

**YÜZEY BAŞLATICILI ATRP İLE OLUŞTURULAN
ANYON DEĞİŞTİRİCİ MOLEKÜLER ZİNCİR İÇEREN
MONODİSPERS HİDROJEL MİKROKÜRELERİN
HÜCRE ETKİLEŞİM ÖZELLİKLERİ**

**CELL INTERACTION PROPERTIES OF MONODISPERSE
HYDROGEL BEADS CARRYING ANION-EXCHANGER
MOLECULAR BRUSHES GENERATED
BY SURFACE INITIATED ATRP**

NİLÜFER EMİNOĞLU

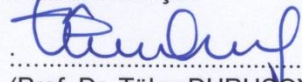
Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
KİMYA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2012

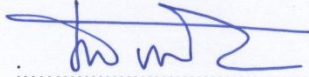
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

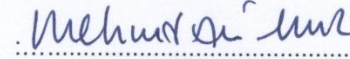
Başkan


(Prof. Dr. Tülay DURUSOY)

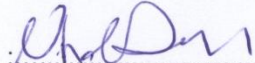
Üye (Danışman)


(Prof. Dr. S. Ali TUNCEL)

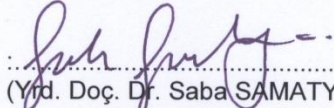
Üye


(Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR)

Üye


(Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN)

Üye


(Yrd. Doç. Dr. Saba SAMATYA)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım Aileme ...

YÜZEY BAŞLATICILI ATRP İLE OLUŞTURULAN ANYON DEĞİŞTİRİCİ MOLEKÜLER ZİNCİR İÇEREN MONODİSPERS HİDROJEL MİKROKÜRELERİN HÜCRE ETKİLEŞİM ÖZELLİKLERİ

Nilüfer EMİNOĞLU

ÖZ

Tezde, çöktürme polimerizasyonu, çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ve atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemleri kullanılarak, sırasıyla 0.96 μm boyutunda monodispers formda poli(gliserol dimetakrilat) [poli(GDMA)], 1.87 μm boyutunda monodispers, gözenekli formda poli(gliserol dimetakrilat-co-gliserol 1,3-digliserolat diakrilat) [poli(GDMA-co-GDGDA)] ve polikasyonik ligand poli(2-dimetilaminoetil metakrilat), [poli(DMAEM)] bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri sentezlenmiştir. Partiküllerin fiziksel karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve BET gözeneklilik ve yüzey alanı ölçüm sistemi (Brunauer-Emmet-Teller) ile yapılmıştır. FTIR, elemental analiz ve potansiyometrik titrasyon ile partiküllerin yapısal özellikleri belirlenmiştir. Yüzey başlatıcılı ATRP yöntemi ile elde edilen poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerin poli(DMAEM) içeriği 25.2 mg/g partikül olarak belirlenmiştir. Sentezlenen partiküllerin in-vivo ve kromatografik uygulamalarda kullanım potansiyellerinin belirlenebilmesi amacıyla öncelikle albümin model protein olarak seçilerek, protein adsorpsiyon desorpsiyon özellikleri belirlenmiştir. Protein adsorpsiyon deneyleri, özellikle nötral pH değerinde türevlendirilmemiş poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerin non-spesifik protein adsorpsiyon davranışı göstermediğini, yüzeye polikasyonik ligand bağlanması ile protein adsorpsiyonunun özellikle izoelektrik nokta değerinde önemli artış gösterdiğini ortaya koymuştur. Deneysel çalışmaların ikinci kısmında partiküllerin hücre ile etkileşimi incelenmiş bu amaçla partiküller, fagositoz yeteneğine sahip nötrofiller, makrofajlar ve HeLa hücreleri ile etkileştirilmiştir. Bütün partiküller nötrofil ve makrofaj hücreleri tarafından fagosit edilmektedir. Nötrofil hücrelerinde poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile daha yüksek fagositoz gözlenmiştir. Bu durum polikasyonik zincirin opsonitik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. HeLa hücreleri ile fagositoz gözlenmemiş, ancak özellikle polikasyonik

zincir içeren partiküllerin hücrelere yapışma yönünde bir eğilim gösterdiği gözlenmiştir. Partiküllerin in-vivo ilaç hedefleme ve kromatografide destek materyali olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Monodispers-gözenekli partikül, hidrojel, BSA adsorpsiyonu, fagositoz, ilaç taşıyıcı sistemler

Danışman: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği ABD

CELL INTERACTION PROPERTIES OF MONODISPERSE HYDROGEL BEADS CARRYING ANION-EXCHANGER MOLECULAR BRUSHES GENERATED BY SURFACE INITIATED ATRP

Nilüfer EMİNOĞLU

ABSTRACT

In this thesis, monodisperse poly(glycerol dimethacrylate) particles 0.96 μm in size, poly(glycerol dimethacrylate-co-1,3-glycerol-1,3-diglycerolate diacrylate), poly(GDMA-co-GDGDA) particles 1.87 μm in size and polycationic ligand, poly(dimethylaminoethylmethacrylate), poly(DMAEM) attached poly(GDMA-co-GDGDA) particles and 1.69 μm in size were synthesized by precipitation polymerization, multistage microsuspension polymerization and surface initiated atom transfer radical polymerization, respectively. The physical characterization of particles were performed by scanning electron microscopy and BET surface area and pore size analysis system. The chemical structure was analysed by FTIR spectroscopy and potentiometric titration. The poly(DMAEM) content of the poly(GDMA-co-GDGDA) particles synthesized by surface initiated atom transfer radical polymerization was determined as 25.2 mg/g. In order to have an idea about the potential use of particles in in-vivo drug targeting and chromatographic applications, the protein adsorption-desorption characteristics of particles were determined using albumin as the model protein. The protein adsorption experiments showed that the plain poly(GDMA) and poly(GDMA-co-GDGDA) particles exhibited no non-specific protein adsorption at the neutral pH while an increased adsorption was observed with the poly(DMAEM) attached particles at the isoelectric point of albumin. In the second part, the particles were interacted with the cells containing neutrophils, macrophages and HeLa cells. All particle types were internally uptaken by the neutrophil and macrophage cells. Higher phagocytosis was observed in neutrophil cells for the poly(DMAEM) attached particles. This result indicated that polycationic chain provided an opsonization effect. No phagocytosis was observed with the HeLa cells for all particle types. However, poly(DMAEM) attached particles exhibited a strong tendency for

adhesion to the HeLa cells. The results indicated that the particles could be potentially used in in-vivo drug targeting and chromatographic applications.

Keywords: Monodisperse-porous particle, hydrogel, BSA adsorption, phagocytosis, drug delivery systems

Advisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL

Hacettepe University, Department of Chemical Engineering

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesinde çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlanmama olanak sağlayan, engin bilgisiyle bana yol gösteren, çalışma özverisi ve motivasyonunu her zaman örnek alacağım değerli hocam, danışmanım **Prof. Dr. S. Ali TUNCEL**'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hücre Kültürü çalışmalarım sırasında gerekli her türlü imkan ve olanaklarını hiç esirgmeden sunan, her zaman ve her konuda deneyimlerinden yararlandığım, iş disiplini her daim gıpta ettiğim, tanımaktan çok büyük mutluluk duyduğum değerli hocam **Prof. Dr. M. Ali ONUR**'a katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman birlikte çalışmaktan mutlu olduğum, karşılaştığım problemlerin çözümünde benden yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen, sabrını, çalışkanlığını ve azmini örnek aldığım hocam **Yrd. Doç. Dr. Saba SAMATYA**'ya teşekkürlerimi sunarım.

Büyük bir özveri ile bilgi ve tecrübelerini paylaşan, laboratuvar çalışmalarımda çok büyük katkısı olan, benimle birlikte tüm sıkıntılara katlanarak sabır gösteren canım arkadaşım **Arş. Gör. Aslıhan GÖKALTUN**'a, tez çalışmalarım süresince birlikte keyifle çalışarak zorlukları aştığım ve motive olmama yardımcı olan canım arkadaşım **Selin SAĞLAM**'a, laboratuvar da yardımlarını esirgemeyen **Arş. Gör. Çiğdem GÖLGELİOĞLU**'na ve **Arş. Gör. Bilginur MARAŞ**'a

Laboratuvar ortamında sağladıkları sıcak atmosferden ve yardımlarından dolayı, **Esra ARMAN**'a, **Begüm ÖZEN**'e **Ayça İSKİFOĞLU**'na, **Özlem ÖZKUL**'a, **Yrd. Doç. Dr. Erdal UĞUZDOĞAN**'a, **Dr. Bekir ÇELEBİ**'ye, **Dr. Oğulcan EVİRGİN**'e ayrıca hücre kültürü çalışmalarında gösterdiği yardım ve özveri için **Arş. Gör. Handan SEVİM**'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak tüm hayatım boyunca her zaman ve her koşulda, güvenlerini ve sevgilerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkürlerimi ve en içten sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Polimerizasyon Yöntemleri	3
2.1.1. Dispersiyon polimerizasyonu	3
2.1.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu	4
2.1.3. Çöktürme polimerizasyonu	7
2.1.4. Yaşayan polimerizasyon teknikleri	8
2.1.4.1. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP)	9
2.1.5. Partiküllerin boy dağılımı	10
2.1.6. Mikropartiküller	11
2.2. Hidrojeller	12
2.2.1. Hidrojellerin tanımı ve özellikleri	12
2.2.2. Hidrojellerin kullanım alanları	12
2.2.2.1. Hidrojellerlerin ilaç taşıyım sistemlerinde kullanımı	13
2.2.3. Hidrojellerin Sınıflandırılması	14
2.3. Polimerik Mikroküre Üzerine Protein Adsorpsiyonu	16
2.3.1. Sığır serum albümin (BSA)	16
2.3.2. Adsorpsiyon parametreleri	17
2.3.3. Protein adsorpsiyonu	17
2.3.4. Proteinler ve ilaç taşıyım sistemleri	18
2.4. Fagositoz	20
2.4.1. Fagositoz mekanizması	20
2.4.2. Fagositik hücreler	22
2.4.2.1. Kan hücreleri	22
2.4.2.2. Akyuvarlar (Lökositler)	23
2.4.2.3. Nötrofiller	24
2.4.2.4. Makrofajlar	25
2.5. Kanser ve HeLa Hücre Hattı	27
	v

2.6. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Mikropartiküller	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	30
3.1. Monodispers Polimerik Partiküllerin Sentezlenmesi.....	30
3.1.1. Çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi ile monodispers gözenekli poli(GDMA-co-GDGA) partiküllerin sentezlenmesi	30
3.1.1.1. Çıkış lateksi üretimi	31
3.1.1.2. Çıkış lateksinin diluent ortamı ile şişirilmesi	33
3.1.1.3. Çıkış lateksinin monomer fazı ile şişirilmesi	34
3.1.1.4. Monomer fazının çıkış partikülleri içerisinde repolimerizasyonu	35
3.1.1.5. Poli (GDMA-co-GDGA) partiküllerinin ekstraksiyonu	35
3.1.2. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi kullanılarak poli(GDMA-co-GDGA) partiküllerinin DMAEM ile türevlendirilmesi.....	36
3.1.2.1. Poli(GDMA-co-GDGA) partikülünün bromlanması.....	37
3.1.2.2. Bromlanmış poli(GDMA-co-GDGA) partikülüne ATRP yöntemi kullanılarak DMAEM kovalent bağ ile bağlanması	37
3.1.3. Çöktürme polimerizasyonu yöntemi ile poli(GDMA) partikülünün sentezi	39
3.1.3.1. Materyal	39
3.1.3.2. Poli(GDMA) partikülünün çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenmesi yöntemi.....	39
3.2. Monodispers Polimerik Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları	40
3.2.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	40
3.2.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz	40
3.2.1.2. BET ölçüm cihazı ile yüzey alanı ve gözeneklilik analizi	40
3.2.2. Yapısal özelliklerinin belirlenmesi	41
3.2.2.1. FTIR spektroskopisi	41
3.2.2.2. Elemental analiz	41
3.2.2.3. Potansiyometrik titrasyon	41
3.3. Monodispers Polimerik Partiküller ile Protein Adsorpsiyonu Çalışmaları	42
3.3.1. Materyal.....	42
3.3.2. Kullanılan tampon çözeltiler	42
3.3.3. Yöntem	44
3.3.4. pH etkisinin incelenmesi	45
3.3.5. Başlangıç protein derişimi etkisinin incelenmesi	46
3.3.6. Partikül derişimi etkisinin incelenmesi	47
3.3.7. Adsorpsiyon hızı etkisinin incelenmesi	49
3.3.8. Desorpsiyon.....	50

3.4. Partiküller ile Hücre Kültürü Çalışmaları	52
3.4.1. Partiküllerin sayımı	52
3.4.2. Partiküllerin makrofaj, nötrofil ve kanser hücreleri ile etkileştirilmesi	53
3.4.2.1. Materyal	53
3.4.2.2. Makrofaj hücreleri ile etkileşim	53
3.4.2.3. Nötrofil hücreleri ile etkileşim.....	54
3.4.2.4. Kanser hücreleri ile etkileşim.....	55
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA	57
4.1. Monodispers Polimerik Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları	57
4.1.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi.....	57
4.1.1.1. Ortalama boy ve yüzey morfolojisinin SEM ile analizi	57
4.1.1.2. BET ölçüm cihazı ile yüzey alanı ve gözeneklilik analizi	60
4.1.2. Yapısal özelliklerinin belirlenmesi	61
4.1.2.1. FTIR spektroskopisi	61
4.1.2.2. Elemental analiz.....	63
4.1.2.3. Potansiyometrik titrasyon	63
4.2. Monodispers Polimerik Partiküller ile Protein Adsorpsiyonu Çalışmaları	64
4.2.1. pH etkisi.....	65
4.2.2. Başlangıç protein derişimi etkisi	66
4.2.3. Partikül derişimi etkisi	66
4.2.4. Adsorpsiyon hızı etkisi	67
4.2.5. Desorpsiyon.....	68
4.3 Partikül Hücre Etkileşim Çalışmaları	69
4.3.1. Makrofaj hücreleri ile etkileşim.....	70
4.3.2. Nötrofil hücreleri ile etkileşim	75
4.3.3. HeLa hücreleri ile etkileşim.....	80
5. SONUÇLAR	85
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIBN	:	2-2'-azobisisobütironitril
BET	:	Brunauer- emmet-teller
BPO	:	Benzoil peroksit
BrIBuBr		Bromoizobütiril bromür
BSA	:	Sığır serum albümin
CH ₃ COONa.3H ₂ O	:	Sodyum asetat trihidrat
CTAB		Setil trimetil amonyum bromür
CuCl	:	Bakır klorür
CuCl ₂	:	Bakır(II)klorür
CV	:	Değişim katsayısı
CycOH	:	Siklohekzanol
DBP	:	Dibütilftalat
DMAEM	:	2-dimetil amino etil metakrilat
DMA-Pry	:	4-dimetil amino piridin
Dp	:	Ortalama partikül boyutu
EDMA		Etilen dimetakrilat
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetik asit
Et-OH	:	Etil alkol
FBS	:	Fetal sığır serumu
FTIR		Forier dönüşümlü infared spektroskopisi
GDGDA	:	Gliserol-1,3-digliserol diakrilat
GDMA	:	Gliserol dimetakrilat
GMA	:	Glisidil metakrilat

HCL	:	Hidroklorik asit
HeLa	:	İnsan servikal karsinoma hücre hattı
HEMA	:	2-hidroksietil metakrilat
HEMA		2-etoksietil metakrilat
HEPES	:	4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit
HMTETA		1,1,4,7,10,10,10-hegzaetiltriethilen tetramin
IAA	:	İzoamil alkol
IM		İntramüsküler
IP		İntraperitoneal
MPS	:	Mononükleer fagositik sistem
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	:	Disodyum tetraborat dekahidrat
NaCl		Sodyum klorür
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	:	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NaHCO_3		Sodyum bikarbonat
NaOH	:	Sodyum hidroksit
PBS	:	Fosfat tampon solüsyonu
PECS	:	Precision etching coating system
PVA	:	Polivinilalkol
PVP K-30	:	Polivinil pirolidon K-30
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SEM	:	Scanning electron microscope
TEA	:	Trietil amin
THF	:	Tetrahidrofur

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Çöktürme polimerizasyonu sisteminin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.2.	Fagositoz mekanizmasının şematik olarak gösterimi.....	20
Şekil 2.3.	Kan: Plazma ve hücreler.....	22
Şekil 2.4.	Kan hücrelerindeki şekilli elemanların sınıflandırılması.....	23
Şekil 2.5.	Lökositlerin sınıflandırılması.....	24
Şekil 2.6.	Nötrofil hücresi.....	25
Şekil 2.7.	Proinflamatuvar sitokinlerin sentez ve salınımını başlatarak işgalci patojenlere fagositoz ile cevap veren bir makrofaj hücresi.....	27
Şekil 3.1.	Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi.....	30
Şekil 3.2.	Gliserol 1,3-digliserolat diakrilat (GDGDA).....	35
Şekil 3.3.	Poli(GDMA-co-GDGDA) polimerik partikülünün kimyasal yapısı.....	36
Şekil 3.4.	(a) GDMA, (b) AIBN.....	39
Şekil 3.5.	Poli(GDMA) polimerik partikülünün kimyasal yapısı.....	40
Şekil 3.6.	Başlangıç BSA derişiminin kalibrasyon grafiğı.....	51
Şekil 4.1.	Poli(GDMA) partikülünün SEM görüntüleri (a) X100 000, (b) X8 000, (c) X50 000, (d) X8 000.....	57
Şekil 4.2.	Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün SEM görüntüleri (a) X60 000, (b) X8 000, (c) X60 000, (d) X4 000.....	58
Şekil 4.3.	Poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün SEM görüntüleri (a) X50 000, (b) X3 000, (c) X30 000, (d) X5 000.....	59
Şekil 4.4.	Polimerik partiküllerin yığın FTIR spektrumları (a) poli(GDMA), (b) poli(GDMA-co-GDGDA), (c) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA).....	62
Şekil 4.5.	Polimerik partiküllerin yüzey FTIR spektrumları (a) poli(GDMA), (b) poli(GDMA-co-GDGDA), (c) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA).....	62
Şekil 4.6.	Poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile (a) etkileştirdikten sonra, (b) etkileştirmeden önce, HCl çözeltisinin potansiyometrik titrasyon eğrileri.....	64

Şekil 4.7.	BSA adsorpsiyonunda pH etkisi.....	65
Şekil 4.8.	Başlangıç BSA derişiminin adsorpsiyon üzerine olan etkisi.....	66
Şekil 4.9.	BSA adsorpsiyonunda partikül derişimi etkisi.....	67
Şekil 4.10.	BSA adsorpsiyonunda zamanın etkisi.....	68
Şekil 4.11.	BSA adsorpsiyonunda desorpsiyon.....	69
Şekil 4.12.	Poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin makrofaj hücreleri ile etkileşimi sonucu sırasıyla 60., 30. ve 60. dakikada fagosite değerleri.....	70
Şekil 4.13.	Makrofaj hücreleri ile etkileştirilen 160 000 partikül/5µL derişimindeki (a) poli(GDMA) partikülünün 60 dakika (b) poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 30 dakika (c) poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 60 dakika inkübasyonu sonucu SEM görüntüleri. Büyütme: (a) X4 000, (b) X800, (c) X3 000.....	72
Şekil 4.14.	Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 10 dakika inkübasyonu sonucu.....	73
Şekil 4.15.	Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 20 dakika inkübasyonu sonucu.....	73
Şekil 4.16.	Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 30 dakika inkübasyonu sonucu.....	74
Şekil 4.17.	Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 60 dakika inkübasyonu sonucu.....	74
Şekil 4.18.	Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 120 dakika inkübasyonu sonucu.....	75
Şekil 4.19.	Poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin nötrofil hücreleri ile etkileşimi sonucu sırasıyla 120., 30. ve 120. dakikada fagosite değerleri.....	76
Şekil 4.20.	Makrofaj hücreleri ile etkileştirilen (a) 160 000 partikül/5µL derişimindeki poli(GDMA) partikülünün 120 dakika (b) 120 000 partikül/5µL derişimindeki poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 30 dakika (c) 160 000 partikül/5µL derişimindeki poli(DMAEM) bağılı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 120 dakika inkübasyonu sonucu SEM görüntüleri. Büyütme: (a) X30 000, (b) X6 000, (c) X6 000.....	77

Şekil 4.21.	Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 10 dakika etkileşimi sonucu.....	78
Şekil 4.22.	Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 20 dakika etkileşimi sonucu.....	78
Şekil 4.23.	Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 30 dakika etkileşimi sonucu.....	79
Şekil 4.24.	Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 60 dakika etkileşimi sonucu.....	79
Şekil 4.25.	Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 120 dakika etkileşimi sonucu.....	80
Şekil 4.26.	HeLa hücrelerinin 6. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (a-b) poli(GDMA), (c-d) poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400.....	81
Şekil 4.27.	HeLa hücrelerinin 24. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (a-b) poli(GDMA), (c-d) poli(GDMA-co-GDGDA) Büyütme: X400.....	82
Şekil 4.28.	HeLa hücrelerinin 48. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (a-b) poli(GDMA), (c-d) poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400.....	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Çok basamaklı polimerizasyon yönteminde kullanılan metaryaller ve polimerizasyon koşulları	31
Çizelge 4.1. Polimerik partiküllerin ortalama partikül boyutu ve değişim katsayısı değerleri	60
Çizelge 4.2. Sentezlenen polimerik partiküllerin BET cihazı kullanılarak belirlenen yüzey alanları	61
Çizelge 4.3. Polimerik partiküllerin yığın ve yüzey FTIR spektrum değerleri (a) poli(GDMA), (b) poli(GDMA-co-GDGDA), (c) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA)	632
Çizelge 4.4. Makrofaj hücreleri ile partiküllerin etkileşim sonucu maksimum fagosite değerleri	71
Çizelge 4.5. Nötrofil hücreleri ile partiküllerin etkileşim sonucu maksimum fagosite değerleri	76

1. GİRİŞ

Son yıllarda biyouyumluluğu yüksek metaryaller için yapılan araştırmalar önem kazanmaya başlamıştır. Biyouyumluluğu yüksek metaryallerden biri olan hidrojeller gelişmiş ilaç taşıyıcı formülasyonlarında devam eden araştırmalarda istikrarlı ve ekonomik bir ilaç taşıyıcı sistem sağlamak amacıyla odak noktası olmuşlardır. Mikrotaşıyıcı olarak kullanılan hidrojeller aracılığıyla ilaç salınımının avantajları, ilaç moleküllerinin doğrudan hücre içinde salınabilmesi ve sağlıklı dokular içerisindeki tümörlere hedeflenebilme kapasitesi olarak sıralanabilir.

Küresel formda polimerik partiküller, çeşitli polimerizasyon teknikleri ile 10 nm-100 µm aralığında eş-boyutlu (monodispers) formda sentezlenebilmektedir. Biyolojik uygulamalar için polimerik partiküllerin kullanılabilmesi partikül yüzeyi ile iyon ve proteinlerce zenginleştirilmiş sulu ortam çevresi arasındaki etkileşimlerin anlaşılmasını gerektirir. Memeli hücre kültürleri için uygun ortam tasarlamaya yardımcı ve fizyolojik sıvılar içerisinde çok önemli proteinlerden biri olan albümin, biyoteknolojik cihaz ve biyosensörleri geliştirmek için altyapı sağlayabilen olağanüstü ligand bağlama özellikleri sunar. Birçok sentetik ve mineral polimerik yüzeyler, BSA'nın immobilizasyonu için test edilmiştir (Bonfá et al., 2011).

Mikropartiküllere bağlı moleküllerin yerdeğiştirmesiyle hücrelere veya dokulara hedeflendirme yapmak mümkündür. Tümör hücrelerine spesifik olarak bağlanan bir antikör kanserli hücreleri bulmakta ve antikanser maddelerin salınımı gerçekleşmektedir. Böylece etkin maddenin büyük oranda lokal olarak salınımı sağlanırken, sistemik konsantrasyonu minimum düzeyde tutulmaktadır. Üstelik, aynı hedeflendirme özelliklerindeki polimer partiküllerden, enjeksiyon için yeterince küçük olanları, dolaşım sistemi içine doğrudan salınım için geliştirilmektedir (Karataş ve Sonakın, 2007).

