong, Y., Kim, Y., Kim, S., 2003, International Journal of Pharmaceutics, 251,23-32.

Lee, K.M., Sorensen, C.M., Klabunde, K.J., Hadjipanayis, G.C.,1992, IEEE Transactions on Magnetics 28, 3180.

Lee, R.J. ve Huang, L., 1997, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 14,173-206.

Lehninger, A.L., Nelson, D.L., M.M. Cox, 2000, Lehringer Principles of Biochemistry, 3rd, Worth Pub, New York.

Lemarchard, P., et al, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 6482-6486.

Leobandung, W., Ichikawa, H., Fukumori, Y., Peppas, N.A., 2002, Journal of Applied Polymer Science, 87, 1678–1684.

Li, J., Dai, D., Zhao, B., Lin, Y., Liu, C., 2002, Journal of Nanoparticles Research, 4, 261-264.

Li, S., Tan,Y.D., Viroonchatapan, E., Pitt, B.R., Huang, L., 2000b Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol. 278, L504–L511.

Lim, Y.B., Choi, Y.H., Park, J.S., 1999, J. Am. Chem. Soc., 121, 5633-5639.

Lim, D. W., Yeom, Y. I., Park, T. G., 2000, Bioconj. Chem. 11, 688–695.

Liu, G., Molas, M., Grossman, G.A., Pasumarthy, M., Perales, J.C., Cooper, M.j., Hanson, R.W., 2001, J. Biol. Chem., 276, 34379-34387.

Liu, Z,L., Liu, Y.J., Yao, K.L., Ding, Z.H., Tao, J., Wang, X., 2002, Journal of Materials Synthesis Processing, 10, 83-87.

Liu, Z., Xiao, H., 2000, Polymer, 41, 7023- 7031.

Luo, D., Saltzman, W.M., 2000, Nat. Biotechnol., 18, 33-37.

Luo, D., Woodrow-Mumford, K., Belcheva, N., Saltzman, W.M., 1999, Pharm. Res., 16, 1300-1308.

McGrath, M., Witte, O., Bincus, T., Wiesmann, I.L., 1978, J. Virol., 25, 923 .

McKusick, V.A., 1994, Mendelian Inheritance in Man: A Catalogue of Human Genes and Genetic Disorders, 11th ed..

McLachalan, G., Davidson, H., Davidson, D., Dickinson, P., Dorin, J., Porteous, D., 1994, Biochemistry, 11, 19–21.

Mahato, R.I., Rolland, A., Tomlinson, E., 1997, Pharm. Res., 14, 853.

Mahato, R. I., Takemura, S., Akamatsu, K., Nishikawa, M. Takakura, Y., Hashida, M., 1997, Drug Targetting, 1, 149–157.

Marutani, E., ve ark., 2004, Polymer- London, 45, 2231-2236.

Maruyama, A., Ishihara, T., Kim, J. S., Kim, S. W., Akaike, T., 1997, Bioconj. Chem., 8, 735-742.

Mathews, C.K., von Holde, K.E., 1996, Biochemistry, Redwood City, California, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.

McAllister, A.K., Washbourne, P., 2002, Current Opinion in Neurobiology, 12, 566-573

Miller, B.E., Miller., F.R., Heppner, G.H., 1984 J. Cell. Physiol., 3,105-116.

Miller, N., Vile, R., 1995, FASEB J., 9, 190-199.

Min Y. Qu., Quijlang H., Wang F.D., Lyo C.J., Gu C., Ren Gu J., 1999, Journal of Cell Researh, 21, 398-410.

Molas, M., Gomez-Valades, A.G., Vidal-Alabro, A., Miguel-Turu, M., Bermudaz, J., Bartrons, R.,Current Gene Therapy, 2003, 3, 468-485.

Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y., .Fox, B. A., Plautz, G. E., Gao, X., Huang, L ., Shu, S., Gordon. D., Chang, A. E., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 10759–10763.

Nakai, H., Montini, E., Fuess, S., Storm, T.A., Grompe, M., Kay, M.A., 2003, Nat. Genet., 34, 297-302.

Namura, M., Harada, M., Eguchi, W., Nagata, S., 1975, Polym. Preprint Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem. Ed., 16, 217.

Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang,Y., Hofschneider, P.H., 1982, Embo J., 1, 841.

Nguyen, H.K., Lemieux, P., Vinogradov, S.V., Gebhart, C.L., Guerin, N., Paradis, G., Bronich, T.K., 2000, Gene Therapy, 7, 126-138.

Odian, G., 1981, Principles of Polymerization, 3rd Ed., Wiley Interscience Publ., New York.

Ogris, M., Steinlein, P., Kursa, M., Mechtler, K., Kircheis, R., Wagner, E., 1998, Gene Ther., 5, 1425-1433.

Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., Wagner, E., 1999, Gene Ther., 6, 595–605.

Ogris M., Cerlisle R.C., Bettinger T., Seymour L.W., 2001, J. Biol. Chem. 276, 47550-47555.

Okubo, M., Iwasaki, Y., Yamamato, Y., 1992, Colloid. & Polym.Sci., 270, 733.

Okubo, M., Takahashi, M., 1994, Colloid. & Polym.Sci., 272, 422.

Olbrich C., Balowsky W., Lehr C.M., Muller R.H., Knewir C., 2001, J. of Controlled Release, 77, 345-355.

Ottewill, R.H., Shaw, N.J., 1976, Colloid Polym. Sci., 218, 34.

Oupicky, D., Konak, C., Ulbrich, K., Wolfert, M. A., Seymour, L. W., 2000, J of Controlled Release, 65, 149-171.

Oupicky, D., Konak, C., Dash, P. R., Seymour, L. W., Ulbrich, K., 1999, Bioconjugate Chemistry, 10, 764.

Ozaki, M., 2000, in Fine Particles: Synthesis, Characterization, and Mechanisms of Growth, Vol. 92 (Ed.: T. Sugimoto), Marcel Dekker, Inc., New York.

Özer, F., 2000, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 109s.

Özer, F., Beşkardeş, M.O., Zareie, H., Pişkin, E., 2001, Journal of Applied Polymer Science, 82, 237-242.

Özer, F., Beşkardeş, O., Pişkin, E., 2000, J.Appl.Polym Sci., 78, 569.

Pagano, J., McCutchan, J.H., Vaheri, A., 1967, J. Virol. 1, 891.

Palani, R. W.R, Sasthaw,M., Cheung, H.M.,1993, J. Appl. Polym. Sci., 47, 499.

Paleos, C.M., Stassinopoulou, C.I., Mallaris, A., 1983, J. Phys. Chem., 87, 251.

Pang, S.W., Park, H.Y., Jang, Y., Kim, W.S., Kim, J.H., Colloids and Surfaces B, 2002, 26, 213.

Pardoe, H., Chua-anusorn, W., St. Pierre, T.G., Dobson, J., 2001, J. of Magnetism and Magnetic Materials, 122, 383.

Park, J.M., Munoberac, B.B., Dubin, P.L., 1992, Macromolecules, 25, 290.

Park, J. S., Lim, Y.B., Kwon, Y.M., Jeong, B., Choi, Y. H., Kim, S. W., 1999, Polym. Chem., 37, 2305–2309.

Perez-Luna, V.H., Puig, J.E., Castano, V.N., Rodriquez, B.E., Murthy, A.K., Kaler, E.W., 1990, Langmuir, 6, 1040.

Pichon, C, LeCam, E., Guerin, B., Coulaud, D., Delain, E., Midoux, P., 2002, Bioconjugate Chem., 13, 76-82.

Pichon, C., RouFai, M.B., Monsigny, M., Midoux, P., 2000, Nucleic Acids Res., 28, 504-512.

Pichot, C., Delair, T., Elaissari, A., 1997, In: Asua J.M. (ed), Polymeric Dispersions: principles and applications. Kluwer Boston, 515.

Pollard, H., Remy, J.S., Loussouarn, G., Demolombe, S.S., Behr, J.P, 1997, J. Biol.Chem., 273, 7507.

Popplewell, J., Sakhnini, L., 1995, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 149, 72.

Pouton, C. W., Lucas, P., Thomas, B. J., Uduehi, A. N., Milroy, D. A., Moss, S. H., 1998, J. Control Rel. 53, 289–299.

Prabha, S., Labhasetwar, V., 2004, Molecular Pharm., 1, 211-219.