Vücudun çeşitli bölgelerine yapılan ilaç salınımının verimliliği doğrudan partikül boyutundan etkilenmektedir. İlaç salınım mekanizması olarak kullanılan mikrotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi sonucunda ilacın salınımındaki zamanın kontrolünde ve biyouyumluluğunda gelişmeler sağlanmıştır. Ayrıca hedeflenmiş mikrotaşıyıcılardaki ilaç toksisitesi azaltılmış ve daha etkili ilaç dağılımına

ulaşılmıştır. Tüm bu özellikler yan etkileri minimize ederek doğrudan hastalık nedeninin tedavisine olanak sağlanmıştır.

Fagositoz günümüzde halen mekanizması tam olarak aydınlatılamamış fagositik hücrelerin vücut savunması için geliştirdikleri özel bir yöntemdir. Fagositozun sağlıklı olması, serum opsoninlerin fagosite edilecek partiküllerin yüzeyine bağlanabilmesi ile yakından ilgilidir. Fagositoz miktarının ölçülmesi bazı bağışıklık sistemi bozukluklarının tesbit edilmesinde olduğu kadar fagositik mekanizmanın ve hücrelerin fagositik tercihlerinin belirlenmesinde de önem kazanmaktadır. Çünkü fagositoz günümüzde ilaç salınımı, gen terapisi, aşı ve bağışıklı geliştirme gibi biyoteknoloji yöntemler için de kullanılmaktadırlar. Fagositozda en önemli parametre fagosite edilecek partikülün boyutu ve yüzey özellikleridir. Partikülün boyutu hücre ile etkileştirileceği için hücre boyutunu aşmamalıdır.

Sunulan tez çalışması kapsamında amaç, çöktürme polimerizasyonu, çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ve atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemleri kullanılarak, sırasıyla monodispers formda poli(GDMA), monodispers-gözenekli formda poli(GDMA-co-GDGDGA) ve polikasyonik ligand poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülleri sentezlenmesi ve elde edilen polimerik partiküller ile BSA adsorpsiyon çalışmaları yapılarak, BSA adsorpsiyonunda pH, başlangıç BSA derişimi, zaman ve partikül derişimi etkisinin incelenmesidir. Literatürde daha önce sentezi yapılmamış bu partiküllerin, mikrotasıyıcı sistem olarak ve kromotografik uygulamalara yönelik biyolojik sıvılardan hedef molekülleri ayırmak için kullanım potansiyelinin belirlenmesi amacıyla tez çalışmalarının ikinci bölümünde partiküller ile fagositik özelliğe sahip makrofaj, nötrofil ve kanser hücresi olan HeLa hücreleri etkileştirerek monodispers partiküllerin in-vitro fagositoz özellikleri incelenmesi hedeflenmiştir. Böylece fagositoz yapan hücrelerin çeşitli özellikteki mikrokürelere olan eğilimleri belirlenerek ilaç salınım yöntemlerinde partiküllerin ileriki çalışmalarda kullanılabilmesi için fagositozun ölçülmesine yönelik bir standart oluşturulacaktır. Elde edilen sonuçların, fagositozdan yararlanarak yapılmakta olan biyoteknolojik uygulamalar ve kanser araştırmaları için yol gösterici olması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Eş-boyutlu polimerik partiküller farklı polimerizasyon teknikleri ile sentezlenebilmektedir. Seçilen yönteme göre ortalama partikül boyutu, yüzey ve gözeneklilik özellikleri değişmektedir. Bu amaçla, dispersiyon, çok basamaklı mikrosüspansiyon, çöktürme polimerizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Eş-boyutlu polimerik partiküller genellikle biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamalarda yaygın bir kullanım potansiyeline sahiptirler. Bu bölümde, tez kapsamında çalışılan temel polimerizasyon teknikleri tanımlanmakta, yöntemlerin temel prensipleri ve sonuç partikül özellikleri verilmektedir.

2.1. Polimerizasyon Yöntemleri

2.1.1. Dispersiyon polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu eş-boyutlu partikül sentezi için emülsiyon polimerizasyonundan sonra en yaygın kullanılan yöntemdir. Genelde 1-5 μm aralığında monodispers partikül sentezi için kullanılır. Bir başka deyimle dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilen partiküllerin ortalama boyutu, emülsiyon polimerizasyonuna göre daha büyüktür. Dispersiyon polimerizasyonunda kullanılan monomer, başlatıcı ve stabilizatör dağıtma ortamı içerisinde çözünür formda olmalıdır. Başlangıçta homojen monomer sistemi, organik çözücü, başlatıcı ve stabilizatör (yüksüz polimerlerde genelde) içerir. Polimerizasyon sırasında oluşan polimerler çözücü içinde çözünmediğinden heterojen bir sistem oluşmaktadır (Lu et al., 2010).

Vinil ve akrilat bazlı, hidrofobik özelliği baskın monomerlerin dispersiyon polimerizasyonunda genellikle alkol ve alkol-su karışımları dağıtma ortamı olarak kullanılırlar. Dağıtma ortamının en önemli özelliği monomerin bu ortamda çözünmesi, oluşan polimerik partikülün ise çözünmemesidir. Polimerizasyon için genellikle alkol bazlı dağıtma ortamı içerisinde çözünebilir formda benzoil peroksit (BPO) ve azobisisobutyronitril (AIBN) türü başlatıcılar kullanılır. Stabilizatör olarak ise yine dağıtma ortamında çözünebilir polivinilalkol (PVA) gibi polar polimerik yapılar kullanılır.

Isı etkisi ile başlatıcı-monomer radikalleri dağıtma ortamı içerisinde oluşur ve monomer birimlerinin eklenmesi ile radikal zincir uzunluğu artmaya başlar. Belirli kritik molekül ağırlığına ulaşıldığında, oluşan radikalik oligomer zincirler çözünmez hale gelirler ve dağıtma ortamında çözünmüş formda olan polimerik stabilizatör zincirlerine dolaşarak, dağıtma ortamından küçük partiküller olarak ayrılırlar. Bu olay çekirdeklenme ve oluşan yapıda birincil partiküller olarak adlandırılır. İdeal bir dispersiyon sisteminde çekirdeklenme olayının bir kez ve hızlı olması istenir. Bu sayede ortamdaki bütün birincil partiküller aynı anda ve aynı monomer dönüşümünde oluşur. Dağıtma ortamından monomer difüzyonu ve eşit monomer kütlesi ile beslenirler. Bu durum sonuç ürünün eş-boyutlu olmasını sağlar. Birden fazla çekirdeklenmenin oluşması veya çekirdeklenmenin uzamadığı partiküllerde boy dağılımına neden olurlar.

Dispersiyon polimerizasyonunda dağıtma ortamının polaritesi ortalama partikül boyutu ve sonuç ürünün molekül ağırlığını kontrol eden en önemli faktördür. Vinil ve akrilat bazlı monomerlerin dispersiyon polimerizasyonunda dağıtma ortamı ortamının polaritesinin artması ortalama partikül boyutunun azalmasını ve ürün molekül ağırlığının artmasını sağlar. Stabilizatör derişimin arttırılması ile de ortalama partikül boyutu düşürülebilir. Monomer besleme derişimi partikül boyutunu etkileyen diğer bir faktördür. Monomer derişiminin belirli bir değere kadar artması ortalama partikül boyutunun artmasını sağlar. Ancak monomer derişimi aşırı derecede artması boy dağılımının artışına neden olur (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010).

2.1.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu

Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yöntemi, eş boyutlu, gözenekli polimerik ortalama partikül boyutu 5-20 µm aralığında olan partiküllerin sentezi için en yaygın kullanılan bir yöntemdir. Yöntem ilk olarak Ugelstad ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, El-Aasser ve arkadaşları, Svec ve arkadaşları ve Tuncel ve arkadaşları tarafından yöntemin farklı modifiye formları oluşturulmuştur (Cheng et al., 1992; Wang et al., 1994; Tuncel, 1999a;1999b). Yöntemde ilk olarak elde edilen çıkış lateksi çoğunlukla stiren monomerinin emülsiyon yapıcı madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu veya dispersiyon polimerizasyonu ile

sentezlenmektedir. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu ile sentezlenecek gözenekli partiküllerin eş boyutlu elde edilmesi için çıkış lateksinin eş boyutlu olması gerekir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010).

Yöntemde çıkış lateksi, emülsiyon yapıcı madde içeren sulu ortamda, monomer, çapraz bağlayıcı, gözenek yapıcı organik çözücü içeren veya çözücü karışımı ve bu fazda çözünebilen bir başlatıcıyı içeren organik faz ile şişirilmektedir. Şişirme işlemi uygun çıkış lateksi/organik faz oranı seçilerek, çıkış lateksinin eş boyut özelliği korunarak gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla öncelikle yukarıda belirtilen bileşenleri içeren organik fazın sulu ortamda, çoğunlukla anyonik bazlı bir emülsiyon yapıcı madde kullanılarak ve uzun süreli ultrasonikasyon uygulanarak kararlı emülsiyon hazırlanmaktadır. Partiküllerin organik fazla şişirilmesi işlemi genellikle oda sıcaklığında ve 24 saat süre ile düzenli karıştırma ile gerçekleştirilmektedir. Şişirme işlemi sulu fazda organik faz damlacıklarının tamamı kayboluncaya bir başka deyimle organik fazın tamamı partiküller tarafından absorplanıncaya kadar sürdürülmektedir. Bu işlemde kullanılacak lateksin ortalama molekül ağırlığı partiküllerin organik faz absorpsiyonu açısından büyük önem taşımaktadır. Düşük molekül ağırlıklı latekslerin organik faz absorpsiyon kapasitesi daha yüksektir. Bu basamakta çıkış lateks partiküllerinin organik faz absorpsiyon yeteneğinin artırılması amacıyla bazı düşük molekül ağırlıklı maddeler (Dibütil ftalat, siklohekzanol, dodekanol) aktivatör olarak kullanılmaktadır. Bu organik ajanlar aynı zamanda gözenek yapıcı çözücü fonksiyonuna da sahiptir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010).

Şişirme işlemi bazen iki ayrı basamak halinde de uygulanmaktadır. Bu durumda ilk basamakta çıkış lateksi sulu emülsiyon ortamında yalnızca gözenek yapıcı çözücü veya çözücü karışımı ile şişirilmekte, ikinci basamakta ise monomer, çapraz bağlayıcı ve bu fazda çözünen ve başlatıcı içeren karışım yine sulu emülsiyon ortamında şişirme için kullanılmaktadır. Bu yöntemin uygulanması hem gözenek yapıcı, hem de monomer fazı için ayrı ayrı su fazlı emülsiyonların anyonik emülsiyon yapıcı madde ve ultrasonikasyon kullanılarak hazırlanması gerekmektedir. Ancak şişirme basamaklarının ayrı ayrı uygulanması durumunda genel sonuç ürünün eş boyut özelliği daha iyi olmaktadır. Gözenek yapıcı organik çözücü olarak toluen, dibütil ftalat, siklohekzanol, siklohekzan yaygın olarak

kullanılmaktadır. Şişirme basamağında monomer olarak stiren gibi hidrofobik vinil monomerleri veya akrilat bazlı fonksiyonel gruplu monomerler kullanılabilir. Hidrofobik özellikte partikül sentezi için stiren en yaygın olarak tercih edilen monomerdir. Fonksiyonel gruplu gözenekli partikül sentezi için glisidil metakrilat en yaygın olarak kullanılan monomerdir. Yapısında bulunan epoksi grubu basit reaksiyonlar ile hidroksil, amin ve karboksil formlarına dönüştürülebilmektedir. Ayrıca 2-hidroksietil metakrilat, 2-dimetilaminoetil metakrilat ve metakrilik asit gibi hidrofilik akrilat bazlı yapılar da partiküllere fonksiyonel grup kazandırması amacıyla kullanılabilir. Ancak bu tür polar yapıların monomer fazdaki derişimlerinin yüksek olması halinde sonuç partiküllerde gözeneklilik ortadan kalkmaktadır (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010).

Son basamakta ise ortam sıcaklığı, ısıtıcı başlatıcının etkin bozunma sıcaklığına kadar yükseltmekte, monomer fazı ve gözenek yapıcı çözücü ile şişmiş olan çıkış lateks partiküller içerisinde polimerizasyonun başlaması sağlanmaktadır. Polimerizasyonun başlangıcında öncelikle şişmiş partiküllerde bulunan homojen ortam içerisinde çapraz bağlı küçük (100-1000 nm aralığında boyuta sahip) mikroküreler faz ayrımı ile oluşmaktadır. Polimerizasyonun ilerlemesi ile bu mikroküreler bir araya gelmekte ve aralarındaki boşlukla çözücü karışımı ve içerisinde çözünmüş lineer polimeri içeren viskoz ortam (gözenek yapıcı) tarafından doldurulmaktadır. Oluşan mikrokürelerin aralarında gözenek yapıcı ile dolu boşluklar oluşturacak şekilde bir araya gelmesi üç boyutlu çapraz bağlı ve gözenekli partikül yapısının oluşmasını sağlamaktadır (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010).

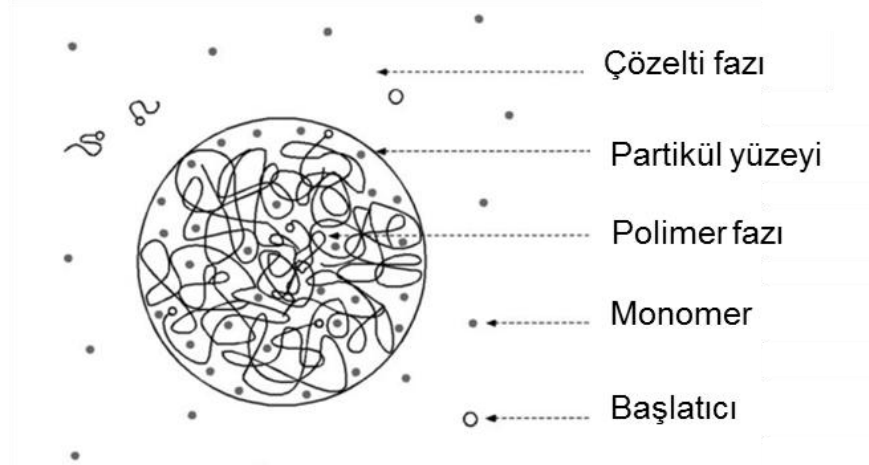
Polimerizasyon basamağında oluşan gözenek dağılımı ve gözeneklilik, gözenek yapıcı çözücü/çıkış lateksi, monomer faz/çıkış lateksi oranları ve çapraz bağlayıcı derişimi tarafından kontrol edilmektedir. Bu oranların değiştirilmesi ile ortalama gözenek boyutu 50-5000 nm, özgül yüzey alanı ise 10-500 m²/g aralığında değişmektedir. Gözenek yapıcı çözücü/çıkış lateksi oranının artışı gözenek yapıcı viskozitesini arttırmakta ve genellikle krater tipi büyük gözenekler içeren partikül formu elde edilmektedir. Monomer/çıkış lateksi oranının artışı ise ortalama partikül boyutunun artışı sağlamaktadır. Yüksek monomer/çıkış lateksi oranları ile

genellikle ortalama partikül boyutu büyük, ortalama gözenek boyutu küçük partiküller elde edilmektedir (Denizli ve Küfrevioğlu, 2010).

2.1.3. Çöktürme polimerizasyonu

Çöktürme polimerizasyonu, organik çözücünde çözünmüş olarak bulunan monomer fazına başlatıcı ilave edilmesiyle başlar. Homojen bir çözelti olarak başlayan polimerizasyon sırasında büyüyen polimer zincirleri sürekli ortamdan ayrılarak çökelir ve iki fazlı sistem olarak polimerizasyon sonlanır. Reaksiyon sonucu ise oluşan polimerlerin izole edilip yıkanma kolaylığının olması avantaj sağlar (Kricheldorf, 2005a, 2005b).

Çöktürme polimerizasyonunda çok saf eş boyutlu (uniform) polimerler elde edilir. Çünkü ortamda, çözücü, emülsiyon ve süspansiyon yapıcı maddeler bulunmaz. Oluşan polimerler kendi monomerinde çözünmeyip polimer oluşmakta iken çökelmektedir. Polimer ucunda bulunan aktif uçların sonlanma reaksiyonu verme olasılığı azalacağından reaksiyon hızı artar. Monomer başlatıcı organik çözücünde çözünerek homojen bir sistem oluşmaktadır. Polimer zincirler oluştukça çökmeye başlarlar. Şekil 2.1'de çöktürme polimerizasyonu sistemi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Çöktürme polimerizasyonu sisteminin şematik gösterimi (Liu et al., 2006)

Literatürde, çoğunlukla iki basamaklı çöktürme polimerizasyonu ile ilgili çalışmalara rastlanmıştır. Şimdiye kadar hidrofobik çapraz bağlayıcı divinil benzen

ve etilengliserol dimetakrilat olmak üzere iki ajan üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Saraçoğlu et. al., 2009). Tez kapsamında kullanılan çöktürme polimerizasyonu yönteminin literatürde benzer bir çalışması yapılmıştır. Çalışmada kullanılan yöntemde hidrofilik poli(GDMA) partiküller tek basamaklı çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Termal başlatıcılı polimerizasyon stabilizör kullanılmadan toluen ve asetonitril içeren dağıtma ortamı kullanılmıştır. Hidrofilik dimetakrilat monomer olan GDMA çift fonksiyonlu metakrilat grupları içerdiğinden dolayı çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Başlangıçta GDMA ve başlatıcı olarak kullanılan AIBN, toluen-asetonitril karışımı içerisine eklenmiştir. Serbest radikaller AIBN'nin ayrışması ile türetilerek birincil çekirdek partiküller oligomerlerin bir araya gelmesi ile üretilmiş olur (Kahraman et. al., 2011).

Poli(GDMA), birçok biyoteknolojik ve medikal uygulamalarda sorbent ve mikrot taşıyıcı olarak düşünülebilir. Çünkü partiküle, hidroksil grupları ve biyokimyasal ligandlar kovalent olarak yüklenebildiğinden dolayı, partikül kolaylıkla içerdiği bileşiğin başka bir türevine dönüştürülebilir. Buna ek olarak poli(GDMA) partiküllerinin suda şişebilmesi ve poli(GDMA)'nın moleküler yapısının biyouyumlu malzeme özelliği taşıyan poli(2-hydroxyethyl metacrylate) [pHEMA] benzerliği çeşitli biyolojik uygulamalar için diğer avantajları arasında yer almaktadır

2.1.4. Yaşayan polimerizasyon teknikleri

Yaşayan polimerizasyon reaksiyonları olarak da bilinen kontrollü radikal polimerizasyonu mekanizmaları, polimer zinciri molekülünün kontrollü büyümesini sağlayan ve istenilen molekül ağırlığı elde etmeye yarayan farklı polimerizasyon mekanizmalarından oluşur. Başka bir deyişle katılma polimerizasyon mekanizmasına sahip olan yaşayan polimerizasyon reaksiyonlarında büyüyen polimer zincirinin sonlanma adımı ortadan kaldırılmıştır. Daha doğrusu, sonlanma ve başlama basamakları dış etmenlerle kontrollü bir şekilde yapılır. Bu sayede polimerin molekül ağırlığı ve polimer zincirlerinin zincir sonu grupları kontrol edilir. Zincir sonuna eklenebilecek farklı fonksiyonellikte gruplar ile polimerin fiziksel özellikleri belirlenebilir. Sonlanma ve zincir transferi reaksiyonlarının olmadığı yaşayan polimerizasyon mekanizmalarında polimer zincirinin büyüme hızı genellikle sabittir ve reaksiyon sonunda elde edilen polimer moleküllerinin zincir

büyüklikleri birbirine çok yakındır; yani monodispers forma yakın molekül ağırlığı dağılımı vardır.

Kontrollü radikal polimerizasyonlarının yaşayan polimerizasyon olmaları için gerekli kurallar, bütün monomerler tükenene kadar polimerizasyon reaksiyonun devam etmesi ve molekül ağırlığının polimer dönüşümü ile doğrusal bir bağıntı içinde olması gerekmektedir.

2.1.4.1. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP)

Atom transfer radikal polimerleşmesi (ATRP) yaşayan kontrollü radikal polimerleşme mekanizmalarındandır. Kullanılan özel metal katalizör bileşikler sayesinde farklı monomerler büyüyen polimer zincirine eklenebilir ve yeni kopolimerler elde edilebilir. Bu yaşayan polimerleşme, sıcaklık gibi reaksiyon parametrelerinin kontrolü ile kolayca durdurulup yeniden başlatılabilir. ATRP'den önce ortaya çıkan kontrollü polimerleşme yöntemlerinde her türlü monomer kullanılamamasına karşı, ATRP mekanizması ile geniş bir monomer seçkisi polimerleşme için kullanılabilir.

ATRP mekanizması, yığın halde, çözeltide, ya da mikroemülsiyon, miniemülsiyon, emülsiyon, süspansiyon, dispersiyon, ve ters miniemülsiyon gibi heterojen ortamlarda polimerleşme için kullanılabilir. Seçilecek olan polimerleşme ortamı, sentezlenecek olan polimerin çözünürlüğü ve ısı transferi gibi faktörler tarafından belirlenir. Örneğin eğer sentezlenecek olan polimer kendi monomerinde çözünmüyorsa o zaman bir çözücü varlığında o polimerleşmeyi gerçekleştirmek gerekmektedir.

Kontrollü ve düzenli büyüyen polimer zinciri ve düşük molekül ağırlığı dağılımı ATRP mekanizması sırasında kullanılan metal bazlı katalizör sayesinde elde edilir. Metal bazlı katalizör, aktif büyüyen polimer zinciri ile durağan polimer bileşiği arasında bir denge kurulmasını sağlar. Böylece yan reaksiyonların oluşmasını ve istenmeyen sonlanmayı engeller; dolayısıyla molekül ağırlığının kontrol edilmesine imkan verir.

ATRP reaksiyonu, monomerde ya da başlatıcıda bulunan, amino, epoksi, hidroksil veya vinil gibi fonksiyonel gruplara karşı dayanıklıdır. Ayrıca ucuz katalizörler,

piridin bazlı ligandlar ve alkil halidler gibi başlatıcılarının yaygın kullanımı sayesinde endüstriyel üretime uygundur.

ATRP mekanizmasında kullanılan monomerler çok çeşitlidir. Örnek olarak, stiren, akrilatlar, metakrilatlar, asetonitril, metakrilamit, 4-vinil piridin, dimetil (1-etoksikarbonil) vinil fosfat, 2-akrilamido-2-metil-N-propan sulfonik asit, metakrilik asit monomerlerini verebiliriz. Bu monomerler kullanılarak doğrusal polimerler elde edilebileceği gibi çeşitli blok kopolimerler elde etmek mümkündür.

ATRP reaksiyonunda önemli bir yere sahip olan ligand seçimi tepkimenin dengede gitmesini sağlaması açısından önemlidir. Kimyasal tepkimlerde ihtiyaç duyulan ligand, bir moleküle bağlanarak kompleks oluşturan bir bileşiktir. Genelde, iyonik bağlar, hidrojen bağları veya van der Waals güçleri ile hedef bir moleküldeki bağlanma yerine bağlanabileceği gibi, bir metale de bağlanabilir. Ligand molekülün bağlanması tersinirdir, yani moleküllerin arasındaki birleşme ve ayrışma arasında bir denge vardır.

Başlama: ATRP polimerleşmesi aktivasyon ve deaktivasyon basamaklarının ardı ardına tekrarlanması ile gerçekleşir ve reaksiyonun başarısı reaksiyonun sürekli olarak “denge”nin deaktivasyon tarafına doğru kaymasına bağlıdır. Bu şekilde durağan polimer zincirlerinin oranı, aktif zincirlere oranla çok daha yüksek olacaktır ve kontrollü büyüme sağlanacaktır.

Büyüme: Aktif hale geçen başlatıcı, ortamdaki monomerlerle reaksiyona girmeye başlar. Bir süre sonra büyümekte olan zincir halojenli bakır kompleksi ile reaksiyona girerek durağan hale geçer. Aktivasyon ve deaktivasyon hız sabitlerinin oranına bağlı olarak bir süre sonra büyüyen zincir yine aktif hale gelir ve büyümeye devam eder. Bu basamaklar tekrarlanarak kontrollü zincir büyümesi sağlanmış olur.

2.1.5. Partiküllerin boy dağılımı

Monodispers polimerik partiküllerin monodispersitesini ölçmek amacıyla sayıca ortalama partikül çapları ve standart sapma değerleri Eşitlik 2.1 ve 2.2’de verilmektedir. Değişim katsayısı değerleri de Eşitlik 2.3’de gösterilen formül ile hesaplanmaktadır. Bu eşitlik,

$$D_n = \frac{\sum N_i \cdot D_i}{D_i} \quad (2.1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum N_i (D_i - D_n)^2}{(\sum N_i - 1)}} \quad (2.2)$$

$$\%CV = \frac{SD}{D_n} \quad (2.3)$$

şeklinde olup burada;

D_n : Sayıca ortalama partikül çapı

D_i : i nolu partikül çapı

N_i : Partikül sayısını

SD: Standart sapmayı

CV: değişim katsayısını ifade etmektedir.

2.1.6. Mikropartiküller

Mikropartiküller, çapları 1µm-1mm arasında değişebilen, gözenekli ya da gözeneksiz, vücutta parçalanabilen veya parçalanmayan, farklı yüzey ve yığın yapılarında hazırlanabilen küresel mikrot taşıyıcılardır (Kohane, 2007). Afinité kromatografisi, immobilizasyon çalışmaları, nükleer görüntüleme ve hücre kültürü çalışmaları olmak üzere birçok biyomedikal uygulamada kullanılmaktadırlar. Polimerik partiküllere biyoaktif ajanlar yüklenerek ilaç taşıma sistemleri geliştirilmektedir. Bu sistemlerde ilaç salınım hızı kontrol edilebilmekte ve hedef bölgeye özgü bir tedavi uygulanabilmektedir. Taşıyıcı mikropartiküller biyobozunur polimerlerden üretilmekte, böylece ilaç salınımı bittiğinde vücuttan uzaklaştırılmaları için herhangi bir müdahaleye gerek kalmamaktadır. Boyutlarının küçük oluşundan dolayı vücut içerisindeki dar bölgelerde kolayca hareket edebilmeleri, yapılacak çalışmaya göre geniş bir boyut aralığına sahip olmaları, yapılarında gözeneklerin bulunması ilaç salınım profilini daha uygun hale getirebilmeleri, büyük yüzey alanı ve biyoaktif molekül yükleme kapasitesine sahip olmaları mikropartiküllere avantaj sağlamaktadır.

2.2. Hidrojeller

2.2.1. Hidrojellerin tanımı ve özellikleri

Hidrojeller, suda çözünmeden önemli miktardaki suyu absorblayabilen üç boyutlu çapraz bağlı, esnek hidrofilik polimerik ağlardır. İlk sentetik polimerik hidrojeller 1950'li yılların başında Wichterle ve Lim (1960) tarafından sentezlenmeye başlanmıştır (Singh et al., 2010). Drahoslav Lim (1953) 2-etoksietil metakrilat (HEMA) ve etilen dimetakrilatın (EDMA) kopolimerizasyonu ile ilk hidrojeli sentezlemiştir ve bu çalışması 1960 yılında *Nature* dergisinde yayınlanmıştır. Otto Wichterle ise ilk hidrojel bazlı yumuşak kontakt lensleri hazırlamıştır (Kopeček and Yang, 2007). Polimer matrisinin içerisindeki su içeriği ağırlığının en az %20'sinden %95'ine kadar ulaşmaktadır. Hidrojellerin, su içeriği %95'in üzerinde ise superabsorbent olarak adlandırılmaktadır ve su tutma derecesi yüksek olmasından, mekaniksel ve düzensel olarak doğal hücrelerarası ortam ile fizikokimyasal benzerliğinden dolayı biyouyumlulukları yüksektir (Deligkaris et al., 2010).

2.2.2. Hidrojellerin kullanım alanları

İlaçların kontrollü salım sistemlerinde (Kashyap et al., 2005), lens ürünlerinde, doku mühendisliğinde ve yenileyici tıpta (Lee and Mooney, 2001), tanı alanında (Van der et al., 2003), biyomolekül ve hücre ayrılmasında (Wang et al., 1993), biyolojik adezyonları düzenlemek için destek metaryali olarak (Bennett et al., 2003), biyosensör ve BiyoMEMS cihazlarında (Colombo, 1993) olmak üzere yaygın kullanım alanlarına sahiptirler (Singh et al., 2010).

Hidrojellerdeki çapraz bağ yapısı sadece kovalent bağ etkileşimi ile değil aynı zamanda iyonik, hidrojen ve van der Waals bağ etkileşimleri ile de sağlanır (Kim and Park, 2004). Çapraz bağlanma, iyonik etkileşim ve hidrojen bağlarından dolayı suda çözünürlüğü zorlaştırır (Peppas et al., 2000). Aynı zamanda hidrojeller için gerekli mekanik kuvvet ve fiziksel bütünlüğü sağlar. Böylece hidrojeller, yaklaşık moleküler ağırlığının 10-20 katı suyu içine çekebilir (Kim et al., 1992) ve dolayısıyla şişkin hale gelir (Amin et al., 2009). Kontakt lensler, sargı bezleri ve superabsorbentler hidrojellerin bazı örneklerindendir (Singh et al., 2010).

2.2.2.1. Hidrojellerin ilaç taşınım sistemlerinde kullanımı

Gelişmiş ilaç taşıyıcı formülasyonlarında devam eden araştırmalarda kararlı ve ekonomik bir ilaç taşıyıcı sistem sağlamak amacıyla hidrojeller odak noktası olmuşturlar. Hidrojeller sadece geleneksel dozaj formlarının sorunlarını değil aynı zamanda yeni ilaç taşınım sistemlerinin de sorunlarını azaltmaktadırlar. Bu doğrultuda hidrojeller ilaç taşınım sistemleri için biyouyumlu, kullanışlı ve kararlı ilaçları kadar küçük aynı zamanda proteinler kadar büyük moleküller olmaları gerekmektedir. İlaç hedeflemesinde ise mikron boyutlu ilaçlar ile birlikte biyouyumlu polimerler kullanılarak ve daha sonra bu yapılara antibadi gibi belirli araçlar bağlanarak başarı elde edilmiştir. Böylece normal hücreler korunurken hastalıklı hücreler ilaca maruz kalmaktadırlar. Bütün bu dozaj formu tasarımları yaklaşımları biyouyumlu ve biyoduyarlı hidrojeller gibi taşıyıcılar gerektirmektedir.

Hidrojeller üç boyutlu kopolimer veya polimer oluşması için yapısında çapraz bağlayıcı monomer içeren hidrofobik polimerik ağlardır. Çapraz bağlayıcılar hidrojelleri iyonik etkileşimler ve hidrojen bağlardan dolayı suda çözünmez hale getirebilirler. Bu yapılar suyu veya kendi ağırlığından 10-20 kez daha fazla miktardaki biyolojik sıvıları içine çekerek şişerler. Çapraz bağlayıcılı hidrojellerin yeterli mekanik dayanımı ve fiziksel bütünlüğü vardır. Eğer şişmiş bu biyometaryallerin yapılarından su ayrılırsa, kuru hidrojel olarak isimlendirilir. Kuru hidrojeller suyun ağırlığının 10-20 kat daha fazlasını absorbe ederek süper absorbent haline gelirler. Susuz hidrojeller ise aerojel olarak isimlendirilir çünkü içerdikleri su yapısal bozulmalara neden olmadan uzaklaştırılmıştır. Mikrojelleser ise ancak 100 nm çapı ile küçük ve suda şişebilen partiküllerdir. Hidrojellerin yapısal ağları makrogözenekli, mikrogözenekli veya gözeneksiz olarak sınıflandırılabilir. Makrogözenekli hidrojeller 0.1-1 µm aralığında büyük gözeneklere sahiptirler. Bu hidrojeller gözeneklerin içine sürüklenmiş ilaçları ilaç difüzyon katsayısına bağımlı bir mekanizma aracılığıyla salarlar. Mikrogözenekli hidrojellerin ise jel ağına küçük gözenek boyutları genellikle 100-1000 Angstrom aralığındadır. İlaç salınımı moleküler difüzyonu ve aktarımı ile gerçekleşir. Gözeneksiz hidrojeller 1-100 angstrom gözenek boyutu aralığındadırlar. İlaç salınımı sadece difüzyon mekanizması ile gerçekleşir (Amin et al., 2009).

2.2.3. Hidrojellerin Sınıflandırılması

Hidrojeller, farklı hazırlama yöntemlerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir;

- Kaynağına göre
 - a. Doğal Polimerik Hidrojeller
 - b. Sentetik Polimerik Hidrojeller (Deligkaris et al., 2010).
- Çapraz bağ kesişim noktalarının türlerine göre
 - a. Kalıcı kesişim noktalı kimyasal çapraz bağlı (kovalent bağ) ağlar
 - b. Polimer zinciri karmaşıklıkları, fiziksel, iyonik hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerinden meydana gelen geçici kesişim noktalı fiziksel ağlar
- Hazırlama metoduna ve ağ yapısının kaynağına göre
 - a. Homopolimerik Hidrojeller:
Tek çeşit hidrofilik monomer ağının çapraz bağlanmasıdır (Peppas, 2004).
 - b. Kopolimerik Hidrojeller:
İki komonomerin çapraz bağlanması ile oluşurlar, şişebilmesi için en az biri hidrofilik olmalıdır (Peppas, 2004)
 - c. İç içe geçmiş ya da çoklu polimerik ağ içeren hidrojeller
Çapraz bağlı iki veya üç polimerik ağın reaksiyona girmesi ile oluşurlar. Sonradan monomerin içinde şişen ilk ağın hazırlanması ile oluşurlar (Lowman and Peppas, 1997; Peppas et al., 1999; Peppas, 2004)
- Elektiriksel yüküne göre
 - a. İyonik Olmayan (Nötral) Hidrojeller
 - b. İyonik Hidrojeller
 - Anyonik (pozitif yüklü)
 - Katyonik (negatif yüklü)
 - Poliamfolitik (hem pozitif hem de negatif yüklü) (Deligkaris et al., 2010).
- Ağ yapısının gözenek çapına göre
Hidrojellerin ağ yapısı makrogözenekli, mikrogözenekli ya da gözeneksiz olabilmektedir;

- a. Gözeneksiz:

Gözeneksiz hidrojeller, makromoleküler boyutta (10-100 Å) iç içe geçmiş ağlar olup monomer zincirlerinin çapraz bağlanmasından dolayı oluşmuştur.
- b. Mikrogözenekli:

Mikrogözenekli hidrojellerin ağ yapısının gözenek büyüklüğü, genellikle 100-1000 Å aralığında olmak üzere daha küçüktür. Moleküler difüzyon ve konveksiyonla ilaç salınımı gerçekleşmektedir. İlaçlar ve polimerler termodinamik olarak uyumlu olduğu zaman, hidrojel duvarından geçerek ilacın ayrılması daha etkilidir.
- c. Makrogözenekli:

Makrogözenekli hidrojellerin çapları 0.1 den 1 µm'e kadar değişmektedir. Bu hidrojeller ilaç difüzyon katsayısına bağlı bir mekanizma aracılığıyla porlara hapsolmuş ilacı salıvermektedirler (Amin et al., 2009).
- Fiziksel yapılarına göre
 - a. Amorf Hidrojeller:

Makromolekül zincirler rasgele düzenlenmiştirler.
 - b. Yarı Kristalin Hidrojeller:

Makromolekül zincirlerinin düzenli yerleştiği yoğun kısımlara sahiptirler.
 - c. Hidrojen Bağ Yapılı Hidrojeller:

Yapılarında hidrojen bağı içerirler (Peppas, 2004; Deligkaris et al., 2010).
- Çapraz bağlanma durumlarına göre
 - a. Fiziksel Hidrojeller:

Kovalent bağ içermeyen yapılardır.
 - b. Kimyasal Hidrojeller:

Kovalent bağ içeren yapılar (Deligkaris et al., 2010).
- İçerdikleri su miktarlarına göre
 - a. Düşük şişme dereceli (20-50 %)
 - b. Orta şişme dereceli (50-90 %)
 - c. Yüksek şişme dereceli (90-99,5 %)
 - d. Süper absorbant (≥99,5 %)

- Organizmadaki durumuna göre
 - a. Biyobozunur hidrojel
 - b. Biyolojik olarak bozunmayan hidrojel

2.3. Polimerik Mikroküre Üzerine Protein Adsorpsiyonu

Bu çalışma BSA (sığır serum albümin) proteinin farklı adsorbent yüzeyler üzerine adsorpsiyon kinetiği ve dengesi üzerine çalışmaları kapsamaktadır. Proteinlerin çoğunun bir yüzey üzerine adsorplanma eğilimi göstermesi sonucu proteinin yapısal değişimi, protein-yüzey arasındaki etkileşime neden olan kuvvetlerin yanı sıra protein-yüzey arasındaki etkileşimin kontrolünün araştırılmasına neden olmaktadır.

BSA serum veya plazmada en fazla bulunan proteinlerden arasındadır ve hücrelerin yapışmasını önlemek için pasifleştirici ajan olarak kullanılır. Proteinlerin çözeltiden katı yüzeylere adsorpsiyonu bilimsel önemi olduğu kadar biyokirilenme, gıda üretimi, biyosensör geliştirilmesi ve biyoyumlu malzemelerin yapımı gibi uygulamalarından dolayı ilgi çekmiştir.

2.3.1. Sığır serum albümin (BSA)

Albümin plazmada en çok bulunan protein olup plazma proteinlerinin %60'ını oluşturmaktadır. Diğer plazma proteinlerine oranla düşük molekül ağırlığına sahiptir. Albüminlerin %40'ı dolaşım sisteminde, geriye kalanı ise deri, kas ve bağırsaklarda bulunur. Plazmadaki derişimleri yaklaşık 50 mg/ml olan albüminlerin en önemli görevlerinden biri ozmotik basınç yaparak kılcal damarlardan kanın geri toplanmasını sağlamaktır. Kandaki ozmotik basıncın %75-80 kadarı albüminler tarafından yapılır. Negatif yük taşıdıklarından Na^+ derişimini çok etkiler ve suyun plazma ile hücre dışı arasındaki hareketini ayarlarlar. Eğer su damarlara geri alınamazsa dokularda ödem meydana gelir. Ozmotik basıncın çözeltideki tanecik sayısına göre değişmesi, moleküllerin bağlanması gibi özellikler gözönünde bulundurulduğunda pH 7.4'de albüminin negatif yükünün yüksek olması, çözeltide bulunan taneciklerin sayısına göre tahmin edilenden daha büyük bir ozmotik etki meydana getirerek yüzeylerinde su kümeleri oluşumuna neden olur.

Albümin ozmotik basınç ayarlanması dışında taşıma görevi yapmaktadır. Albüminlerle taşınan maddeler; yağ asitleri, alkil sülfatlar, steroid hormonlar, Ca^{++} iyonları, tiroksin hormonu, bilirübin ile aspirin, penisillin G ve sülfonamidler gibi bazı ilaçlardır. Bir kan proteini olan albüminin izoelektrik noktası pH 5 olup fizyolojik pH'da önemli derecede negatif yüklüdür.

BSA proteini bir poliamfolittir. Proteinlerin yapısında asidik ve bazik amino asitler vardır. Bundan dolayı da amfoterik özellik göstermektedirler. Bu proteinler proton verecekler veya proton alacaklardır. Asidik ortamlarda proteinler ekstra protona sahip olduklarından net pozitif bir yüke, bazik ortam koşullarında ise net bir negatif yüke sahiptirler. Amino asitlerin net elektrik yüklerinin sıfır olduğu pH derecesine ise izoelektrik nokta adı verilmektedir (Kai, 2008).

2.3.2. Adsorpsiyon parametreleri

Derişim etkisi: Genellikle adsorplanan maddenin derişimi arttıkça adsorplayıcı yüzeyinde tutunan moleküllerin sayısı artmaktadır. Kimyasal adsorpsiyonda, tek tabaka kaplandıktan sonra adsorpsiyon olmayacağından belirli bir derişimin üzerinde adsorplanan madde miktarı sabit kalmaktadır.

pH etkisi: Çoğu polimerlerin yapılarında iyonlaşabilen asidik grupların bulunduğu bilinmektedir. Artan pH ile yapıdaki bu gruplar daha çok iyonlaşmakta ve çözeltiyle olan etkileşimleri artmaktadır.

Tuz etkisi: Polimerlerin yapılarında iyonlaşabilen gruplar, ortamda bulunan tuz iyonları ile etkileşerek adsorpsiyon için gerekli aktif merkezlerin doldurulmasına ve dolayısıyla adsorpsiyonun azalmasına neden olacaktır (Toth, 2003; Tümsek, 2008).

2.3.3. Protein adsorpsiyonu

Polimerik partiküller ile protein arasındaki non-spesifik etkileşimler, iyonik (veya elektrostatik) bağlar, hidrojen bağları, van der Waals ve hidrofobik etkileşimleri olarak sınıflandırılabilir. Non-spesifik adsorpsiyon pH, iyonik kuvvet, protein özellikleri, adsorbent yüzey özellikleri hidrofobik etkileşim ile zayıf olarak değiştirilebilir yüzey proteinlerinin adsorpsiyonu gerçekleşmektedir. Genellikle

stiren gibi monomerler, protein moleküllerini adsorbe eden hidrofobik bir yüzey sunmaktadır. Bu etkileşim ile protein adsorpsiyonu, yanındaki proteinlerin izoelektrik noktasında maksimumdur. Maksimum adsorpsiyondaki pH iyonik kuvvetin  ukselmesi ile asidik bölgeye kaymaktadır. Hidrofobik bir yüzey üzerine protein adsorpsiyonundaki hidrofobik etkileşim, hidrofilik y zeyinkinden daha fazla olmaktadır.

İyonik (elektrostatik) bağlar negatif yüklü partiküller ile yerel pozitif yüklü protein molekülleri arasında oluşmaktadır. Negatif olarak yüklenmiş polimerik partiküllerin yüzeyinde sülfat ve karboksil radikalleri gibi anyonik fonksiyonel gruplar vardır. Sülfat grupları, potasyum persulfat gibi bir başlatıcı ve karboksil grupları, akrilik asit ya da metakrilik asit gibi hidrofilik komonomer kökenlidir. Hidroksil bağları hidroksil-karbonil ya da amid-karbonil radikalleri arasında sık sık ve bir de hidroksil-hidroksil ya da amid hidroksil bağları arasında oluşmaktadır. Karboksil radikalleri düşük ve orta pH'larda hidrojen bağları ile oluşan protein adsorpsiyonunda önemlidirler. Van der waals etkileşimi ise küçük mesafelerde ve sadece su haricinde iki polar olmayan gruplar bir araya geldiğinde etkili olmaktadır (Kai, 2008).

2.3.4. Proteinler ve ilaç taşınım sistemleri

Protein bazlı ilaçlar, tedavi edici ajanlar arasında önemli bir sınıf oluşturmaktadırlar. Bu tür ilaçların geliştirilmesi sonucu ilaçların salınım yöntemlerinin de geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Çoğu proteinler yüksek molek l ağırlığının yanı sıra sınırlı kararlığa sahip oluşu yeni salınım stratejilerinin geliştirilmesini gerektirmiştir. Stratejilerden biri önceden protein ile yüklenmiş hidrojellerden protein salınımıdır. Protein ilaçlarının salınımı genellikle sık uygulanan enjeksiyon yoluyla gerçekleştirilir. Bu durum, kan serum derişimi seviyesinde hızlı bir artış ve ardından hızlı bir azalışa neden olur. Bu nedenle protein salınımında doz miktarını azaltmak için tedavi edilecek bölgede belirli bir zaman içinde kan derişimini muhafaza edebilecek bir sistem tasarımı ile yenilik sağlanabilir (Kim and Yoon, 2002).

Serum alb minlerini kullanarak protein-bazlı mikropartiküllerin taşıyıcı sistem olarak geliştirilmesi ilaç taşınım sistemleri için iyi bir yöntemdir çünkü bu

partiküllerin, doku irritasyonu ve toksik etkileri minimal düzeyde olup yüksek oranda etken madde yükleme kapasitesine sahiptirler. Ayrıca biyoparçalanabilir olup hazırlanmaları kolay olması da avantaj sağlamaktadır. Sığır serum albümin (BSA) proteinleri ile etken maddenin büyük bir kısmı polimer matrisine hapsedilebilir çünkü albümin molekülünde çok farklı ilaç bağlama bölgeleri mevcuttur. BSA'nın ilaç bağlayan temel hücre yüzey proteini olduğu ve ilacın endositik hücresel alımını etkilediği daha önceki çalışmalarda ortaya çıkmıştır (Geselowitz and Neckers,1995; Wartlick et al., 2005).

İn vitro ve in vivo çalışmalarda polimerik partiküllerin üzerine protein adsorpsiyonu biyolojik uygulamalar açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle, son yirmi yıldır bütün görüş açıları ile ilgili olarak çalışmalar yapılmıştır ancak sonuçları karmaşıklığı nedeniyle tutarsızdır. Proteinler çözünen bir yapı olarak hastalığı tedavi etmek için oldukça büyük yapılardır ve miktar olarak ölçümünü zorlaştıran polimer yüzeyleri dallı yapıya sahiptirler. Ayrıca partiküller sürekli hareket ettiklerinden dolayı yerinde zamana bağlı olarak ölçümü imkânsızdır. Proteinin düz ve sabit yüzeyler üzerinde adsorpsiyonunu analiz etmek nispeten daha kolay olması nedeniyle pek çok teknik uygulanmış ve test edilmiştir. Tüm adsorpsiyon mekanizması tam olarak analiz edilememesine rağmen, bilinen polimer partikülleri protein adsorpsiyonu ile ilgili bazı ipuçları verebilir. Polimerik partiküllerin üzerinde protein adsorpsiyonunun biyomedikal uygulamalarına yapay doku ve organlar, ilaç taşıyıcı sistemler, biyosensörler, katı-faz immünoassay, immünomanyetik hücre ayırımları ve immobilize enzimler olarak örnek verilebilir.

Polimerik partiküllerin üzerinde protein adsorpsiyonunda protein yüzeye tutunan (adsorbat), partikül ise yüzeyinde tutan (adsorban) olarak isimlendirilir. Protein adsorpsiyonu uygulamasına bağlı olarak, in vitro ve in vivo olarak yapılabilir. Protein adsorpsiyonu yüzeyin düz ya da sabit olup olmadığına göre sınıflandırılabilir. Birkaç istisnanın dışında implant ve membranların düz ve sabit yüzeyleri vardır. Tedavi edici taşıyıcılarda ise polimerik partiküller ve hareketli yüzeyler vardır (Kim and Yoon, 2002).

2.4. Fagositoz

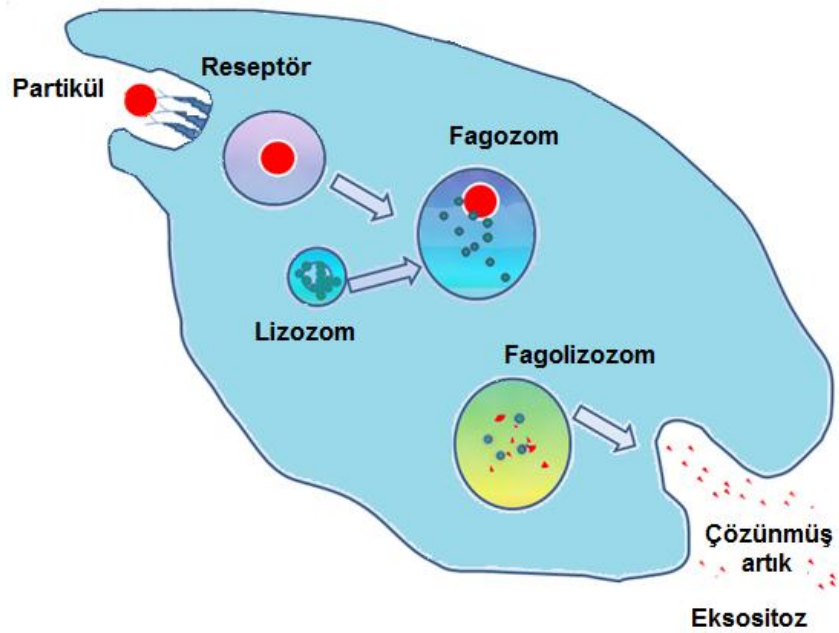
Fagositoz, ilk kez 19. yüzyılın sonlarına doğru Rus bilimci, embriyolog Ilya Metchnikoff tarafından, denizyıldızı larvalarının içinde amip benzeri hücrelerin gözlemlemesi ile popüler olmaya başlamıştır (Stuart and Ezekowitz, 2005).