Puig, J.E., Perez-Luna, V.H., Perez-Gonzales, M., Macias, E.R., Rodriquez, B.E., Kaler, E.W., 1993, Colloid Polym. Sci., 271, 114.

Romieu, A., Gasparutto, D., Molko, D., Ravanat, J.L., Cadet, J., 1999, Eur. J. Org. Chem., 49-56.

Ramirez, P.L., Landfester, K., 2003, Macromol Chem. Phys. 204, 22-31.

Rodriguez-Guaddarama, L.A., Mendizabal, E., Puig, J.E., Kaler, E.W., 1993, J. Appl. Polym. Sci., 8, 77.

Roe, T., et al, 1993, EMBO J., 12, 2099-2108.

Roemer, K., Friedmann, T.,1992, Eur. J. Biochem., 208, 211.

Rosenweig, R.E., 1985, Ferrohydrodynamics, Cambridge University Press, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melburne, Sydney.

Stapleton, M., Liao, G.C., Brokstein, P., Hong, L., Carninci, P., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Champe, M., Pacleb, J., Wan, K. *ve ark.,* 2002, *Genome Res.*, 12, 1294–1300

Sang, Z., Poehlein, G.W., 1989, J. Of Colloid Polym. Sci., 128, 501.

Sang, Z., Poehlein, G.W., 1989, J. Polym. Sci. Polym. Chem. Edu., 28, 2359.

Sauddze, F., Ganachaud, F., Elaissari, A., Pichot, C., 1997, J. Appl. Polym. Sci., 65, 2331-2342.

Sauzedde, F., Elaissari, A., Pichot, C., 1999, Colloid Polym. Sci, 277, 846-855.

Sayar, F., 2004, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Scahffer, D.V., Fidelman, N.A., Dan, N., Lauffenburger, D.A., 2000, Biotechnol. Bioeng., 67, 598-606.

Scheleef, M (ed), 2001, Plasmids for Therapy and Vaccination, Wiley-VCH, Weinheim.

Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., Bushman, F., 2003, Cell, 110, 521-529.

Shirama, H., Suzawa, T., 1988, J. Colloid & Interface Sci., 126, 269.

Shirama, H., Suzawa, T., 1984, J. Appl. Polym. Sci., 29, 3651.

Shirama, H., Suzawa, T., 1984, Polym. J., 16, 795.

Singh, M., et al, Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 2000, 97, 811-816.

Smigol, V., Svec, F., Hosoya, K., Wang, Q., Frechet, J.M.J., 1992, Angew Macromol. Chem., 191, 151.

Smith, L.C., Duguid, J., Wadhwa, M.S., Logan, M.J., Tung, C.H., Edwards, V., Sparrow, J.T., 1998, Adv. Drug Del. Rev., 30, 115–131.

Sparnacci, K., Tondelli, L., Laus, M., 2000, J. Polym. Sci.:Part A: Polym. Chem., 38, 3347-3354.

Sperling, L.H., 1993, Introduction to Physical Polymer Sci., 2nd Ed., Wiley Interscience Publ., New York.

Stoffer, J.O., Bone, J., 1980, J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 18, 2641.

Suzawa, T., Shirahama, H., Fujimoto, T., 1982, J. Colloid. Interface Sci., 86, 144.

Takai, T., Ohmori, H., 1990, Biochim. Biophys. Acta, 1048, 105-109.

Tamai, H., Fuji, I., Suzawa, T., 1987, J. Colloid. Interface Sci., 118, 176.

Tamai, H., Hasegawa, M., Suzawa, T., 1989, J. Appl. Polym. Sci., 38, 403.

Thomas, W.M., Wang, D.W., 1985, Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, 2nd edition, Vol. 1, 169-211, John Wiley: New York.

Truong-Lee, V.L., Walsh, S.M., Scheweibert, E., Mao, H.Q., Guggino, W. B., August, J.T., Leong, K.W., 1999, Arch. Biochem. Biophys., 361, 47-56.

Tseng, C.M., Lu, Y.Y., El-Aasser, M.S., Vanderhoff, J.W., 1986, J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 24, 2995.

Tuncel, A., 2000, Polymer, 41, 1257.

Tuncel, A., Çiçek, H., Uniform Latex Particles, 1997, Handbook of Engineering Polymeric Materials, Marcel-Dekker, 189, New York.

Tuncel, A, Kahraman, R., Pişkin, E., 1994, J. Appl. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed., 51, 1485.

Tuncel, A., Serpen, E., 2001, Colloid Polym. Sci., 279, 240.

Türk, M., Dinçer, S., Pişkin, E., 2005, Biomacromolecules, baskıda.

Türk, M., Dinçer, S., Pişkin, E., 2004, J. Control. Rel., 96, 325-340.

Ugelstad, J., Mork, P.C., Berge, A., Ellingsen, T., Khan, A.A., 1982, Emulsion Polymerization, Academic Pres, Chapter 11, New York.

Ugelstad, J., Mork, P.C., Kaggerud, K.H., Ellingsen, T., Berge, A., 1980, Adv. Colloid and Interface Sci., 13, 101.

Ugelstad, J., Kaggerud, K.H., Hansen, F.K., Berge, A., 1979, Macromol. Chem., 180, 737.

Ugelstadt, J., Olsvik, O., Schmid, R., Berge, A., Funderud, S., Nustad, K., Ngo, T., 1993, Immunoaffinity Separation of Cells Using Nanosized Magnetic Beads, Plenum Pres, New York.

Ugelstadt, J., ve ark., Prog. Polym. Sci., 1992, Immunol. Immunopathol., 14, 395.

Usui, S., Hara, Y., Hosaki, S., Okazaki, M., 2002, J. Lipid Res., 43, 805 - 814.

Veyret, R., Delair, T., Elaissari, A., 2005, J. Magn. Magn. Mater., 293, 171.

Vijanayathan, V., et al, 2002, Biochemistry, 41, 14085-14094.

Wagner, E., Zenke, M., Cotten, M., Beug, H., Birnstiel, M.L., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 3410-3414.

Wang, J., Peng, Z.M., Huang, Y.J., Chen , Q.W., 2004, J. Cryst. Growth 263, 616-619.

Weiss, R., Teich, N., Varmus, H., Coffin, J., 1982, Febs Lett., 332, 179.

Wheele, J.J., et al, 1999, Gene Ther., 6 271-281.

Wigman, L., Patzelt, E., Wagner, E., Kircheis, R., 1997, J. Drug Target, 7, 293-303.

Wightman, L., Kircheis, R., Rössler, V., Carotta, S., Ruzicka, R., Kursa, M., Wagner, E., 2001, J. Gene Med., 3, 362-372.

Winnik, F. M. 1990, Macromolecules, 23, 233.

Wolf, D., et al, 1999, Biophysical Chem., 81, 207-211.

Wood, D., et al, 2005, J. Inorganic Biochem., 99, 566-574.

Xu, Z., Yi, C.F., Cheng, S., Zhang, J., 1997, J. Appl. Polym. Sci., 66, 1-9.

Xu, Y., Hui, S.W., Frederik, P, Szoka, F.C., 1999, Biophys. J., 77, 341-353.

Yamamoto, T., ve ark., 2002, Phys. Rev. A, 66, 023808-1 - 023808-9.

Yu L., Nielsen M., Han S., Kim S.W., 2001, J. of Controlled Release , 72, 179-189.

Zaitsev, V.S., Filimonov, D.S., Presnyakov I.A., Gambino, R. J., Chu, B.,1999, J. of Colloid and Interface Science, 212, 49.

Zanta, M.A., Belguise-Valladier, P., Berh, J.P., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 91-96.

Zhang, Z., Wan, M., 2003, Synthetic Metals, 132, 205-212.

Zhang, X.Q., Wang, X.L., Huang, S.W., Zhuo, R.X., Liu, Z.L., Mao, H.Q., Leong, K.W., 2005, Biomacromolecules, 6, 341-350.

Zhang, X.Q., Oh, M., Kumacheva, E., Biomacromolecules, 2004, 5, 2461-2468.

Zhu, J., Tang, A., Law, L.P., Feng, M., Ho, K.M., Lee, D.K.L., HArris, F.W., Li, P., 2005, Bioconjugate Chem., 16, 139-146.