Fagositoz, vücuda giren yabancı mikroorganizma, partikül, ölü hücre ve dokuların yok edilmesi için bağışıklık sistemi tarafından geliştirilmiş vücudun savunma sistemidir. Kısaca, vücuda giren her türlü yabancı maddeyi vezikül içinde hücreye alarak sindirip yok etme mekanizmasına denir. Memeli organizmaları için temel savunma sistemi olmasına rağmen etki mekanizması günümüzde halen çok iyi bilinmemektedir (Ulusoy and Onur, 2003).

2.4.1. Fagositoz mekanizması

Fagositoz, Şekil 2.2'den de görüldüğü gibi

1. Kemotaksis Evresi (Hedef Bölgeye Ulaşma)
2. Oponizasyon ve Bağlanma Evresi
3. İçine Alma Evresi
4. Öldürme ve Sindirme Evresi olmak üzere dört temel aşamada meydana gelmektedir.



Şekil 2.2. Fagositoz mekanizmasının şematik olarak gösterimi (Colm, 2009)

- 1- **Kemotaksis Evresi:** İlk evresinde hedefin fagositik hücre tarafından tanınması olayı gerçekleşir. Enfeksiyonun erken döneminde fagositik hücrelerin (makrofaj ve nötrofiller) hedef organizma ya da partiküllerin bulunduğu yere doğru yönelmesi olayına kemotaksis denir. Kemotaksis olayı hücre hareketlerinin rastgele olduğu hareketlerden farklıdır. Enfeksiyon sonrasında fagositik hücrelerin bölgeye ulaşması üç aşamada gerçekleşir. Lökositlerin hareket halindeki kandan damar çeperine yapışması ve burada tutunması, tutunduktan sonra birikmesi ve son olarak da iki endotel hücre çeperinin arasındaki boşluktan dokulara geçmesi sonucunda lökositler (makrofaj ve nötrofil) hedef bölgeye ulaşmış olurlar.
- 2- **Opsonizasyon ve Bağlanma Evresi:** Fagositoz olayının gerçekleşmesi için fagosite edilecek partikülün hücre tarafından tutulması gerekir. Tanıma işlemi direk hücrenin hedef üzerindeki yabancı olarak algıladığı bir reseptörü tanıması ile olabileceği gibi opsonizasyon ile de olabilir. Opsonizasyon organizmaya ait proteinlerin, patojen organizmalarla, apoptik hücrelerle ya da hücre enkazlarıyla etkileşmesi ile gerçekleşir. Serum proteinlerinin bazılarının partikülü etkileyerek onu fagozitoza daha yatkın hale getirmelerine opsonizasyon, bu maddelere de opsonin denir.
- 3- **İçine Alma Evresi:** Fagosite olacak cismin hücre yüzeyine bağlanması gerçekleştikten sonra hücre zarı üzerinde oluşan bir sinyal hücre içine aktarılır. Böylece hücre uyarılmış olur ve küçük yalancı ayaklar oluşur, bu ayaklar yabancı cisimi çevreliyerek bir kesecik içine alır. Hücre zarı partikülü bir fagositik kesecik içine alıncaya kadar çevreler. Hücre zarı ile çevrili bu keseciğe fagozom denir. Fagozom lizozom ile birleşerek fagolizozomu şekillendirir. Bu sırada lizozomun içinde bulunan enzimler kesecik içerisine aktarılır. Böylece hücre içine alma işlemi tamamlanmış olur.
- 4- **Öldürme ve Sindirme Evresi:** Fagositoz yapan hücrelerin sitoplazmasında zarla çevrili birçok granül bulunur. Hücre içine çekilen kesecik granüllerle birleşerek fagolizozomu oluştururlar ve granül içeriğinde bulunan enzimler keseciğin içine aktarılır. Degranülasyon olarak adlandırılan bu olay hücrenin metabolik aktivitesini artırır. Glikoz kullanımı, laktik asit üretimi, fosfolipid yıkımı ve yapımı ve dolayısıyla oksijen kullanımı büyük ölçüde artar. Bu değişiklikler sonucu kesecik etrafındaki pH düştüğünde enzimler aktif hale

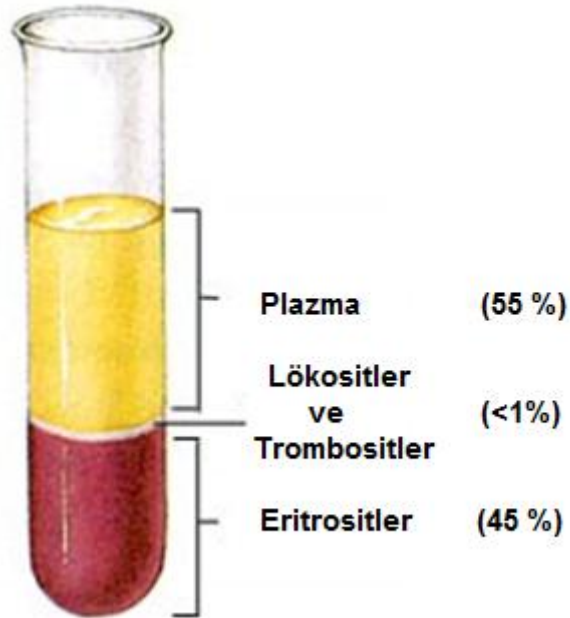
gelerek fagosite olacak cisim bu sayede parçalanır (Stuart and Ezekowitz, 2005).

2.4.2. Fagositik hücreler

Fagositoz sırasıyla; hücreye tutunma, hücre içine alınma, fagozom (fagositik koful) oluşumu ve sindirim kademelerinden oluşur. Bazofiller, lökositler, nötrofiller, makrofajlar ve eozinofiller fagositik özelliğe sahip hücrelerdir.

2.4.2.1. Kan hücreleri

Kan, akıcı plazma ve şekilli elemanlardan (alyuvar, akyuvar ve kan pulcukları) meydana gelmiş kırmızı renkli hayati bir sıvıdır. Şekilli elemanlar; lökositler (akyuvarlar), eritrositler (alyuvarlar) ve trombositler (platelet, kan pulcukları)'den oluşurlar. Şekil 2.3'de görüldüğü gibi tam kan santrifüj edildiğinde, tüpün üst kısmında kalan sarımsı, şeffaf ve kıvamlı olan kısım plazmadır. Altta kalan kısım ise şekilli elemanlardır. Şekilli elemanlar iki kısımdan oluşurlar; en alttaki kırmızı renkli katman eritrositler, hemen üzerindeki ince katman trombositler, onun da üzerindeki lökositlerdir.



Şekil 2.3. Kan: Plazma ve hücreler (Güler, 2011)

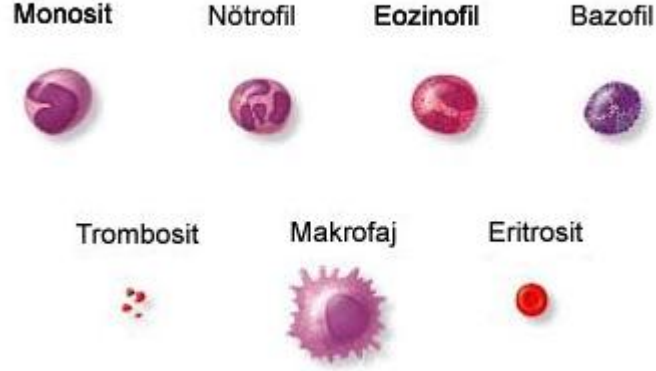
Kanın %55'i plazma ve %45'i şekilli elemanlardan oluşmaktadır (Şekil 2.3). Şekilli elemanlar, eritrositler yani alyuvarlar; lökositler(alyuvar) ve trombositler(plateletler) olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.4).

Alyuvarlar	Akyuvarlar					Plateletler
	Polimorfonükleer granüositler			Agranüositler		
	Nötrofil	Eozinofil	Bazofil	Monosit	Lenfosit	
						

Şekil 2.4. Kan hücrelerindeki şekilli elemanların sınıflandırılması (Onur, 2011)

2.4.2.2. Akyuvarlar (Lökositler)

Kan hücrelerinden olan lökositler fagositoz kabiliyetine sahip hücrelerdendir. Lökositler (Şekil 2.5) yaklaşık 7-22 µm renksiz parlak, sitoplazma ve çekirdekten oluşan hücrelerdir. Normal erişkin bir insanın kanında mikrolitrede yaklaşık 6000-10000 lökosit bulunur. Sitoplazmalarındaki granüllerin tipine ve çekirdeklerinin şekline göre lökositler granüositler (çok çekirdekli lökositler) ve agranüositler (tek çekirdekli lökositler) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Bunlardan granüositler iki ya da daha fazla loblu çekirdek içerirler ve nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar. Granül içermeyen lökositler lenfosit ve monosit olmak üzere iki tiptir (Cassatella, 2003). Lökositlerden nötrofillerin ve monositlerin fagositoz yeteneğine sahip oldukları bilinmektedir. Diğer türlerin ise fagositoz yetenekleri çok düşük veya yok denecek kadar azdır.



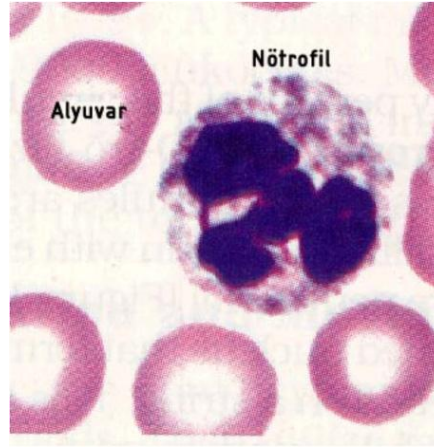
Şekil 2.5. Lökositlerin sınıflandırılması

2.4.2.3. Nötrofiller

Nötrofiller kanda en fazla sayıda bulunan lökosit (akyuvar) tipidir. Tüm lökositlerin %50-70'ini oluştururlar. Çapları yaklaşık 12 μm 'dir. Sitoplazmasında küçük granüller bulunur. Bu granüller hem asidik hem de bazik boyalarla boyanabildiklerinden bu adı almışlardır. Çekirdek genellikle 2-3 loba ayrılmıştır. Bu nedenle bu hücrelere genellikle polimorfonüklear nötrofiller adı verilir. Çekirdekdeki lob sayısı hücrenin yaşıyla doğru orantılıdır. Bu hücrelerin kan dolaşımındaki ortalama ömür uzunluğu 10-12 saattir. Bir enfeksiyon durumunda bir süre 30 dakikaya kadar düşebilir. Vücutta bir enfeksiyon olduğunda, enfeksiyon bölgesine ilk ve en büyük sayıda ulaşan lökositler nötrofillerdir. Bu hücrelerin çok etkin bir fagositoz kapasitesi vardır. Fagositoz sonucunda sitoplazmik granüller parçalanır (degranülasyon) açığa çıkan defensinler (hücre duvarında delikler açılmasına yol açan küçük peptitler) bakterilere, virüslere ve mantarlara karşı etkilidirler (Onur, 2011).

Yabancı maddeleri içine almak için eşsiz bir kapasite ile donatılan nötrofiller (Şekil 2.6), makrofajlar ile birlikte profesyonel fagositleri oluştururlar. Böylelikle patojenler ve hücre artıkları ortadan kalkmış olurlar (Lee et al., 2003). Fagositler hedef tanımak için özel reseptörleri ile donatılmışlardır. Bakterileri parçalama mekanizmasını işleyişi bakterilerin nötrofil yüzeyine tutunması ile başlar. Bu işlem bir adezyon proteini olan fibronektin ile antikor ve komplement opsoninlerinin

bakteri yüzeyine yapışması ile sağlanır. Nötrofillerden çıkan yalancı ayaklar ile yüzeye tutunmuş bakteri hücre içine alınarak fagositik vakuol (fagozomlarda) hapsedilir. Bakteri bu fagozomlar içinde nötrofil granüllerinden salınan enzimler ile parçalanır. Bu enzimlerden olan lizozimler bakteri membranını parçalar. Fagositik aktivite nedeniyle nötrofilin metabolik işlevinde ani bir yükselme gerçekleşir. Bu metabolik reaksiyonlar hidrojen peroksit (H_2O_2), superoksit anyonları (O_2^-), hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) gibi bakteriyi parçalayarak serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar (Koeppen and Stanton, 2008). Nötrofil fagozitozundaki moleküler mekanizmalar hakkındaki bilgilerin çoğu makrofajların fagositoz çalışmalarından elde edilmiştir (Lee et al., 2003).



Şekil 2.6. Nötrofil hücresi (Onur, 2011)

2.4.2.4. Makrofajlar

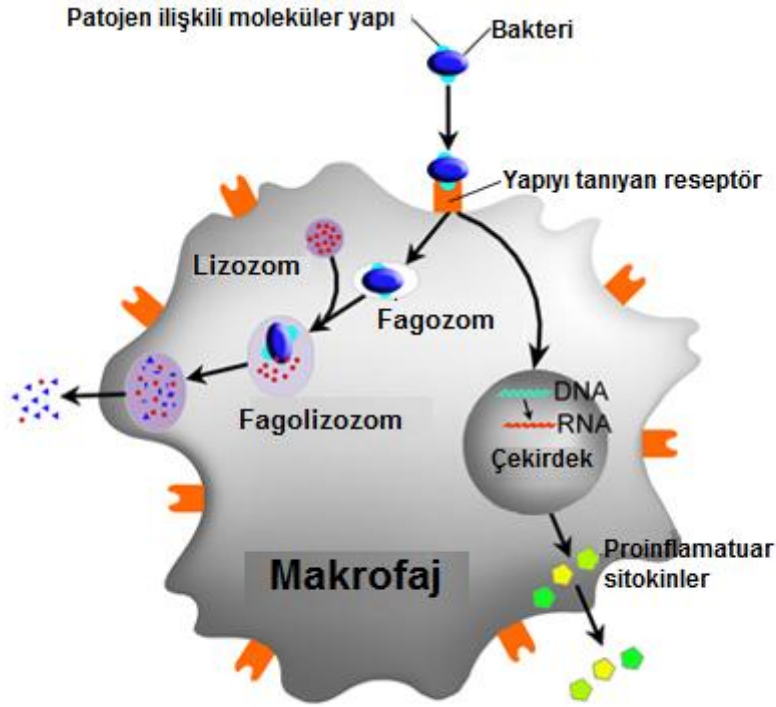
Makrofaj ve dentritik hücre öncülü olan monositler, kan dolaşım sistemi, doku ve organ hücreleri arasında hareket halindeki hücrelerdir. Monosit hücrelerinin lökosit popülasyonu içindeki oranı %2-8 dir. Lökositler içinde en büyük hücre tipi olan monositlerin çapı 10-15 μm 'dir. Monositler periferik kan dolaşımında 1-3 gün kadar kalıp daha sonra periferik dokulara geçerek burada makrofajlara farklılaşırlar (Onur, 2011). Makrofajlar bir uyarıcı ile aktive edilebilir ya da farklı şekiller alabilirler ve bulunduğu organ ya da bağ dokusunu temel alarak isimlendirilirler. Örneğin akciğerde alveoler makrofajları, karaciğerde kupffer hücreleri, sinir sisteminde mikroglia hücreleri, kemikte çok çekirdekli fagositler olan osteoklastlar olarak adlandırılırlar (Abbas and Lichtman, 2003).

Savunma sisteminde makrofajların görevleri;

- Makrofajların çok yüksek fagosite etme özelliği vardır. Bakterileri, hücre kalıntılarını, infekte olmuş hücreleri, makromolekülleri ve ölmüş ya da zedelenmiş dokuları (yaşlı eritrositleri) fagosite ederler.
- Makrofajlar yabancı cisimleri ya da zedelenmiş dokuları fosfolipid ya da şekerler için reseptörleri ile tanırlar.
- Salgıladığı bazı maddeler, enfeksiyon bölgesine nötrofillerin, monositlerin ve fibroblastların gelmesini artırır.
- Makrofajlar salgıladıkları enzimler, reaktif oksijen araürünleri, reaktif nitrojen araürünleri ve lipid kaynaklı mediatör ile mikropların öldürülmesinde ve enfeksiyonun kontrolünde görev yaparlar.
- Ürettikleri sitokinler ile inflamatuvar hücrelerin, özellikle nötrofillerin birikiminden ve inflamasyonun birçok sistematik etkilerinden sorumludurlar. Ayrıca yaralanmış dokuların onarılmasında görev yapan fibroblastlar için büyüme faktörü üretirler.
- Antijen salarak diğer savunma sistemi hücrelerini uyarır ve böylece atijenlerin lenfositler tarafından tanınmasını sağlamaktır. Bu ise bağışıklık sisteminin aktivite göstermesinde önemli bir aşamadır (İmir, 1997).

Makrofaj hücreleri (Şekil 2.7) fagositik aktivite ve bağışıklık sistemi ile yakından ilişkili olması nedeniyle büyük ilgi toplamışlardır. Son zamanlarda, alveoler makrofaj hücrelerini hedefleyen bir ilaç salınım sistemi, tüberküloz gibi hücre içinde çoğalabilen hastalıkların üstesinden gelmek için etkili olmuştur. Alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilen mycobacterium tuberculosis sindirilemez ancak makrofaj hücrelerini inkübatör olarak kullanarak çoğalırlar. Antibiyotiklerin tüberküloz ile infekte olmuş alveolar makrofaj hücrelerine mikroküre formunda fagositik iletimi tüberkülozun üstesinden gelinmesi için etkili bir strateji olması beklenmektedir. Etkili bir şekilde fagosite edilen mikroküre geliştirmek için ve

fagositoz mekanizmasını anlamak için, mikroküreye karşı makrofajın fagositik aktivitesi tam olarak tespit edilmelidir (Hasegawa et al., 2008).



Şekil 2.7. Proinflamatuar sitokinlerin sentez ve salınımını başlatarak işgalci patojenlere fagositoz ile cevap veren bir makrofaj hücresi (Drake, 2010)

2.5. Kanser ve HeLa Hücre Hattı

Kanser, tüm canlıların yakalanabildiği bir hastalık grubudur. Doğal ve laboratuvar hayvanlarında her yönden insan kanserlerine benzeyen hastalıklar vardır. İnsan kanserleri ise biyolojik ve klinik bakımlardan birbirlerinden çok farklı özellikleri olan ortalama 100 değişik hastalıktan oluşmaktadır. Bunlardan bazıları çok yavaş ilerleyen, tedavi edilmediklerinde bile uzun yıllar boyu yaşama olarak veren durumlardır. Diğer yandan tedavi edilmediklerinde genelde aylar içinde yayılarak ölüme yol açabilen saldırgan kanserler de bilinmektedir. Bu niteliklerinden dolayı bir hastalık olarak kanseri tüm özellikleri ile tanımlayacak bir ifade bulunamamıştır. İngiliz onkolog Willis'in tanımı, yeni görüşler ışığında bazı eksiklikler içermekle birlikte, en yaygın kabul gören tanımdır: "Kanser anormal bir doku kitlesidir. Büyümesi normal hücrelerden hızlıdır ve onlarla eşgüdüm içinde değildir. Bu büyüme hızı onu uyarının ortadan kalkmasından sonra da aynı aşırı biçimde

devam eder” (Ruacan, 2009). Kanser, genetik bir hastalıktır. Hücresel gelişimi kontrol eden genlerdeki bozukluklar kontrolsüz hücre büyümelerine yol açmaktadır. Bu genetik bozukluk birçok olguda kalıtsal değildir.

İlk defa 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri, Baltimore’da servikal kanser nedeniyle takip edilen Afrika kökenli Amerikalı bir hastanın kanser dokularının laboratuvarda kültürü başarılabildiğiştir. Henrietta Lack adındaki hasta kanserin yayılması sonucu ölmüş ancak ölümsüz hücrelerinin kültürü adına atfen HeLa adı ile dünya genelindeki laboratuvarlara talep nedeniyle dağıtılmıştır. HeLa hücreleri izole edilen ilk kanser hücreleridir. İlk olarak 1951 yılında HeLa hücre hatlarının kültürünün yapılabilmesi bilimsel araştırmalarda çok önemli ilerleme sağlamıştır (Akçalı, 2010). Günümüzde kanser araştırmalarında hücre kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılacak çalışmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılması gerektiği için HeLa hücre hattı kullanılmıştır.

2.6. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Mikropartiküller

İlaç taşıyıcı sistemlerin gelişmesi doğrultusunda yarı mikron ve mikropartiküler sistemler önemli bir yer oluşturmuşlardır. Partiküler ilaç dağıtımında mikropartiküller ve nanopartiküller arasında sıklıkla ayırım yapılır. Bazı yazarlar mikropartikül terimini özel boyutlar için nanopartikül olarak ayırmaktadırlar. Büyük boyutlu partiküller daha çok mikropartiküller gibi davranırlar ve aynı üretim süreçleri gerektirirler. Küçük olan partiküller, ilacın büyük oranda dış sulu faza erişimini sağlarlar. Mikropartiküller çeşitli dokuların içine enjekte edilebilir ve buralara yerleşebilirler. Boyutun, damar içine enjekte edilebilen partiküllerin kaderi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Büyük mikropartiküller damarla aynı boyutta ise tıkanıklığa neden olabilir ve bu özellik ilaç taşıyıcı olan veya olmayan partiküllerin kan akışını kapatmak için kullanılabilir (Acharya and Sahoo, 2011).

Çoğu kanser türleri lokalizasyonuna ve evrelerine bağlı olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi uygulamalarla tedavi edilebilmektedir. Kemoterapi uygulamasında farmakoloji olarak aktif kanser ilacı tümör dokusuna düşük spesifite ve doza bağımlı toksisitesi ile ulaşmaktadır. Kullanılan çoğu yöntem kanser hücrelerini ayıramaz dolayısıyla sistemik toksisiteye ve yan etkilere neden olmaktadır. Bu durum ilacın alınabilen maksimum dozunu sınırlamaktadır. Ayrıca

hızlı eliminasyon ve geniş bir alana yayılım için ilacın fazla miktarda uygulanmasını gerektirmektedir ancak bu durum pahalı olmasına ve istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına sebep olur. Mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin daha etkili ve daha az zararlı olması bu problemlerin bazılarını ortadan kaldırır. Hedeflenen tümör dokusuna partiküllerin ulaşabilmesi için eliminasyon olmadan dolaşımda uzun süre kalmaları gerekmektedir. Yüzey modifiye olmayan veya hidrofobik mikropartiküller dolaşımda iken büyüklük ve yüzey karakteristiklerine bağlı olarak başlıca karaciğer ve dalak olmak üzere mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından yakalanmaktadırlar. Bu sorunu ortadan kaldırmak için mikropartiküller hidrofilik polimerler ile kaplanarak partiküller makrofajlarca yakalanmaktan korunmaktadırlar. Hidrofilitenin artırılması ayrıca partikülü suda daha çözünür yapmasının yanında enzimatik parçalanmaya karşı daha az hassas olmasını ve böylece biyouyumluluğunun artmasını sağlamaktadır (Siepmann and Siepmann, 2006).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar ile ilgili ayrıntılı bilgiler sunulmuştur. Deneysel çalışmalar kısaca;

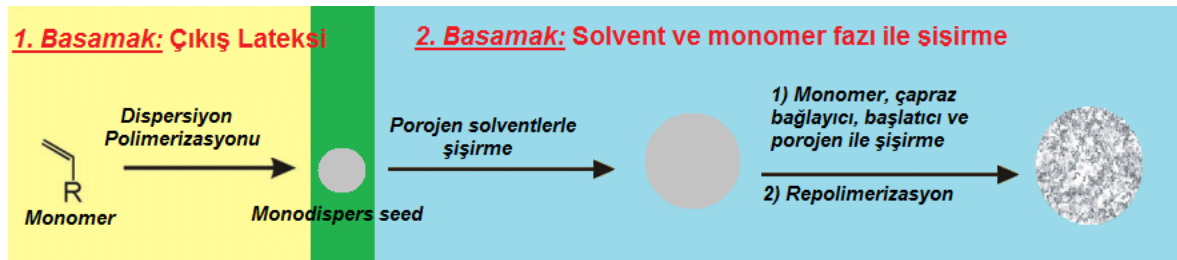
- Üç farklı monodispers polimerik mikrokürenin sırasıyla, çok basamaklı mikrosüspansiyon, çöktürme ve atom transfer radikal polimerizasyonu yöntemleriyle sentezlenmesi
- Sentezlenen polimerik mikrokürelerin karakterizasyonu ve protein adsorpsiyonu deneyleri
- Sentezlenen polimerik mikrokürelerin hücre etkileşim çalışmaları

olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır.