Zhu, Y., Wu, Q., 1999, J. Of Magnetism and Magnetic Materials, 194, 1-7.

Zobel, H.P., Kreuter, J., Werner, D., Noe, C.R., Kümel, G., Zimmer, A., 1997, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 7, 483-493.

Zobel, H.P., et al, 2000, Eur. J. Pharm. Biopharm., 47, 203-213.

Zobel, H.P., et al, 2000, Eur. J. Pharm. Biopharm., 48, 1-12.

Zobel, H.P., et al, 2000, J. Microencapsulation, 16, 501-509.

Zuber, G., et al, 2001, Adv. Drug Deliv. Rev., 52, 245-253.

Zuidam, N.J., Posthuma, G., de Vries, E.T., Crommelin, D.J., Hennink, W.E., Storm, G., 2000, J. Drug Target, 8, 51-66.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Güldem Güven

Doğum Yeri : Denizli

Doğum Yılı : 1966

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM VE AKADEMİK DURUMU

Lise	: 1980-1983, Ankara Cumhuriyet Lisesi, ANKARA.
Lisans	: 1983-1989, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, ANKARA.
Yüksek Lisans	: 1990-1992, Lehigh University, Materials Science and Engineering Dept., Pennsylvannia, A.B.D.
Yüksek Lisans	: 1994-1997, Lehigh University, Polymer Science and Engineering Dept., Pennsylvannia, A.B.D.
Doktora	: 1999-2005, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, ANKARA.

İŞ DURUMU

1995-1996	: Teaching Assistant, Lehigh University, Materials Science and Engineering Dept., Pennsylvannia, A.B.D.

1996-1997 : Research Assistant, Lehigh University, Materials Science and Engineering Dept., Pennsylvannia, A.B.D.

1998-2005 : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, ANKARA .

KAZANDIĞI BURSLAR

1990-1996 T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Yurtdışı Yüksek Lisans-Doktora Bursu.

ARAŞTIRMA KONULARI

Metaller, Seramikler; Polimer Sentezi, Karakterizasyonu ve Kimyasal Modifikasyonu; Biyolojik Moleküllerin Polimerlere Bağlanmaları; Polimer-Biyomolekül Konjugatlarının Biyomühendislik Uygulamaları.

TEZLER

1. Chemical etching technique for porous and fine grain $YBa_2Cu_3O_{7-x}$ superconductors with or without silver addition. (Yüksek Lisans)

2. Shear Band Propagation in Crosslinked Epoxies. (Yüksek Lisans)

3. Eş boyutlu, Katyonik, Fonksiyonel Grup İçeren/İçermeyen, Manyetik Yüklü Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Nükleik Asit Uygulamaları (Doktora)

KİTAP BÖLÜMÜ

ABS Polimerleri, Polimerler II Mühendislik Polimerleri, PAGEV Yayın., 2000.

ULUSLAR ARASI DERGİLERDE YAYINLANMIŞ MAKALALER

1. J. Yun, **G. Güven**, Y. T. Chou, 1993, “Chemical etching for fine-grained $YBa_2Cu_3O_{7-x}$ “, 12 , 1080-1082.

2. **G Güven**, A. Tuncel, E. Pişkin, 2004, “Monosized Cationic Nanoparticles Prepared by Emulsifier-free Emulsion Polymerization”, Colloid and Polymer Science. 282, 708-715.

3. C. Babaç, **G. Güven**, G. David, B. C. Simionescu, E. Pişkin, 2004, “Production of Nanoparticles of Methyl Methacrylate and Butyl Methacrylate copolymers by Microemulsion Polymerization in the Presence of Maleic Acid Terminated Poly(N-acetylethylenimine) Macromonomers as Cosurfactant”, European Polymer Journal, 40, 1947-1952.

4. F. Sayar, **G. Güven**, E. Pişkin, 2006, “Magnetically Loaded Poly(Methyl Methacrylate-co-Acrylic Acid) Nanoparticles”, Colloid and Polymer Science, baskıda.

5. S.Ö. Temiz, A.Ş. Toğay, **G. Güven**, Z.M.O. Rzaev, E. Pişkin, 2006, “Antimicrobial Activity of Poly(VP-co MA) and Poly(ethylene imine) Macrocomplexes, J. Applied Polymer Science, baskıda.