3.1. Monodispers Polimerik Partiküllerin Sentezlenmesi

3.1.1. Çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi ile monodispers gözenekli poli(GDMA-co-GDGDGA) partiküllerin sentezlenmesi

Monodispers ve gözenekli polimerik partiküllerin sentezi için çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, başlangıçta seed olarak kullanılacak olan çıkış lateksi üretilmiştir. Daha sonra çıkış lateksi diluent ve monomer fazında şişirilmiştir. Son olarak da monomer fazının çıkış partikülleri içerisinde repolimerizasyonu sonucu eş boyutlu, gözenekli partiküller elde edilmiştir. Uygulanan “çok basamaklı polimerizasyon yöntemi” şematik olarak Şekil 3.1’de ve elde edilen monodispers gözenekli formdaki poli(GDMA-co-GDGDGA) partiküllerin sentez koşulları Çizelge 3.1’de özetlenmektedir.



Şekil 3.1. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonunun şematik gösterimi (Gökmen and Du Prez, 2012)

Çizelge 3.1. Çok basamaklı polimerizasyon yönteminde kullanılan metaryaller ve polimerizasyon koşulları

Kimyasal Malzeme		Miktar
Çıkış lateksinin diluent ortamı ile şişirilmesi	Soydum dodesil sülfat (SDS)	0.15 g
	Distile su	60 mL
	Dibütilftalat (DBP)	0.9 mL
	Sikloheksanol (CycOH)	1.6 mL
Monomer fazı ile şişirme	Soydum dodesil sülfat	0.15 g
	Distile su	60 mL
	Gliserol dimetakrilat (GDMA)	1.3 mL
	Gliserol-1,3-digliserol diakrilat (GDGDA)	1.3 g
	İzoamil alkol (IAA)	0.25 mL
	Benzoil peroksit (BPO)	0.08 g
	Polivinil alkol (PVA)	0.8 g
Polimerizasyon Koşulları		
	Sıcaklık	80 ⁰ C
	Çalkalama hızı	100 cpm
	Polimerizasyon süresi	24 saat

3.1.1.1. Çıkış lateksi üretimi

Materyal

Çıkış lateksinin dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile üretiminde dağıtma ortamı olarak mutlak etil alkol (Et-OH, Merck, Almanya), stabilizör olarak polivinilprolidon K-30 (PVPK-30, Fluka, Sigma-Aldrich Co., ABD), monomer olarak glisidilmetakrilat (GMA, Aldrich Chemicals Co., ABD) ve başlatıcı olarak da monomer fazında çözünen, metanolden kristalize edilen 2-2'-azobisizobütironitril (AIBN, BDH Chemicals Ltd., ABD) kullanılmıştır.

Çıkış lateksinin üretim yöntemi

Çıkış lateksi olarak kullanılan poli(GMA), dispersiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Bu yönteme göre dağıtma ortamı, 0.9 g PVP K-30 stabilizörünü 30 mL Et-OH içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Dağıtma ortamında 1.5 mL GMA monomer fazı ve monomer fazında çözünebilen 0.04 g AIBN başlatıcısı eklenerek ultrasonik banyoda (Branson 200, İngiltere) 5 dakika süreyle çözünmesi sağlanmıştır. Bu işlem sırasında 260 mL hacmindeki cam polimerizasyon reaktörü kullanılmıştır. Ağız sızdırmaz şekilde kapatılan cam polimerizasyon reaktörü, sıcaklık kontrollü sistem ile donatılmış başlangıçta oda sıcaklığında olan çalkalamalı su banyosu (Gallenkamp, ABD) içine yatay pozisyonda yerleştirilerek, 100 cpm karıştırma hızı ile polimerizasyon sıcaklığı 70°C'a kadar ortam ısıtılmıştır. Polimerizasyon işlemi 24 saat süre ile belirtilen sıcaklık ve çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonun tamamlanması sonucu oluşan ürünler, oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Daha sonra 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılan ürün, dağıtma ortamında çözünmeyen polimerik partikülü, dağıtma ortamından ayırmak amacıyla 5000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir (Nüve NF200, Belçika). Santrifüj sonrasında süpernatantın atılması ile partiküllerin dağıtma ortamında ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra çöken partiküllerin üzerine ilk olarak etanol eklenerek, bir baget yardımıyla ortamda dağıtılmış ve tekrar santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme-dekantasyon adı verilen bu işlem aynı şekilde 2 kez etanol, 3 kez de distile su için tekrarlanmıştır. Son tekrarda çöken partiküller baget yardımıyla karıştırılarak distile suyun içerisine aktarılmış, dağıtmak amacıyla da 1-2 dakika sonikasyon yapılmıştır. Bütün bu işlemler sonunda, eş boyutlu poli(glisidil metakrilat) çıkış lateksi elde edilmiştir.

Tez çalışmaları kapsamında çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi ile sentezlenen monodispers, gözenekli poli(GDMA-co-GDGA) partiküllerinin sentezlenmesi amacıyla poli(GMA) çıkış lateksi olarak kullanılmıştır.

Çıkış lateksinin karakterizasyonu

Çıkış lateksinin sulu dispersiyonunun polimerik partikül içeriği gravimetrik analiz yöntemiyle bulunmuştur. Bu amaçla sulu ortamda bulunan partiküller, vakum

etüvünde (Nüve, EV018, Belçika) 70°C'de 24 saat süreyle kurutulmuş ve alınan belirli hacimdeki dispersiyonun katı partikül içeriği gravimetrik olarak belirlenmiştir.

3.1.1.2. Çıkış lateksinin diluent ortamı ile şişirilmesi

Materyal

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminin birinci basamağında çıkış lateksi olan poli(GMA)'nın diluent ortamı ile şişirilmesi aşamasında, anyonik emülsiyon yapıcı madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma Chemicals Co., ABD), gözenek yapıcı çözücü olarak sikloheksanol (Cyc-OH, Sigma-Aldrich, ABD) ve düşük molekül ağırlıklı dibütilftalat (DBP, Fluka, ABD) iyi bir karışım oluşturduğu için kullanılmıştır.

Çıkış lateksinin diluent ortamı ile şişirilmesi yöntemi

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminin birinci basamağında çıkış lateksi olan poli(GMA)'nın diluent ortamı ile şişirilmesi aşamasında, organiz faz gözenek yapıcı çözücü olan 0.9 mL dibütil ftalat (DBP) ve 1.6 mL sikloheksanol (Cyc-OH)'ün karışımından hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışım ağırlıkça % 0.25 SDS içeren 60 mL distile su içerisinde 8 dakika süreyle ultrasonikasyon uygulanarak dispers edilmiştir. Bu işlem oda sıcaklığında 200 W gücünde bir sonikatörde (Bandelin D-12207, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Böylece SDS misel yapısı oluşturarak monomer fazının sulu ortamda mikron boyutlu damlacıklar şeklinde dağılmasını ve bunun sonucu olarak da partiküllerin aynı oranda şişmelerini yani monodispersitenin korunmasını sağlamaktadır.

Elde edilen emülsiyona yaklaşık 1 µm boyutunda eşdağılımlı (monodispers) lateks partiküllerden 0.5 g eklenmiş ve 4 dakika süreyle ultrasonikasyon uygulanarak tekrar dispers edilmiştir. Şişirme işlemi, bir manyetik karıştırıcıya (IKA-Werke, Almanya) konularak oda sıcaklığında 250 rpm hızda 24 saat süreyle karıştırılmıştır. Bu işlem sulu fazda organik faz damlacıklarının tamamı kayboluncaya yani organik fazın tamamı partiküller tarafından absorplanıncaya kadar sürdürülmektedir. Kullanılacak lateksin ortalama molekül ağırlığı partiküllerin organik faz absorpsiyonu açısından önemli olduğundan bu basamakta çıkış lateks partiküllerinin organik faz absorpsiyon yeteneğinin artırılması amacıyla dibütil

ftalat (DBP) ve sikloheksanol (Cyc-OH) düşük moleköl ağırlıklı maddeler aktivatör olarak kullanılmıştır. Çünkü düşük moleköl ağırlıklı latekslerin organik faz absorpsiyon kapasitesi daha yüksektir. Bu organik ajanlar aynı zamanda gözenek yapıcı çözücü özelliğine de sahiptirler.

3.1.1.3. Çıkış lateksinin monomer fazı ile şişirilmesi

Materyal

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminin ikinci basamağında çıkış lateksinin monomer fazı ile şişirilmesi aşamasında hidrofilik özellikte olan gliserol 1,3-digliserolat diakrilat (GDGDA, Sigma-Aldrich, ABD) ve gliserol dimetakrilat (GDMA, %85, Sigma-Aldrich, Almanya) monomerleri kullanılmıştır. Sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma Chemicals Co., ABD) anyonik emülsiyon yapıcı madde olarak, izoamil alkol (IAA, Merck, Almanya) yüzey gerilimini azaltıcı madde olarak, benzoil peroksit (BPO, Fluka Chemika, İsviçre) monomer fazında çözünen ısı başlatıcı olarak ve polivinil alkol (PVA, %87-89 hidrolize, kısmen hidrofolik ve kısmen hidrofilik olan Sigma-Aldrich, ABD) ise boyutu kontrol ederek partiküllerin birbirine yapışmasını önlediği için stabilizatör olarak kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen partiküllerin ekstraksiyonu aşamasında tetrahidrofuran (THF, Sigma-Aldrich, ABD) ve %96'lık teknik etanol (Et-OH) kullanılmıştır.

Çıkış lateksinin monomer fazı ile şişirilmesi yöntemi

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminin ikinci basamağında diluent ortamı ile şişirilmiş çıkış lateksi olan poli(GMA) monomer fazı ile tekrar şişirilmiştir. Bu basamakta monomer olarak 1.3 g gliserol 1,3-digliserolat diakrilat (Şekil 3.2) 1.3 mL gliserol dimetakrilat (GDMA), 0.25 mL izoamil alkol (IAA) ve 0.08 g benzoil peroksit (BPO) karışımı oluşturularak BPO'nun karışım içinde iyice çözünmesi için oda sıcaklığında sabit tutularak su banyosunda (Ultrasonic LC 30, Almanya) bekletilmiştir. Daha sonra bu karışım ağırlıkça % 0.25 SDS içeren 60 mL distile su içerisinde 12 dakika süreyle ultrasonikasyon uygulanarak dispers edilmiştir. Bu işlem oda sıcaklığında 200 W gücünde bir sonikatörde (Bandelin D-12207, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Böylece SDS misel yapısı oluşturularak monomer fazının sulu ortamda mikron boyutlu damlacıklar şeklinde dağılmasını ve bunun

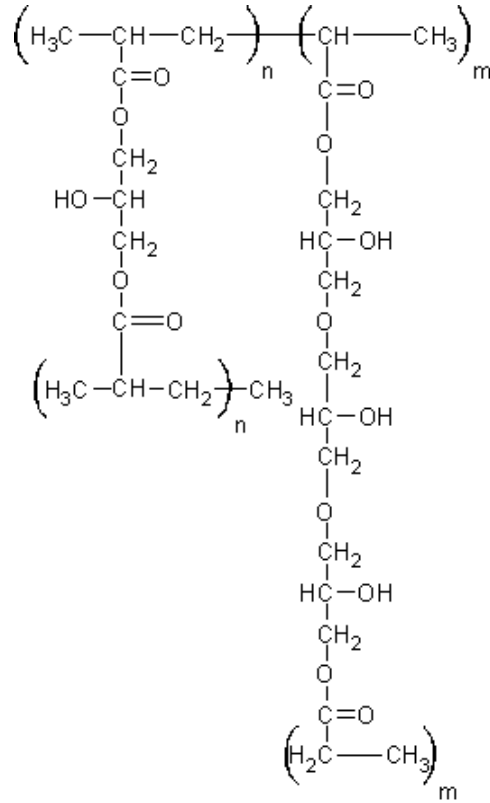
C=CC(=O)OCC(O)OCC(O)OCC(O)OCC(=O)C=C

3.1.1.4. Monomer fazının çıkış partikülleri içerisinde repolimerizasyonu

3.1.1.5. Poli (GDMA-co-GDGA) partiküllerinin ekstraksiyonu

35

kez etanol, 2 kez THF, tekrar 2 kez etanol ve 3 kez de distile su için tekrarlanmıştır. Son tekrarda çöken partiküller baget yardımıyla karıştırılarak distile suyun içerisine aktarılmıştır. Dağıtmak amacıyla da 1-2 dakika sonikasyon yapılmıştır. Bütün bu işlemler sonunda, eş boyutlu poli(GDMA-co-GDGDA) elde edilmiştir. Elde edilen poli(GDMA-co-GDGDA)'nın kimyasal yapısı Şekil 3.3'de ve sentez koşulları da Çizelge 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Poli(GDMA-co-GDGDA) polimerik partikülünün kimyasal yapısı

3.1.2. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi kullanılarak poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin DMAEM ile türevlendirilmesi

Poli(GDMA-co-GDGDA) lateks partiküllerin yüzeyi ATRP yöntemi kullanılarak DMAEM ile türevlendirilmiştir. Bu işlem iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri bromlanmıştır ve daha sonra dimetilaminoetil metakrilat (DMAEM) zincirlerinin yapıya bağlanması için ATRP yöntemi uygulanmıştır.

3.1.2.1. Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün bromlanması

Materyal

Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün bromlanması işleminde tetrahidrofuran (THF, Sigma-Aldrich, ABD) reaksiyon ortamı olarak, trietilamin (TEA, Sigma-Aldrich, Almanya), 4-dimetilamino pridin (DMA-Pry, Sigma-Aldrich, Almanya), bromoizobütil bromür (BrIBuBr, Aldrich Chemicals, ABD) materyalleri kullanılmıştır.

Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün bromlanması yöntemi

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemi ile sentezlenen poli(GDMA-co-GDGDA) lateks partiküller bromlama basamağında ilk olarak bromizobütilbromür (BrIBuBr) ile muamele edilmiştir. Böylece BrIBuBr lateks partiküllerinin yüzeyine ester bağının oluşumu ile kovalent olarak bağlanmıştır. Lateks partiküllerin ortama hazırlanması için ilk olarak THF ile yıkama yapılmıştır. Reaksiyon, 0.175 mL TEA katalizörü içeren 5 mL THF ortamında yürütülmüştür. THF ve TEA içeren reaksiyon ortamında 0.03 g dimetil amino pridin (DMA-Pry) çözüldükten sonra 0.5 g partikül bu çözelti ile Schelenk tüpüne aktarılmış ve manyetik karıştırıcıda döndürülmeye başlanmıştır. Daha sonra 0.14 mL BrIBuBr buz banyosunda damla damla çözelti içerisine ilave edilmiştir. Reaksiyon manyetik karıştırıcı varlığında 24 saat süreyle oda sıcaklığında devam etmiştir. Poli(GDMA-co-GDGDA-Br) partiküllerini bir sonraki ATRP basamağı ortamına hazırlamak için iki kez THF, sonrasında 2 kez anisol ortamı ile yıkama işlemi yapılmıştır.

3.1.2.2. Bromlanmış poli(GDMA-co-GDGDA) partikülüne ATRP yöntemi kullanılarak DMAEM kovalent bağ ile bağlanması

Materyal

Anisol (Sigma-Aldrich, Almanya), 1,1,4,7,10,10,10-hekzaetiltriethilen tetraamin (HMTETA, Aldrich, ABD), polimer üzerine türevlendirilecek monomer olarak 2-dimetilamino etilmetakrilat (DMAEM, Sigma-Aldrich, Almanya), katalizör olarak bakır(I)klorür (CuCl, Sigma-Aldrich, ABD), bakır (II) klorür (CuCl₂, Birleşik Kimya, Türkiye), etilendiamin tetra asetik asit (EDTA, Sigma, ABD) ve sodyum bikarbonat (NaHCO₃, Riedel de Haën, Almanya) materyalleri kullanılmıştır.

Bromlanmış Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülüne ATRP yöntemi kullanılarak DMAEM kovalent bağ ile bağlanması yöntemi

Poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerine kovalent olarak DMAEM bağlanması için bromlama aşamasından sonra ATRP yöntemi uygulanmıştır. Partiküllerin yüzeyinde bulunan Br grupları ATRP'nin başlatıcısı olarak görev almıştır. Partikülün üzerindeki brom gruplarının katalizör ile reaksiyona girerek yüzeyden ayrılması ile DMAEM zincirleri bu radikalik gruplar üzerinden partiküle kovalent olarak bağlanmıştır. Reaksiyon Schlenk tüpü içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle 2 mL anisol ortamı ile 0.005 g CuCl ve 0.0013 g CuCl₂ metal halojenürler 0.5 mL DMAEM ile karıştırıldıktan sonra Br grupları içeren partiküller ile etkileştirilmiştir. Bu işlem sırasında reaksiyon ortamı oluşan radikalik grupların oksijenle temasını azaltmak amacıyla belirli aralıklarla azot gazı ile zenginleştirilmiştir. Üzerine 16.5 µL HMTETA eklendikten sonra tekrar azot gazından geçirilmiştir. Son olarak da schlenk tüpü iyice vakumlanmıştır. Reaksiyon manyetik karıştırıcı varlığında 24 saat süreyle oda sıcaklığında devam etmiştir.

Polimerizasyon tamamlanmasından sonra, dönüşmeyen monomer ve dağıtma ortamı bileşenlerini temizlemek için serum değiştirme yöntemi kullanılarak yıkama işlemi yapılmıştır. Bu amaçla, schlenk tüpünden 10 mL'lik tüplere aktarılan emülsiyon 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çöken partiküllerin üzerine teknik etanol eklenerek dispers edilip iki kez daha aynı işlem uygulanmıştır. Santrifüjleme-dekantasyon adı verilen bu işlem aynı şekilde 2 kez Et-OH ve distile su, 2 kez %5'lik EDTA ve %1'lik sodyum bikarbonat çözeltisi ile son olarak da 5 kez distile su ile tekrar edilmiştir.

Son tekrarda çöken partiküller baget yardımıyla karıştırılarak distile suyun içerisine aktarılmış, dağıtmak amacıyla da 1-2 dakika sonikasyon yapılmıştır. Bütün bu işlemler sonunda, eş boyutlu, poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri elde edilmiştir.

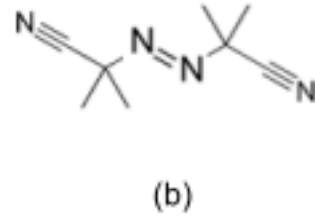
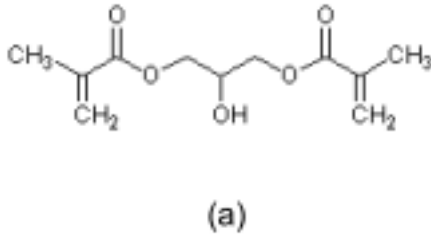
3.1.3. Çöktürme polimerizasyonu yöntemi ile poli(GDMA) partikülünün sentezi

3.1.3.1. Materyal

Çöktürme polimerizasyon hidrofilik özellikte olan gliserol dimetakrilat (GDMA, %85, Sigma-Aldrich, Almanya) monomeri kullanılmıştır. Gözenek yapıcı organik çözücü olarak toluen (Sigma-Aldrich, Almanya) ve asetonitril (ACN, Sigma-Aldrich, Almanya) karışımı kullanılmıştır. Monomer fazında çözünen ısıl başlatıcı olarak azobisisobütronitril (AIBN) kullanılmıştır. Ayrıca elde edilen partiküllerin ekstraksiyonu aşamasında %96'lık teknik etanol (Et-OH) kullanılmıştır.

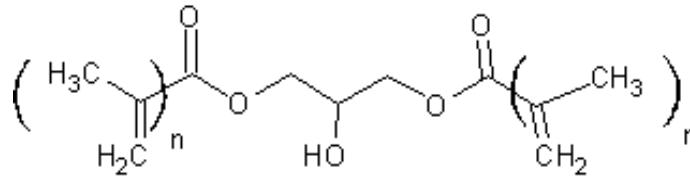
3.1.3.2. Poli(GDMA) partikülünün çöktürme polimerizasyonu ile sentezlenmesi yöntemi

Poli(GDMA) polimerik partiküller çöktürme polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir. Kullanılan malzemelerin kimyasal yapıları Şekil 3.4' de verilmiştir.



Şekil 3.4. (a) GDMA, (b) AIBN

Polimerizasyon kapalı silindirik reaktörde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle reaktör içerisine polimerizasyon ortamı olarak toluen-asetonitril karışımı aktarılmıştır. Daha sonra sırasıyla başlatıcı görevi gören AIBN ve monomer (GDMA) eklenmiştir. Reaktör oda sıcaklığında çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve sıcaklık 70°C'ye ayarlanmıştır. Polimerizasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Reaksiyon sonunda oluşan partiküller teknik etanol ile bir dizi yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Yıkama sonrası distile suda beklemeye alınan poli(GDMA) polimerik partiküllerin yapısı Şekil 3.5'de gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Poli(GDMA) polimerik partikülünün kimyasal yapısı

3.2. Monodispers Polimerik Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.1.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz

Elde edilen partiküllerin ortalama boyu, boy dağılımı ve yüzey morfolojisinin analizi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM, Nova Nanosem 430, ABD) kullanılmıştır. SEM cihazında görüntü alabilmek amacıyla, örneklerin hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir. Ağırlıkça %0.25 SDS içeren çözeltinin içerisinde dağıtılmış partikül dispersiyonundan yaklaşık 0.01 mL örnek, metal, örnek diski üzerine damlatılmıştır. Damlatılan örnek kurutulduktan sonra PECS (Precision Etching Coating System, Gatan 682, ABD) cihazı ile 100nm kalınlığında iletken bir altın tabakası ile partiküllerin içinden elektron demetinin geçebilmesi amacıyla kaplanmıştır. Analize hazır örnek SEM kolonuna yerleştirilmiş ve tek tabakalı partikül diziliminin olduğu alanlarda görüntüleri alınmıştır.

3.2.1.2. BET ölçüm cihazı ile yüzey alanı ve gözeneklilik analizi

Yüzey alanı, ortalama gözenek boyutu ve dağılımını veren Brunauer-Emmet-Teller (BET) cihazı (Quantachrome, Nova 2200E, İngiltere) ile yapılan ölçümler için aşağıdaki yöntem izlenmiştir. Öncelikle partiküller 90°C'de 10 saat süre ile vakum etüvünde kurutulmuştur. Cihaz hücrelerine yerleştirilen partiküller, BET sisteminde 90°C'de 3 saat süre ile vakumlanmıştır. Her bir analiz yaklaşık 0.1 g kuru partikül ile yapılmıştır. Ölçümler sıvı azot içerisinde yerleştirilen örnek hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Ölçüm prensibi, partiküller üzerinden geçirilen azot gazının partiküller üzerine adsorplanması ve adsorplanan miktarın azot gaz basıncından hesaplanması temeline dayanmaktadır.

3.2.2. Yapısal özelliklerinin belirlenmesi

3.2.2.1. FTIR spektroskopisi

Partiküllerin yığın ve yüzey yapılarının tanımlanmasına yönelik olarak kimyasal karakterizasyon sırasıyla FTIR ve FTIR-ATR (FTIR azalan tam yansıma) yöntemlerine göre yapılmıştır. Analiz örneklerinin hazırlanması amacıyla bütün partiküllerden 1 mL örnek vakum etüvünde 70°C sıcaklıkta 48 saat süreyle kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. 10 mg partikül örneği potasyum bromür ile (KBr) ile karıştırılarak, katı toz formundaki karışım homojine edilmiş ve basınç altında preslenerek katı tablet haline getirilmiştir. FTIR-ATR için kurutulan partiküller iyice toz haline getirilerek cihaza yerleştirilmiştir. Elde edilen tabletler ve toz halindeki örnekler kullanılarak partikül örneklerinin spektrumları, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, Nicolet iS10, Thermo Scientific, ABD) cihazında kaydedilmiştir. FTIR spektrumları 400–4000 cm⁻¹ dalgasayısı aralığında değerlendirilmiştir.

3.2.2.2. Elemental analiz

Sentezlenen poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülünün yüzey modifikasyonu amacıyla yapılan ATRP sonucunda kullanılan DMAEM'dan kaynaklanan azot içeriği belirlemek amacıyla elemental analiz yöntemi kullanılmıştır. Polimerik partiküller (1 mg) elemental analiz cihazının (LECO, CHNS-932, ABD) alüminyum örnek hücrelerine yerleştirilmiştir. Polimerik partikül cihaza yerleştirildikten sonra yakma işlemi sonucunda ağırlıkça %karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O) ve azot (N) analizi yapılarak partikülün içerdiği DMAEM miktarı bulunmuştur. Böylece ATRP işleminin başarısı belirlenmiştir.

3.2.2.3. Potansiyometrik titrasyon

Potansiyometrik titrasyon, titrantın her ilavesinden sonra çözelti potansiyelinin ölçülmesi esasına dayanır. Potansiyometrik titrasyon tez çalışmaları kapsamında ATRP yöntemi kullanılarak sentezlenen poli(DMAEM) bağlı partikülün amin fonksiyonel grubunun tayini amacıyla uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda öncelikle 0.2 g poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülü çöktürülerek, 20 mL 0.1 M HCL çözelti içerisine aktarılmıştır. 2 saat boyunca polimerik partikülle HCL çözeltisi etkileştirilmiş ve HCL moleküllerinin bir kısmı hidroksil grupları ile

etkileşime girmesi sağlanmıştır. 2 saat sonunda manyetik karıştırıcıdan alınan çözelti 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktararak 5000 rpm hızında 5 dakika süre ile santrifüjlenmiştir. Santrifüj bitiminde oluşan supernatanttan 5 mL alınmıştır ve üzerine 10 mL distile su ilave edilmiştir. Titrasyon için bir behere aktarılan son çözelti manyetik karıştırıcıda döndürülmeye başlanmıştır. 0.1 M NaOH çözeltisi titrant olarak kullanılmıştır. Beherdeki çözeltiye her defasında 0.2 mL titrant ilave edilerek yaklaşık pH 13 değerine kadar okunan değerler kaydedilmiştir.

Bir sonraki basamakta, 5 mL 0,1 M HCL içeren çözelti beher içerisinde manyetik karıştırıcıda döndürülerek 0.1 M NaOH çözeltisi ile aynı şekilde titre edilmiştir. Her iki işlem için de elde edilen eklenen toplam titrant hacmi ile pH değerleri grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen grafiklerden, partikül ile etkileştirilmeyen çözeltinin dönüm noktasına karşılık gelen hacim değerinden partikül ile etkileştirilen çözeltinin dönüm noktasına karşılık gelen hacim değeri çıkartılmıştır. Elde edilen aralarındaki farktan yola çıkılarak partikülün içerdiği DMAEM miktarı hesaplanmıştır.

3.3. Monodispers Polimerik Partiküller ile Protein Adsorpsiyonu Çalışmaları

3.3.1. Materyal

Protein adsorpsiyonunda tampon çözeltiler hazırlamak için sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Riedel de Haén, Almanya), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Riedel de Haén, Almanya), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit, HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, Fluka, Biochemika, ABD), disodyum tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Laboratory BDH Regent, İngiltere) ve sodyum klorür (NaCl , Riedel de Haén, Almanya) kullanılmıştır. Tampon çözeltilerinin pH'ı, hidroklorik asit (%37, Merck, Almanya) ve sodyum hidroksit (NaOH , Riedel de Haén, Almanya) çözeltileri ile ayarlanmıştır. Adsorpsiyon deneyinde protein olarak siğir serum albümin (BSA, Sigma Aldrich, Kanada) kullanılmıştır.

3.3.2. Kullanılan tampon çözeltiler

a) 0.05 M Asetat Tampon Çözeltisi (pH 3.0, 4.0 ve 5.0)

0.05 M asetat tampon çözeltisi hazırlamak için 250 mL distile su içerisinde 1.7 g sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözülmüştür. pH değerini ayarlamak için kullanılacak olan 0.05 M asetik asit çözeltisi için 250 mL distile suyun içerisine

0.6 mL asetik asit (CH_3COOH) eklenmiştir. Daha sonra 0.05 M sodyum asetat trihidrat çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerindeyken 0.05 M asetik asit çözeltisi ile pH 3.0, 4.0 ve 5.0 değerlerine pH metre cihazı kullanılarak ayarlanmıştır. Böylece farklı pH'larda asetat tampon çözeltisi adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

b) 0.05 M Fosfat Tampon Çözeltisi (pH 6.0 ve 7.0)

0.05 M fosfat tampon çözeltisi hazırlamak için 250 mL distile su içerisinde 1.95 g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) çözülmüştür. pH değerini ayarlamak için kullanılacak olan 0.05 M sodyum hidroksit çözeltisi için 250 mL distile suyun içerisine 0.5 g sodyum hidroksit (NaOH) eklenmiştir. Daha sonra 0.05 M sodyum dihidrojen fosfat dihidrat çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerindeyken 0.05 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 5.0 ve 6.0 değerlerine pH metre cihazı kullanılarak ayarlanmıştır. Farklı pH'larda fosfat tampon çözeltisi adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

c) 0.05 M HEPES Tampon Çözeltisi (pH 8.0)

0.05 M HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit) tampon çözeltisi hazırlamak için 250 mL distile su içerisinde 2.98 g HEPES çözülmüştür. pH değerini ayarlamak için kullanılacak olan 0.05 M sodyum hidroksit çözeltisi için 250 mL distile suyun içerisine 0.5 g sodyum hidroksit (NaOH) eklenmiştir. Daha sonra 0.05 M HEPES çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerindeyken 0.05 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 8,0 değerine pH metre cihazı kullanılarak ayarlanmıştır. HEPES tampon çözeltisi adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

d) 0.05 M Borat Tampon Çözeltisi (pH 9.0 ve 10.0)

0.05 M disodyum tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) tampon çözeltisi hazırlamak için 250 mL distile su içerisinde 4.77 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ çözülmüştür. pH değerini ayarlamak için kullanılacak olan 0.05 M sodyum hidroksit çözeltisi ve 0.05 M HCl çözeltileri hazırlanmıştır. Bunun için iki farklı erlende 250'şer mL distile suyun içerisine 0.5 g sodyum hidroksit (NaOH) ve 383.4 μL %37'lik HCl

eklenmiştir. Daha sonra 0.05 M borat tamponu 0.05 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 10 ve 0.05 M HCl çözeltisi ile de pH 9 değerine pH metre cihazı kullanılarak ayarlanmıştır. Borat tamponu adsorpsiyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.

3.3.3. Yöntem

Farklı parametrelerde polimerik partiküllerin sığır serum albümin (BSA) adsorpsiyon davranışı incelenmiştir. Albümin adsorpsiyonuna; pH, başlangıç albümin derişimi etkisi, partikül derişimi, desorpsiyon, adsorpsiyon hızı çalışmaları yapılmıştır. pH etkisi çalışmaları hariç diğer etkilerin incelenmesi sırasında albüminin izoelektrik noktası olan pH 5 asetat tamponu kullanılmıştır. İzoelektrik noktasında net olarak yüksüz olan albümin ile sulu faz arasında etkileşime bağlı olarak çözünürlük azalmakta, protein sulu fazdan kaçarak, partikül yüzeyi ile daha çok etkileşmektedir dolayısıyla partikülün adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır.

Adsorpsiyon deneyleri, adsorpsiyon hızı deneyleri dışında 2 saat süre ile 25°C sıcaklığında 500 rpm karıştırma hızında, 20 mL'lik adsorpsiyon şişelerinde yürütülmüştür. Bu süre sonunda partiküller adsorpsiyon ortamından uzaklaştırılmış ve partiküller üzerine adsorplanan protein miktarı adsorpsiyon öncesi ve sonrasında ortamdan alınan çözeltilerin 280 nm'de UV spektrofotometresi (Shimadzu-1601, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Her bir deneysel veri en az iki ölçümün ortalaması alınarak belirlenmiştir. Adsorplanan protein miktarı aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

Bu eşitlik
$$Q = \frac{(A_0 - A_f)}{A_0} \times \frac{C \cdot V}{m} \quad (3.1)$$

şeklinde olup, burada:

Q: Adsorpsiyon kapasitesini (mg BSA / g partikül)

C: BSA derişimini (mg BSA/ mL Tampon çözelti)

V: Toplam çözeltisini hacmi (mL)

m: partikül miktarını (g) ifade etmektedir.

3.3.4. pH etkisinin incelenmesi

Adsorpsiyon ortamı pH'sının, sentezlenen bütün polimerik partiküllerin üzerine BSA adsorpsiyonuna etkisi, pH 3 ile pH 10 aralığında farklı tampon sistemleri kullanılarak araştırılmıştır. pH 3 ile pH 5 aralığında asetat tamponu (0.05 M $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O} / \text{CH}_3\text{COOH}$), pH 6 ile pH 7'de fosfat tamponu (0.05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{NaOH}$), pH 8 için HEPES tamponu (HEPES/NaOH) ve pH 9 ile pH 10 için borat tamponu ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O} / \text{NaOH-HCl}$) kullanılmıştır. Her pH'da, başlangıç albümin derişimi 0.12 mg BSA/mL tampon çözelti olarak seçilmiştir. Adsorpsiyon deneyleri, oda sıcaklığında, 2 saat süre ile 500 dev/dak karıştırma hızında karıştırılarak yapılmıştır. Adsorpsiyon kapasitesi Eşitlik (3.1) kullanılarak hesaplanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalar ayrıntılı olarak aşağıda anlatılmıştır.

Farklı pH değerlerinin albümin adsorpsiyonunda etkisinin incelenmesi amacıyla distile su içerisinde dağıtılmış her bir polimerik partikül 0.05 g olacak şekilde 8 adet 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 5000 rpm döndürme hızında 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası supernatant atılarak her bir partikülü farklı pH ortamlarına hazırlamak amacıyla Bölüm 3.3.2'deki tampon çözeltilerle 5000 rpm'de tekrar 5 dakika santrifülenerek yıkama yapılmıştır. Santrifüj sonrası supernatantın UV spektrofotometresinde 280 nm dalgaboyunda ölçülen absorbans değeri 0.05'in altına düşene kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Bu değere ulaşıncı partiküller son kez santrifüjlenerek supernatant kısmı hiç sıvı kalmayacak şekilde dökülmüştür. Partiküller BSA ile etkileştirilmek için beklemeye alınmıştır.

Daha sonra albümin çözeltilerini hazırlamak amacıyla 8 adet cam adsorpsiyon şişesinin her birine 0.12 g BSA tartılarak üzerilerine 10 mL farklı pH'lardaki tampon çözeltiler ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcıda yaklaşık 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra pH değerleri kontrol edilmiştir. Her bir şişedeki çözeltiden 5'er mL alınarak UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Her bir partikül için pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'da ölçüm yapılan değerler A_0 olarak kaydedilmiştir.

Adsorpsiyon şişelerinde kalan 5 mL'lik çözeltiler ile partiküller etkileştirilmiş ve daha sonra pH kontrolü yapılmıştır. pH değerlerinde farklılık olan örneklerin pH'ı içerdiği tampon çözeltisine göre asetik asit, NaOH ve HCl kullanılarak ayarlanmıştır. pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'da bulunan tampon çözeltilerdeki üç farklı partikül için hazırlanan örnekler manyetik karıştırıcıda 2 saat süreyle karıştırılmıştır. Süre bitiminde her bir örnek santrifüjlenerek, supernatantlarının absorbans değerleri UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir partikül için pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ve 10'da ölçüm yapılan değerler A_f olarak kaydedilmiştir. Okunan absorbans değerlerinin 2'nin üzerine çıkması durumunda 1/5 oranında seyreltme yapılmıştır.

Eşitlik (3.1)'e göre; BSA derişimi (C) 12 mg/mL, toplam çözelti hacmi (V) 5 mL ve partikül miktarı (m) 0.05 g verileri ile her bir pH değerine karşı adsorpsiyon kapasite (Q) değerleri hesaplanmıştır. Her bir partikül için Q değerlerine karşı pH değerleri grafiğe geçirilmiştir.

3.3.5. Başlangıç protein derişimi etkisinin incelenmesi

Albümin adsorpsiyonu kapasitesine başlangıç albümin derişiminin etkisi, başlangıç albümin derişimi 0.25-16 mg BSA/mL tampon çözelti aralığında tutularak araştırılmıştır. BSA'nın izoelektrik noktası olan pH 5'de yüksek adsorpsiyon kapasitesi gösterdiği için pH 5 asetat tampon çözeltisi kullanılmıştır. Yapılan pH etkisi çalışmasında da aynı sonuca varılmıştır.

Başlangıç protein derişimi etkisinin incelenmesi çalışmasında öncelikle distile su içerisinde dağıtılmış her bir polimerik partikül 0.05 g olacak şekilde 8 adet 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 5000 rpm döndürme hızında 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası supernatant atılarak her bir partikül pH 5 asetat tamponu ile pH 5 ortamına hazırlamak amacıyla tekrar 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek yıkama yapılmıştır. Santrifüj sonrası supernatantın UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri 0.05'in altına düşene kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Bu değere ulaşıncaya partiküller son kez santrifüjlenerek supernatant kısmı hiç sıvı kalmayacak şekilde dökülmüştür. Partiküller BSA ile etkileştirilmek için beklemeye alınmıştır.

Daha sonra BSA çözeltisi hazırlamak amacıyla 8 adet cam adsorpsiyon şişelerine sırasıyla 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.12 ve 0.16 g BSA tartılarak üzerlerine 10 mL pH 5 asetat tampon çözeltisi ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcıda yaklaşık 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra pH değerleri kontrol edilmiştir. Daha sonra her bir şişedeki çözeltiden 5'er mL alınarak UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Farklı BSA derişimleri için ölçüm yapılan her bir değer A_0 olarak kaydedilmiştir. Adsorpsiyon şişelerinde kalan 5 mL'lik çözeltiler ile partiküller etkileştirilmiş ve daha sonra tekrar pH kontrolü yapılmıştır. pH değerlerinde farklılık olan örneklerin pH'ı asetik asit veya NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. üç farklı partikül için hazırlanan örnekler manyetik karıştırıcıda 2 saat süreyle karıştırılmıştır. Süre bitiminde her bir örnek santrifüjlenerek, supernatantlarının absorbans değerleri UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir partikül için farklı BSA derişiminde ölçüm yapılan değerler A_f olarak kaydedilmiştir. Okunan absorbans değerlerinin 2'nin üzerine çıkması durumunda 1/5 oranında seyreltme yapılmıştır.

Eşitlik 3.1'e göre; BSA derişimi (C) 0.25-16 mg/mL aralığında, toplam çözelti hacmi (V) 5 mL ve partikül miktarı (m) 0.05 g verileri ile adsorpsiyon kapasite (Q) değerleri hesaplanmıştır. Her bir partikül için Q değerlerine karşı BSA derişim değerleri grafiğe geçirilmiştir. Bu partiküller daha sonra desorpsiyon çalışmalarında kullanılacağı için uygun koşullarda saklanmıştır.

3.3.6. Partikül derişimi etkisinin incelenmesi

Partikül derişiminin BSA adsorpsiyonuna etkisi çalışmasında, partikül miktarı 0.01-0.4 g aralığında incelenmiştir. Başlangıç protein etkisi çalışmasında adsorpsiyon kapasitesinin platoya ulaştığı değere karşılık gelen albümin derişimi olan 12 mg BSA/mL değeri alınmıştır. BSA'nın izoelektrik noktası olan pH 5 sodyum asetat tamponu kullanılmıştır.

Partikül derişimi etkisinin incelenmesi çalışmasında öncelikle distile su içerisinde dağıtılmış her bir polimerik partikül 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 g olacak şekilde 8 adet 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 5000 rpm döndürme hızında 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası supernatant atılarak

her bir partikül pH 5 asetat tamponu ile pH 5 ortamına hazırlamak amacıyla tekrar 5000 rpm'de 5 dakika santrifürlenerek yıkama yapılmıştır. Santrifüj sonrası supernatantın UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri 0,05'in altına düşene kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Bu değere ulaşıncaya partiküller son kez santrifürlenerek supernatant kısmı hiç sıvı kalmayacak şekilde dökülmüştür. Partiküller BSA ile etkileştirilmek için beklemeye alınmıştır.

Daha sonra albümin çözeltilerini hazırlamak amacıyla 8 adet cam adsorpsiyon şişelerine 0.12 g BSA tartılarak üzerlerine 10 mL pH 5 asetat tampon çözeltisi ilave edilmiş ve manyetik karıştırıcıda yaklaşık 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra pH değerleri kontrol edilmiştir. Her bir şişedeki çözeltiden 5'er mL alınarak UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Farklı partikül derişimleri için hazırlanan aynı derişimdeki BSA çözeltilerinin absorbans değerleri ölçüm sonunda A_0 olarak kaydedilmiştir.

Adsorpsiyon şişelerinde kalan 5 mL'lik çözeltiler ile partiküller etkileştirilmiş ve daha sonra pH kontrolü yapılmıştır. pH değerlerinde farklılık olan örneklerin pH'ı asetik asit veya NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGA) partikülleri için hazırlanan örnekler manyetik karıştırıcıda 2 saat süreyle karıştırılmıştır. Süre bitiminde her bir örnek santrifürlenerek, supernatantlarının absorbans değerleri UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Farklı partikül derişiminde ölçüm yapılan değerler A_f olarak kaydedilmiştir. Okunan absorbans değerlerinin 2'nin üzerine çıkması durumunda 1/5 oranında seyreltme yapılmıştır.

Eşitlik 3.1'e göre; BSA derişimi (C) 12 mg/mL, toplam çözelti hacmi (V) 5 mL ve partikül miktarı (m) 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 g alınan veriler ile adsorpsiyon kapasitesi (Q) değerleri hesaplanmıştır. Q değerlerine karşı partikül miktarı değerleri grafiğe geçirilmiştir.

3.3.7. Adsorpsiyon hızı etkisinin incelenmesi

Bu bölümde poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGA) partikülleri üzerine BSA adsorpsiyonunun zamanla değişimi incelenmiştir. Deneysel çalışmalar pH 5 asetat tamponu ortamında, 12 mg BSA/mL protein derişiminde, 0.05 g partikül, 5 mL tampon çözelti ve 5., 10., 15., 20., 30., 45., 60., 90., 105., 120., 150. ve 180. dakika koşullarında gerçekleştirilmiştir.

Adsorpsiyon hızı çalışmasında öncelikle distile su içerisinde dağıtılmış polimerik partiküllerden toplamda 60 mL tampon çözelti ile etkileştirilmek için 0.6 g alınarak 0.05 g partikül/5 mL tampon çözelti derişim değeri korunmuştur. Partikülleri sıvı ortamından ayırmak için 5000 rpm döndürme hızında 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası supernatant atılarak her bir partikül pH 5 asetat tamponu ile pH 5 ortamına hazırlamak amacıyla tekrar 5000 rpm'de 5 dakika santrifülenerek yıkama yapılmıştır. Santrifüj sonrası supernatantın UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri 0.05'in altına düşene kadar yıkama işlemine devam edilmiştir. Bu değere ulaşıncaya partiküller son kez santrifüjlenerek supernatant kısmı hiç sıvı kalmayacak şekilde dökülmüştür. Partiküller BSA ile etkileştirilmek için beklemeye alınmıştır.

100 mL'lik adsorpsiyon şişesine eklenen 65 mL pH 5 asetat tamponu üzerine 0.78 g BSA tartılmıştır. Böylece adsorpsiyon şişesinden alınan 5., 10., 15., 20., 30., 45., 60., 90., 105., 120., 150. ve 180. dakikalarda alınan 5 mL örneğin 12 mg BSA/mL BSA derişiminde sabit kalması sağlanmıştır. BSA çözeltisinin manyetik karıştırıcıda yaklaşık 15 dakika bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edilmiştir. 65 mL çözeltiden 5 mL alınarak UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Ölçüm yapılan değer A_0 olarak kaydedilmiştir. Adsorpsiyon şişesinde kalan 60 mL'lik tampon çözelti ile 0.6 g partikül etkileştirilmiş ve daha sonra pH kontrolü yapılmıştır. pH değerinde farklılık olan örneğin pH'ı asetik asit veya NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGA) partikülleri için hazırlanan örnekler manyetik karıştırıcıda toplamda 3 saat süre için karıştırılmaya başlatılmıştır. 5., 10., 15., 20., 30., 45., 60., 90., 105., 120., 150. ve 180. dakika bitimlerinde her bir örnek santrifüjlenerek, supernatantlarının absorbans değerleri

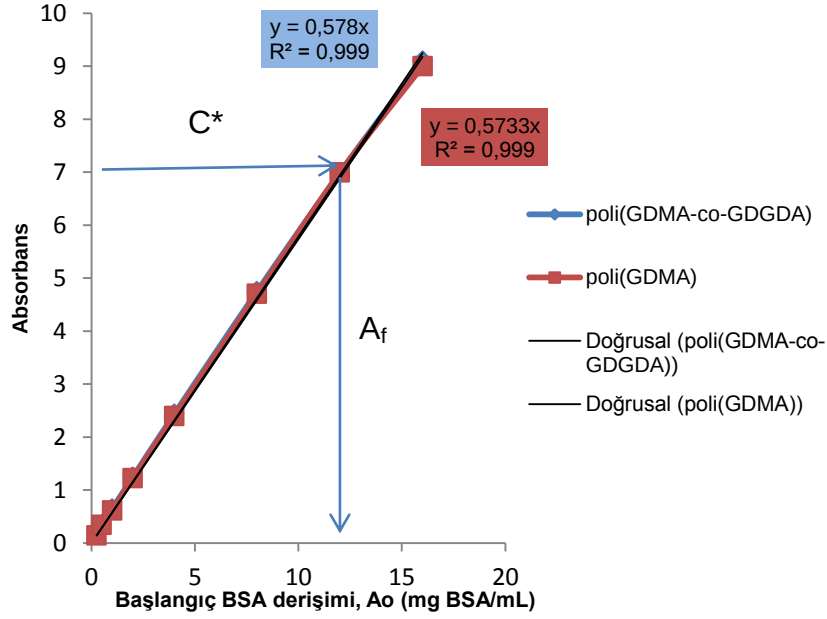
UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Farklı zamanlarda ölçüm yapılan değerler A_{λ} olarak kaydedilmiştir. Okunan absorpsiyon değerlerinin 2'nin üzerine çıkması durumunda 1/5 oranında seyreltme yapılmıştır.

Eşitlik 3.1'e göre; 5., 10., 15., 20., 30., 45., 60., 90., 105., 120., 150. ve 180. dakikalarda BSA derişimi (C) 12 mg/mL, çözelti hacmi (V) 5 mL, partikül miktarı (m) 0.05 g alınan deneysel veriler ile adsorpsiyon kapasite (Q) değerleri hesaplanmıştır. 12 zaman aralığı değerlerine karşı Q değerleri grafiğe geçirilmiştir.

3.3.8. Desorpsiyon

Albümin adsorpsiyonuna pH etkisinin incelenmesi çalışmasında poli(GDMA) için pH 8 ve poli(GDMA-co-GDGDGA) için ise pH 7 ortamındaki adsorpsiyon kapasitesinin 0 değerine çok yakın olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle desorpsiyon çalışmaları poli(GDMA) için pH 8 HEPES ve poli(GDMA-co-GDGDGA) için ise pH 7 fosfat tampon çözeltisi ile yapılmıştır. Daha önceden başlangıç protein derişimi etkisinin incelenmesi (Bölüm 3.3.5.) çalışmalarından kalan belli miktardaki BSA'yı adsorplamış poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülleri kullanılmıştır. Kalan partikülleri tampon çözelti ortamından tamamen ayırmak için 5000 rpm hızında 6 dakika boyunca santrifüjlenmiştir ve supernatant hiç sıvı kalmayacak şekilde partiküllerden uzaklaştırılmıştır. Poli(GDMA) partikülünün üzerine Bölüm 3.3.2(c)'de anlatılan 250 mL'lik HEPES tamponu içerisinde 1 M sodyum klorür (NaCl) olacak şekilde NaCl tuzu eklenmiştir. Proteinin sulu ortamındaki çözünürlüğünü tuz derişimi etkileyen bir faktördür. Yüksek derişimli tuz, kendi hidratasyonu için ortamdaki suyu tutar, proteinin çözüneceği ortam azalır, proteinin çözünürlüğü azalır ve yüksek tuz derişimi tarafından hidratasyon kabuğu uzaklaştırılan protein, çöker. NaCl tuzu çözeltide iyonik şiddeti arttırdığından albümin adsorpsiyon kapasitesini düşürerek tampon çözelti ortamına desorplanmasını kolaylaştırdığı için kullanılmıştır. Poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülü için pH 7 fosfat tamponu kullanılmıştır. Bu tampon çözeltilerden daha önceden 0.25-16 mg/mL aralığında BSA derişiminde adsorpsiyon çalışması yapılan partiküllere 5 mL eklenerek çöktürme yapılan tüplerden toplanmış, her bir partikül için 8 adet adsorpsiyon şişelerine aktarılmış ve pH değerleri kontrol edilmiştir.

Poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri için hazırlanan örnekler manyetik karıştırıcıda 1 saat süreyle karıştırılmıştır. Süre bitiminde her bir örnek santrifüjlenerek, supernatantlarının absorbans değerleri UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Farklı protein derişiminde ölçüm yapılan değerler A_f olarak kaydedilmiştir. Okunan absorbans değerlerinin 2'nin üzerine çıkması durumunda 1/5 oranında seyreltme yapılmıştır.



Şekil 3.6. Başlangıç BSA derişiminin kalibrasyon grafiğı

Şekil 3.6'da verilen kalibrasyon grafiğınden desorpsiyon sonrası okuduğumuz A_f değerine karşı C^* değerini bulunması için öncelikle grafiğın denkleminde eğimi hesaplanmıştır. Daha sonra partiküllerin içine adsorplanan BSA'nın, desorpsiyon sonrası tampon çözelti ortamına geçtiğı BSA derişimi $C^* = \text{Eğim} / A_f$ formülü yardımıyla bulunmuştur. % desorsiyon aşağıda verilen eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır. Bu eşitlik;

$$\% \text{ desorpsiyon} = \frac{\text{mg desorplanma}}{\text{mg adsorplanma}} \cdot 100 \quad (3.2)$$

$$\% \text{ desorplanma} = \frac{C^* \cdot V}{Q \cdot m} \cdot 100 = \frac{A_f / \text{eğim} \cdot V}{Q \cdot m} \cdot 100 \quad (3.3)$$

şeklinde olup. burada;

Q : Adsorpsiyon kapasitesini (mg BSA / g partikül)

C*: Desorplanan BSA derişimini (mg BSA/ mL tampon çözelti)

V : Toplam çözelti hacmini (mL)

m : partikül miktarını (g) ifade etmektedir.

Eşitlik 3.3'deki formülde; başlangıç protein etkisindeki adsorpsiyon kapasitesi (Q), desorplanan BSA derişimi C*, toplam çözelti hacmi (V) 5 mL, partikül miktarı (m) 0.05 g deneysel veriler ile hesaplanan % desorpsiyon değerlerine karşı başlangıç BSA derişimi 0.25-16 mg BSA/mL tampon çözelti değerleri grafiğe geçirilmiştir.

3.4. Partiküller ile Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre etkileşim çalışmaları sırasında daha önce elde edilen poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGD) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGD) partikülleri ile alveolar makrofajlar, nötrofiller ve HeLa hücreleri belirli derişim ve zamanda etkileştirilmiştir. Aşağıda belirtilen sıraya göre deneysel çalışmalar yapılmıştır. Buna göre;

1. İlk olarak suyun içinde mm³ başına düşen partikül miktarı değerlerinin belirlenmesi için partikül sayımı yapılmış ve dağıtma ortamı içerisinde 20 000, 40 000, 80 000, 120 000 ve 160 000 partikül/5 µL derişiminde partiküller elde edilmiştir.
2. Sıçan alveolar makrofajları elde edilmiştir.
3. Daha sonra sıçandan nötrofil izolasyonu yapılmıştır.
4. Son olarak da elde edilen makrofajlar, nötrofil hücreleri ve HeLa hücreleri ile partiküller etkileştirilmiştir.

3.4.1. Partiküllerin sayımı

Sentezlenen üç farklı partikül (bkz. 3.4), hücreler ile etkileştirilmeden önce mm³ başına düşen partikül sayısını tespit edilmesi için ışık mikroskobu (Olympus, IX70 inverted mikroskop, Japonya) altında, Thoma Lamı (C.A. Hausser & Son, Phila., ABD) ile sayımı yapılmıştır. Thoma lamının çukur kısmına partiküller aktarılıp üzerine lamel kapatıldığında bu çukurda 0.1 mm yüksekliğinde sıvı kalmaktadır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlendikten sonra 1 mm²'lik sayma alanı ve 0.1 mm çukurda kalan partikül miktarı mikroskopta sayılarak hacim

başına düşen partikül miktarı bulunmuştur. Deney için gerekli derişimleri belirlendikten sonra poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri için 5 µL fosfat tamponu içerisinde 20 000, 40 000, 80 000, 120 000 ve 160 000 partikül olacak şekilde dağıtılmıştır. Poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) ise agregasyonun önlenmesi ve hücrelere morfolojik olarak zarar vermediği gözlenen konsantrasyonda, 5 µL %0.025 CTAB çözeltisi içerisinde yine 20 000, 40 000, 80 000, 120 000 ve 160 000 partikül olacak şekilde dağıtılarak her bir partikül makrofaj, nötrofil ve kanser hücreleri ile etkileştirilmiştir. Hazırlanan partiküllerin sterilizasyonu 121°C ve 1 atm çalışma koşullarındaki otoklav (All-American Electronic steam Sterilizer 25X) cihazı ile yapılmıştır.

3.4.2. Partiküllerin makrofaj, nötrofil ve kanser hücreleri ile etkileştirilmesi

3.4.2.1. Materyal

Sıçan akciğerlerinden alveolar makrofaj hücrelerinin izolasyonu sırasında sıçana operasyon öncesi bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla intraperitoneal (IP) olarak Deposilin 6.3.3 (İ.E Ulagay, İstanbul), anestezi amacıyla intramüsküler (IM) olarak ketasol %10 (Richter Pharma, Avusturya) ve Alfazyn %2 (Alfasan International, AB, Hollanda) verilmiştir. Sıçan akciğer sıvısından makrofajların toplanması sırasında ise %8 Penisilin-streptomisin (İ.E Ulugay, İstanbul) ve fosfat tamponu (Bichrom AG, Berlin) kullanılmıştır. Makrofajlar kültür kabına, DMEM/F12 (Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum, Biochrom AG, Berlin), %8 penisilin-streptomisin (Biochrom AG, Almanya) ve %10 FBS (Fetal sığır serumu, Sigma Aldrich, Almanya) çözeltisi besiyeri olarak eklenmiştir. Partikülleri boyama işleminde ise Giemsa boyası (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Partiküller ile etkileştirilen HeLa hücreleri ile hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce steril trimetil amonyum bromür (CTAB, Riedel-de Haën, Almanya) kullanılmıştır.

3.4.2.2. Makrofaj hücreleri ile etkileşim

Hücre etkileşim çalışmalarında 300 g'lık erkek Albino Wistar sıçan kullanılmıştır. Alveoler makrofaj hücrelerinin izolasyonundan bir saat önce sıçana bakteri kontaminasyonunu önlemek amacıyla antibiyotik olarak Deposilin 6.3.3 verilmiştir (IP) (1 kg penisilin/kg sıçan). Cerrahi müdahaleye başlamadan önce ketasol %10(kas gevşetici) ve Alfazyn %2 ile anestezi uygulanmıştır (IM). Sıçan anestezi

altına alındıktan sonra ameliyat masası üzerine sırtüstü yatırılarak bacaklarından sabitlenmiştir. İntratrakeal katater ile akciğer içerisine 10 mL steril %8 Penisilin-streptomisinli PBS (Fosfat tamponu solüsyonu) 5 mL'lik enjektör ile trakeden enjekte edilmiştir ve beş yıkama ile akciğer makrofajları nazikçe toplanmıştır. Elde edilen içerisinde makrofajların da bulunduğu sıvı 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, oluşan supernatant atılmıştır. Çöken kısım PBS ile yıkanarak tekrar aynı işlem uygulanmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarında polistiren özellikteki 96 kuyucuklu kültür kabı kullanılmıştır. Kültür kabının 80 kuyucuğuna ekim yapabilmek için toplam 8 mL DMEM-F12, %10 FBS (Fetal sığır serumu) ve %8 penisilin-streptomisin besi ortamı makrofaj hücreleri ile karıştırılmış ve böylece 80 kuyucuğun her birine toplam hacmi 200 µL olacak şekilde yaklaşık 96 000 hücre ekimi yapılmıştır. Her bir kuyucuk için makrofaj hücreleri eşit sayıda dağıtılmıştır (96 000/100µL). 37°C ve %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat hücrelerin ortama tutunmaları ve ortamda dağılmaları amacıyla inkübe edildikten sonra üzerlerine farklı derişimlerde partiküllerden (bkz. 3.4.1) 5µL eklenmiştir. Kültür kabı etüvde bekletilerek 10., 20., 30., 60. ve 120. dakika sonlarında örnek kuyucuk yüzeyindeki besiyeri nazikçe alınmış ve her kuyucuğa ayrı ayrı 0.5 mL metanol eklenerek 4 dakika fiksasyon için bekletilmiştir. Metanol ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 40 dakika giemsa ile boyanarak 40. dakikanın sonunda 2 dakika süre ile nazikçe distile su ile yıkama işlemi yapılmıştır ve böylece boya artıkları uzaklaştırılmıştır. 400 kat büyütme altında çekirdekleri boyanmış hücreler tanımlanarak, sitoplazma içerisinde görülen partiküllerin sayımı yapılmıştır. Kuyucukların içinde yüzeye yapışmış olan hücrelerin üzerindeki partiküller yıkanarak uzaklaştırılmış ve 400 kat büyütme inverted faz kontrast mikroskop ile görüntüleri alınarak sayım yapılmıştır. Sonuç olarak bu çalışma üç farklı partikül için 5 farklı zamanda ve 5 farklı derişimde makrofajların fagositik aktivitesi incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Hücre içine giriş yetenekleri sayıca hesaplanmıştır.

3.4.2.3. Nötrofil hücreleri ile etkileşim

Periferik sıçan kanından nötrofillerin izolasyonu ve eritrositlerin uzaklaştırılması için ficoll (Biochrom, Germany) ile yoğunluğa bağlı çöktürme yöntemi kullanılmıştır.

Anestezi altında intrakardiyak (kalp içinden) olarak 10 mL heparinli kan alındıktan sonra eşit hacimli ficoll üzerine kan aktarılmış ve 2000 rpm'de 10 dakika gradient oluşumu için santrifüjlenerek tabaka içinden (ficoll altı eritrosit üzeri) lökositler toplanmıştır. Alınan tabaka ile aynı miktarda PBS eklenip 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek ficoll nütrofillerden uzaklaştırılmış ve çöken nütrofiller DMEM-F12, %10 FBS ile her bir kuyuğun hacmi toplamda 200 µL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa yaklaşık 107 000 nütrofil hücresi ekilmiştir. 80 kuyucuk için de aynı işlemler uygulandıktan sonra 60 dakika süre ile etüvde bekletilmiştir. Süre sonunda içinde daha önceden hazırlanan belirli derişimdeki 5 µL stok partikül çözeltisinden (bkz. 3.4.1) üzerine eklenmiş ve her 10., 20., 30., 60. ve 120. dakika sonunda örnek yüzeyden kaldırılarak 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip 96 kuyucuklu kültür kabına aktarılmıştır. Kuruduktan sonra 4 ml metanol 4 dakika fiksasyon için bekletilmiş ve 40 dakika giemsa boyası ile etkileştirilmiştir. 40. dakikanın sonunda boyanın uzaklaştırılması için 2 dakika süre ile nazikçe distile su ile yıkanmış ve 400 büyütme altında çekirdekleri boyanmış hücreler tanımlanarak, sitoplazma içerisinde görülen partiküllerin sayımı yapılmıştır. Sonuç olarak bu çalışma üç farklı partikül için 5 farklı zamanda ve 5 farklı derişimde nütrofillerin fagositik aktivitesi incelenmesi amacıyla yapılmıştır.

3.4.2.4. Kanseri hücreleri ile etkileşim

Yapılan çalışmalarda kanser hücresi olarak HeLa hücreleri kullanılmıştır. Şap Enstitüsü'nden temin edilen HeLa hücreleri 1951 yılında rahim ağzı epitel hücreli kanser hastasından izole edilmiş olup halen günümüzde kültür ortamlarında üretilebilen en iyi tanımlanmış, özellikleri bilinen hücre hatlarındandır. Bu çalışmada kanser hücresi olarak HeLa hücrelerinin seçilmesinin en önemli nedeni kolay çoğaltılabilir ve insan kaynaklı olmalarıdır. 96 kuyucuklu kültür kabında her bir kuyucuğa DMEM-F12, %10 FBS (Fetal sığır serumu) ve %8 penisilin-streptomisin besi ortamına yaklaşık 2000 HeLa hücresi 37°C ve %5 CO₂ içeren koşullarda 24 saat inkübe edilmiştir. Kültüre edilmiş her bir kuyucuktaki HeLa hücrelerinin üzerine farklı derişimlerdeki stok partikül çözeltisinden (bkz. 3.4.1) 5µL eklenmiştir. 96 kuyucuklu kültür kabı etüvde bekletilerek 6. saat, 24. saat ve 48. saat sonlarında örnek kuyucuk yüzeyindeki besiyeri nazikçe alınmıştır ve kuyucukların içinde yüzeye yapışmış olan hücrelerin üzerindeki partiküllerin

fotoğrafları optik mikroskop ile 400 büyütmede çekilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma üç farklı zamanda ve 5 farklı derişimde üç farklı partikül için HeLa hücrelerinin yüzeyine tutunmasını gözlemlenmesi amacıyla yapılmıştır.

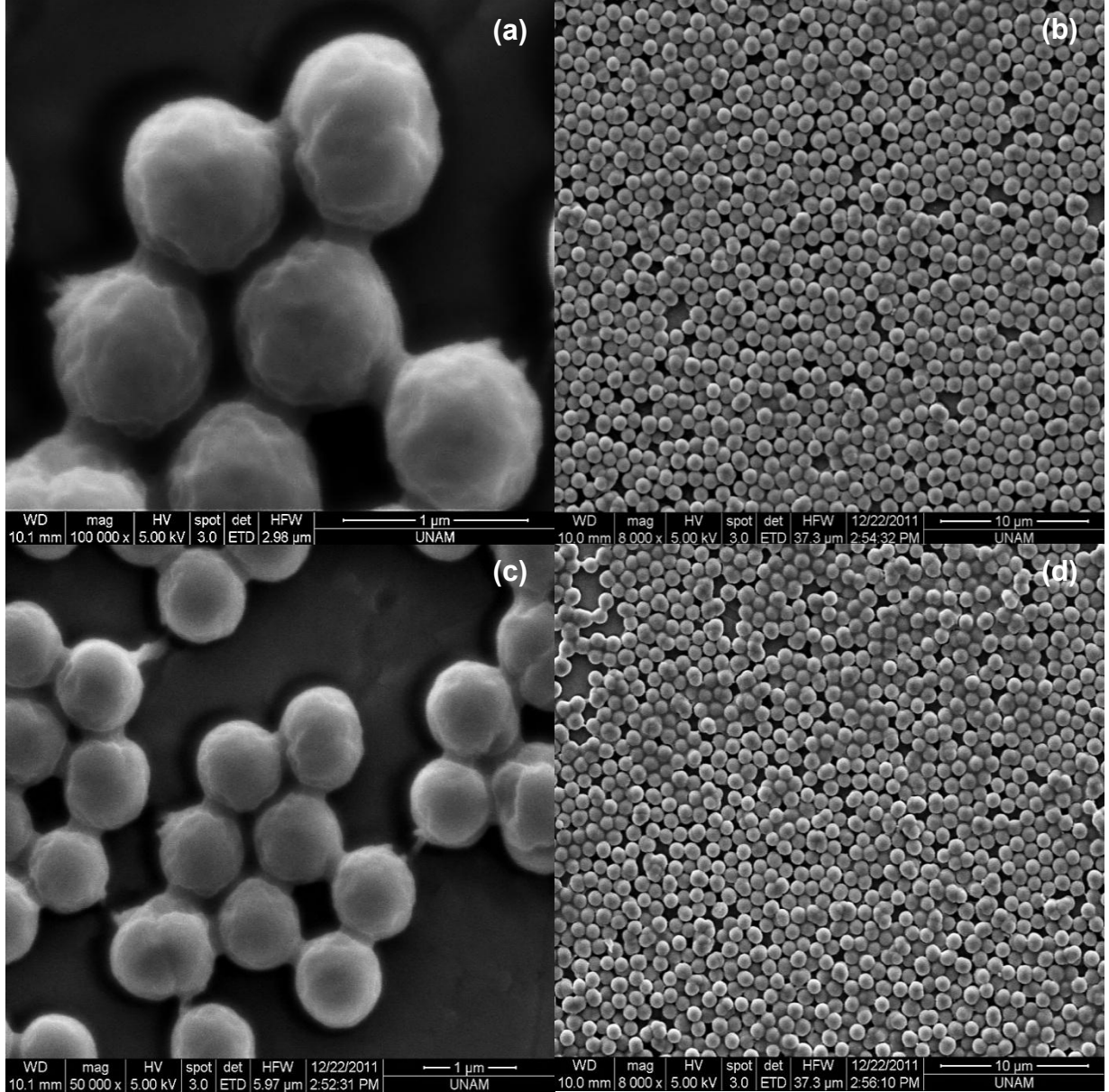
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Monodispers Polimerik Partiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

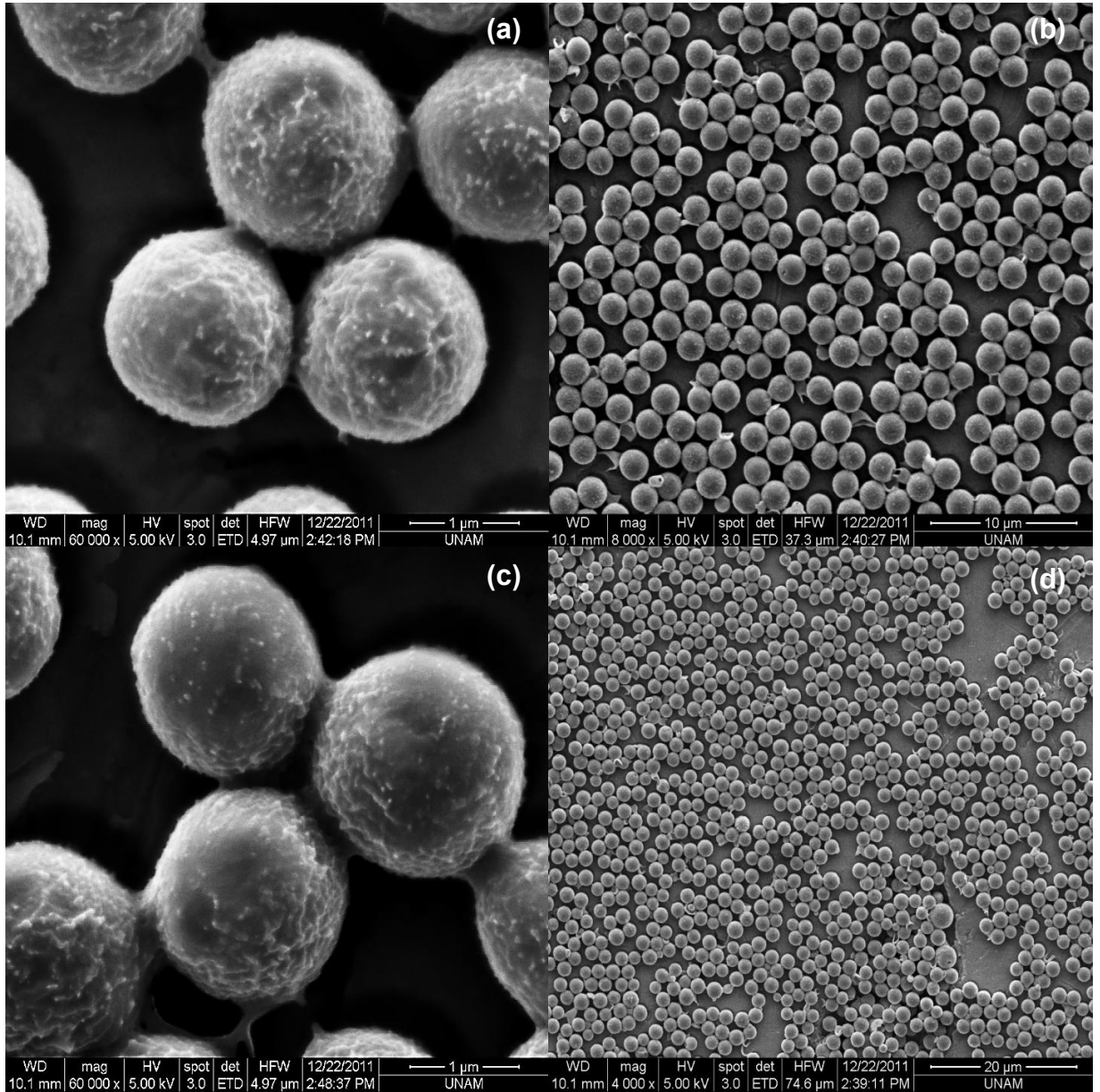
4.1.1. Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

4.1.1.1. Ortalama boy ve yüzey morfolojisinin SEM ile analizi

Farklı yöntemlerle sentezlenen partiküllerin boy dağılımı ve yüzey morfolojisini gösteren SEM görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de incelenmiştir.

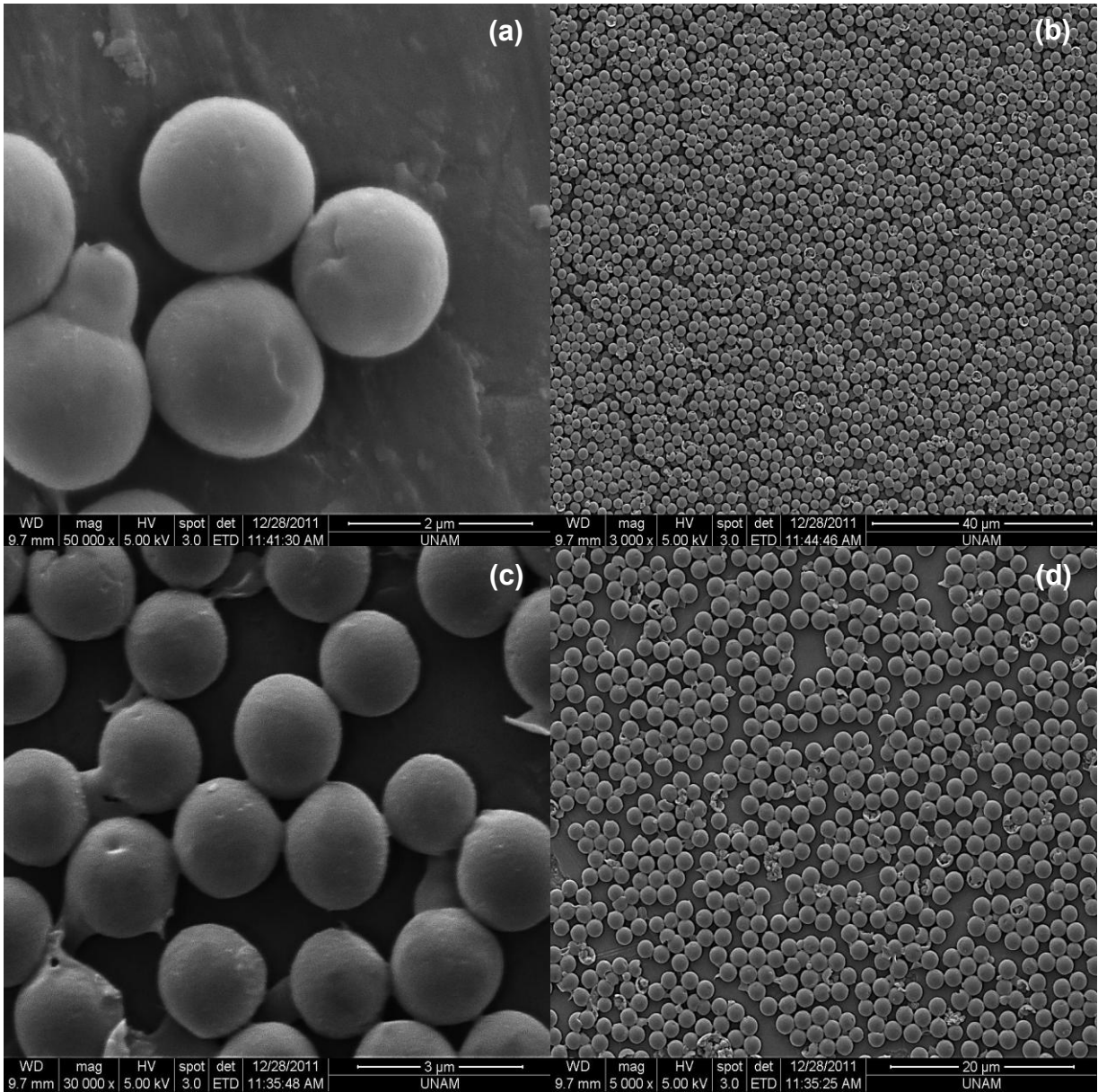


Şekil 4.1. Poli(GDMA) partikülünün SEM görüntüleri (a) X100 000, (b) X8 000, (c) X50 000, (d) X8 000



Şekil 4.2. Poli(GDMA-co-GDGD) partikülünün SEM görüntüleri (a) X60 000, (b) X8 000, (c) X60 000, (d) X4 000

Şekil 4.1(d), Şekil 4.2(d) ve Şekil 4.3(d)'deki SEM görüntülerinden ortalama 150 partikül sayılarak partikül boyutu ve boy dağılımı için yüzde değişim katsayısı (%CV) hesaplanmıştır. Üç farklı partikülün de ortalama partikül boyutu ve boy dağılımını gösteren değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGD) partikülünün SEM görüntüleri (a) X50 000, (b) X3 000, (c) X30 000, (d) X5 000

SEM fotoğraflarından, poli(GDMA-co-GDGD) partikülünün, poli(DMAEM) bağlı olan partikülüne göre daha gözenekli olması DMAEM'in yüzey gözenekliliğini azaltıcı yönde etki yapması ile açıklanabilir. Poli(GDMA) partikülünün ise daha sıkı bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Polimerik partiküllerin ortalama partikül boyutu ve değişim katsayısı değerleri

Partikül	Ort. Partikül Boyutu (μm)	Değişim Katsayısı (%CV)
Poli(GDMA)	0.96	4.62
Poli(GDMA-co-GDGDA)	1.87	5.29
Poli(DMAEM) bağlı Poli(GDMA-co-GDGDA)	1.69	5.15

Sentezlenen bütün partiküller içinde poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü 1.87 μm ortalama partikül boyutu ile en yüksek değere sahiptir. Bu sonucu sırasıyla 1.69 μm ile poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) ve 0.96 μm ile poli(GDMA) partikülü izlemiştir. Değişim katsayısı değerlerinin % 5 civarında olması bütün partiküllerin monodispers olduğu göstergesidir.

4.1.1.2. BET ölçüm cihazı ile yüzey alanı ve gözeneklilik analizi

Sentezlenen polimerik partiküllerin BET cihazı kullanılarak elde edilen yüzey alanları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Polimerik partiküllerin SEM cihazı ile elde edilen görüntülerinden de anlaşılabacağı gibi gözenek boyutu en büyük olan poli(GDMA-co-GDGDA) partikülüdür ve en küçük olan ise poli(GDMA) partikülüdür. BET analizi sonuçlarına göre yüzey alanı en yüksek olan partikülün gözenek boyutunun en küçük olması beklenmektedir. Beklenildiği gibi poli(GDMA) yüzey alanı en yüksek ve dolayısıyla gözenek boyutu en küçük olan partiküldür. Gözenek boyutu en büyük olan ise poli(GDMA-co-GDGDA) partikülüdür. Bu durumda BET analizi ile SEM görüntüleri uyumlu sonuçlar vermiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen polimerik partiküllerin BET cihazı kullanılarak belirlenen yüzey alanları

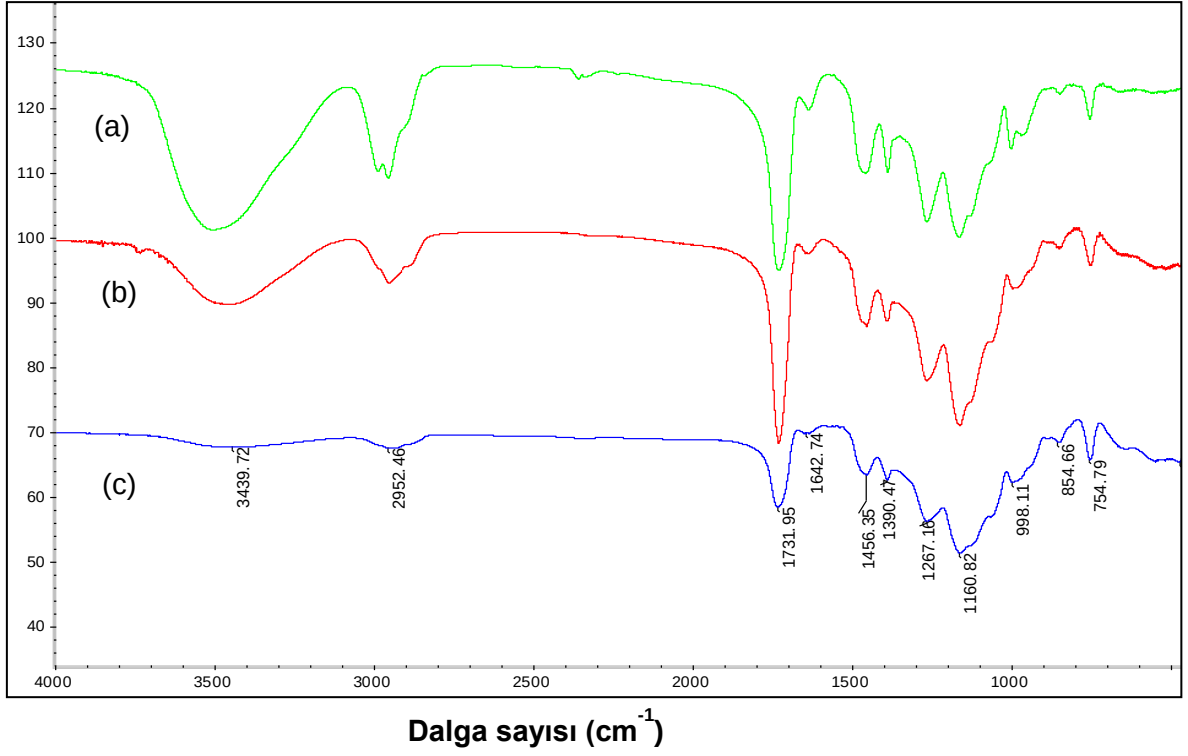
Polimerik Partikül	Yüzey Alanı (m ² /g)
Poli(GDMA)	21.35 m ² /g
Poli(GDMA-co-GDGDA)	10.95 m ² /g
poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA)	20.16 m ² /g

Partikül yüzeyinin düzgün bir yapıya sahip olmaması yüzey alanını arttıran bir faktördür. Bu durum polimerik partiküllerin adsorpsiyon uygulamaları için bir avantaj oluşturmaktadır. Yapıdaki gözenekler polimerik yapının yüksek gözenek alanına sahip olmasına neden olurlar. Yüzey alanının artmasıyla kütle aktarımını zorlaştıran yüzey ve gözenek difüzyon dirençleri azalmakta ve kütle aktarımı kolaylaşmaktadır.

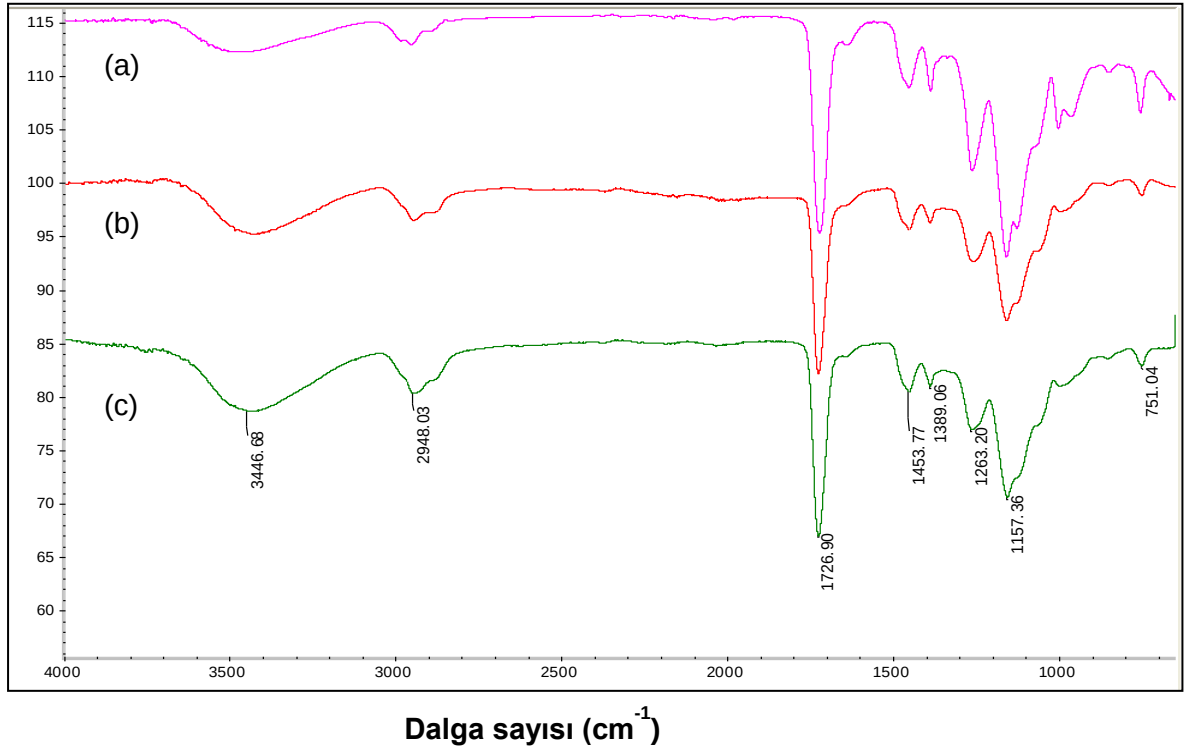
4.1.2. Yapısal özelliklerinin belirlenmesi

4.1.2.1. FTIR spektroskopisi

Eş boyutlu polimerik partiküllerin FTIR ve FTIR-ATR spektrumları yığın ve yüzey yapısının birbirine benzer olduğu Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'den görülmektedir. Ayrıca sentezlenen partiküllerin yığın ve yüzey FTIR spektrumları Çizelge 4.3'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Çizelge 4.3'deki sonuçlara göre partiküllerin yığın ve yüzey FTIR spektrumunda dalga sayısı yaklaşık 3500 cm⁻¹'de hidroksil (-OH) bandı gözlenmektedir. Bu band poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri için yığın yapılarında bulunan sırasıyla GDMA ve GDMA-GDGDA'dan kaynaklanmaktadır. Partiküllerin gerek yüzey gerek yığın yapıları için dalga sayısı yaklaşık 1730 cm⁻¹'de (Çizelge 4.3) yer alan güçlü karbonil (-C=O) bandları görülmektedir. Şekil 4.4 ve 4.5 'deki her iki spektrumda da dalga sayısı 2950 cm⁻¹ olan (Çizelge 4.3.) -C-H ve dalga sayısı 1150 cm⁻¹ olan (Çizelge 4.3) -C-O- gerilimlerine ait bandlar görülmektedir.



Şekil 4.4. Polimerik partiküllerin yığın FTIR spektrumları (a) poli(GDMA), (b) poli(GDMA-co-GDGDA), (c) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA)



Şekil 4.5. Polimerik partiküllerin yüzey FTIR spektrumları (a) poli(GDMA), (b) poli(GDMA-co-GDGDA), (c) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA)

Çizelge 4.3. Polimerik partiküllerin yığın ve yüzey FTIR spektrum değerleri (a) poli(GDMA), (b) poli(GDMA-co-GDGDA), (c) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA)

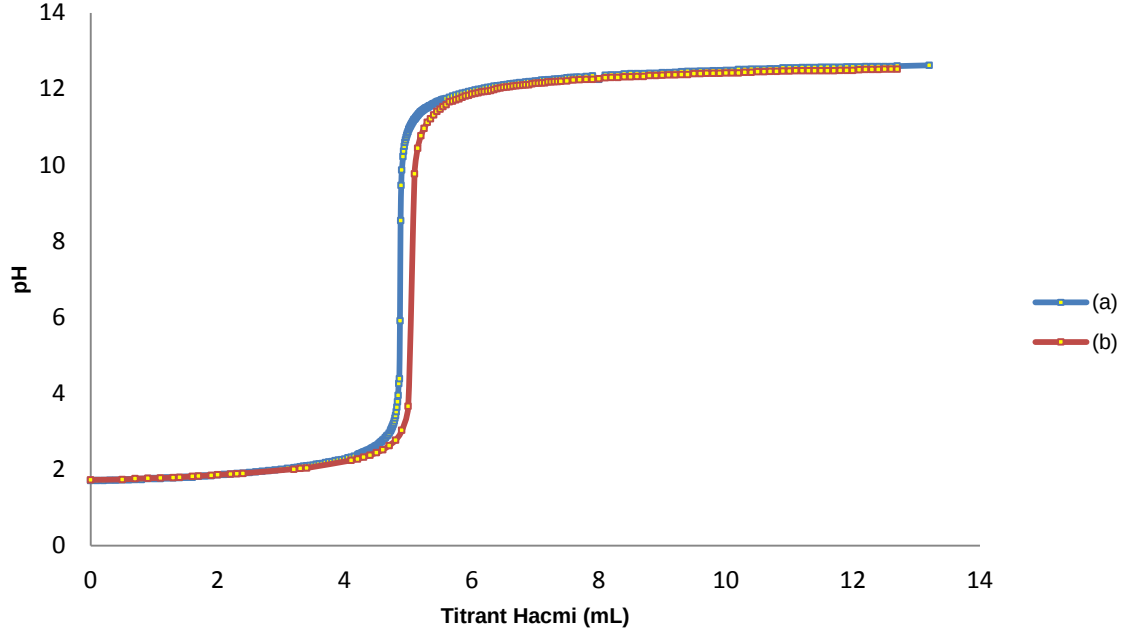
Titreşim Türü	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)					
	Yığın			Yüzey		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
-OH gerilimi	3501.47	3445.78	3439.66	3502.32	3437.24	3446.68
-C-H gerilimi	2955.94	2953.06	2952.43	2953.56	2946.46	2948.03
-C=O gerilimi	1732.01	1731.47	1737.95	1723.14	1726.92	1726.90
-C-O- gerilimi	1166.49	1164.39	1161.35	1159.44	1158.45	1157.36

4.1.2.2. Elemental analiz

Sentezlenen poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün yüzeyinin modifiye edilmesi amacıyla yapılan ATRP sonucunda kullanılan DMAEM'dan kaynaklanan azot içeriği belirlemek için elemental analiz yöntemi kullanılmıştır. Yüzeyi türevlendirilmemiş poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri yapısında azot bulunmamaktadır ve bu partiküllerin elemental analiz sonucuna göre de azot içeriği yoktur. Elemental analiz sonucu poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) polimerik partikülün yapısındaki azot miktarından yararlanarak ve stokiometrik oran gözetlenerek yapıya katılan DMAEM miktarı 29.2 mg DMAEM/g partikül olarak bulunmuştur.

4.1.2.3. Potansiyometrik titrasyon

Potansiyometrik titrasyon elemental analizi yapılan poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri için yapılmıştır. Bu partiküllerin yüzeyinde katyonik özellikteki amin grupları bulunmaktadır. Partikülün içerdiği amin grubu tayini amacıyla çizilen potansiyometrik titrasyon eğrileri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGA) partikülleri ile (a) etkileştirdikten sonra, (b) etkileştirmeden önce, HCl çözeltisinin potansiyometrik titrasyon eğrileri.

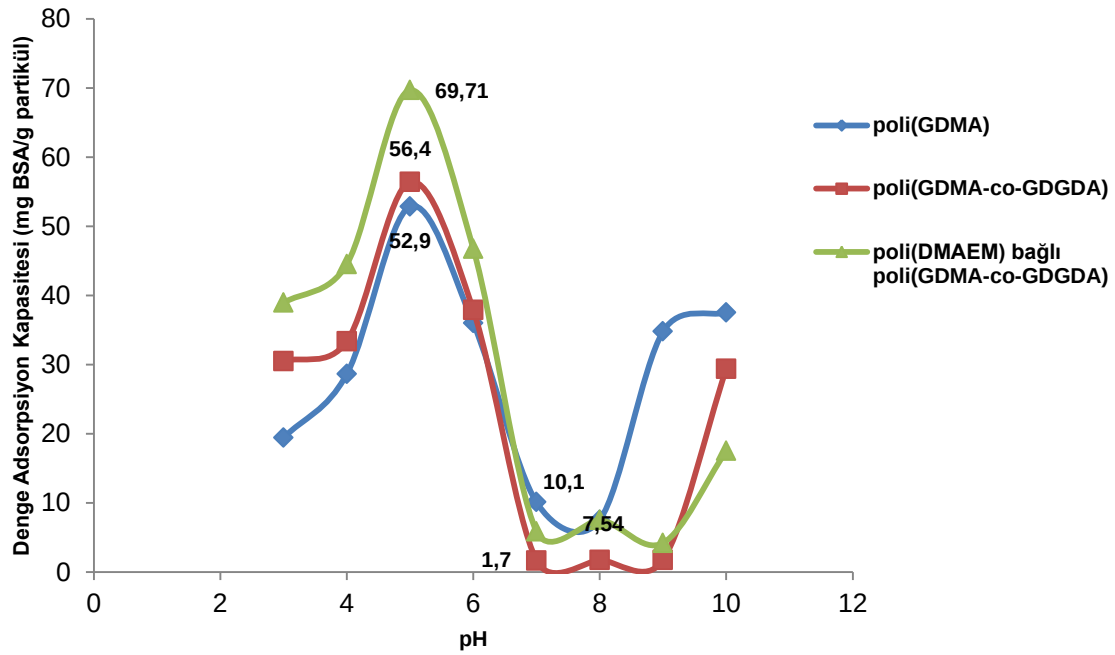
Elde edilen grafikler yardımıyla yapılan hesaplamalar sonucunda 1 g patikül içerisinde 25.2 mg DMAEM (0.16 mmol DMAEM/g partikül) dolayısıyla 0.16 mmol amin grubu bağlandığı görülmüştür.

4.2. Monodispers Polimerik Partiküller ile Protein Adsorpsiyonu Çalışmaları

Proteinlerin adsorpsiyonu katı-sıvı arayüzeylerinde gerçekleşmektedir. Bu işlem sırasında, protein büyüklüğü, şekli, adsorpsiyon ortamının pH'sı, partikülün yüzey yükü, yüzey topolojisi, fonksiyonel grup bağlarının gücü, protein çözeltisinin başlangıç derişimi, zaman gibi sayısız faktörlerden etkilenmektedir. Karışımdan hedeflenen protein molekülünün adsorpsiyonu yüzeye bağlanan madde miktarı, taşıyıcı materyalin yani partikülün kimyasal bileşimi ile doğrudan ilgilidir. Bu nedenle partikülün gözenekliliği, yüzey alanı yanında yapıdaki hidrofobik ve hidrofilik grupların varlığı da önemlidir. Polimerik partikülün gözenekli yapıda olması, albümin molekülü için yüksek erişim bölgeleri sağlayacağından partiküle ilgi göstermesi ile adsorpsiyon eğilimi ve kapasiteni artırarak önemli avantaj sağlar.

4.2.1. pH etkisi

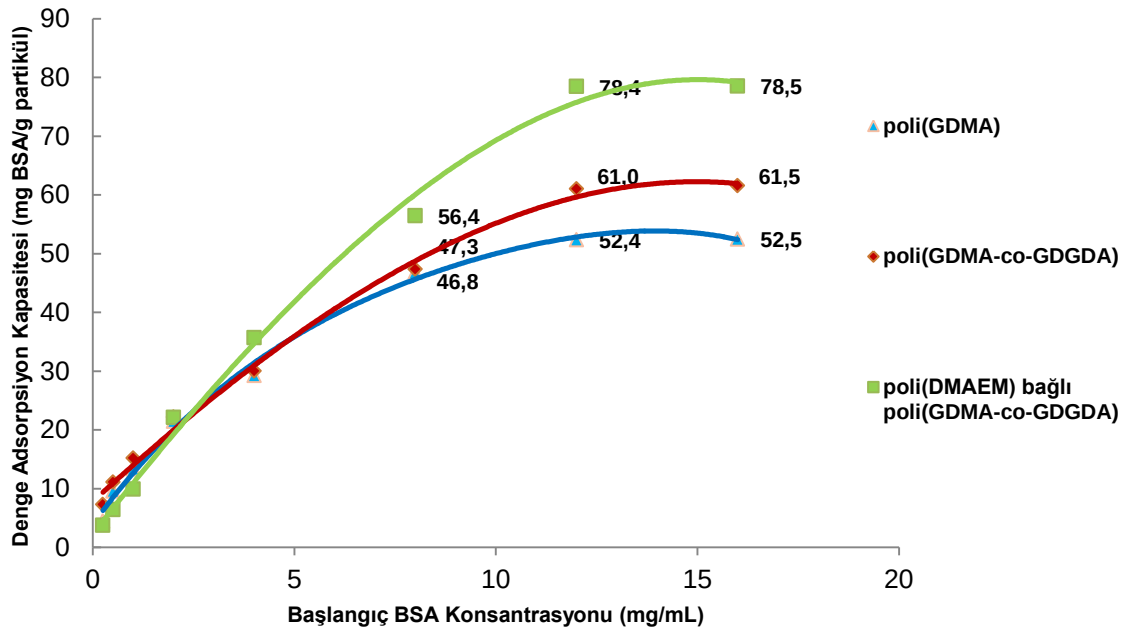
Adsorpsiyona etki eden en önemli parametrelerden birisi pH'tır. Ortamın asidik veya bazik olması adsorbanın yüzeyindeki tutunmayı sağlayan bölgelerin aktivitelerine etki eder; böylece adsorpsiyon kapasitesi değişir. pH etkisinde bazik bölgelerde aynı yük yoğunluğuna sahip ara yüzeydeki itme kuvvetlerinin baskın olması sonucunda adsorpsiyon kapasitesi önemli ölçüde azalmıştır. Bölüm 3.3.4'de anlatılan pH aralıklarında beklendiği gibi BSA'nın maksimum adsorbsiyon kapasitesi izoelektrik noktası olan pH 5 değerinde elde edilmiştir. Bu değer poli(GDMA) partikülü için 56.4 mg BSA/g partikül, poli(GDMA-co-GDGDA) için 52.9 mg BSA/ g partikül olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Diğer pH değerlerinde adsorpsiyonun daha düşük gözlenmesinin nedeni, eş yüklü gruplar arasındaki itmeler ve proteinin yüzeyinde pH'a bağlı olarak bazı konformasyonel değişimlerin gerçekleşmesi olabilir.



Şekil 4.7. BSA adsorpsiyonunda pH etkisi

4.2.2. Başlangıç protein derişimi etkisi

Şekil 4.8 başlangıç albümin derişiminin adsorpsiyon üzerine olan etkisini göstermektedir. Başlangıçta artan protein derişimi ile adsorpsiyon kapasitesi de artmış, poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri için sırasıyla 52.4, 61.0 ve 78.4 mg BSA/g partikül değerlerinden sonra partikülde bağlanma bölgelerinin doygunluğa ulaşması nedeniyle dengeye ulaşmıştır. Bu durum, partikül yapısındaki hidroksil ve amin grupları ile albümin molekülündeki amino asitlerin yan zincirleri arasındaki hidroforobik, elektrostatik ve hidrojen bağı etkileşimlerinin bir sonucudur.

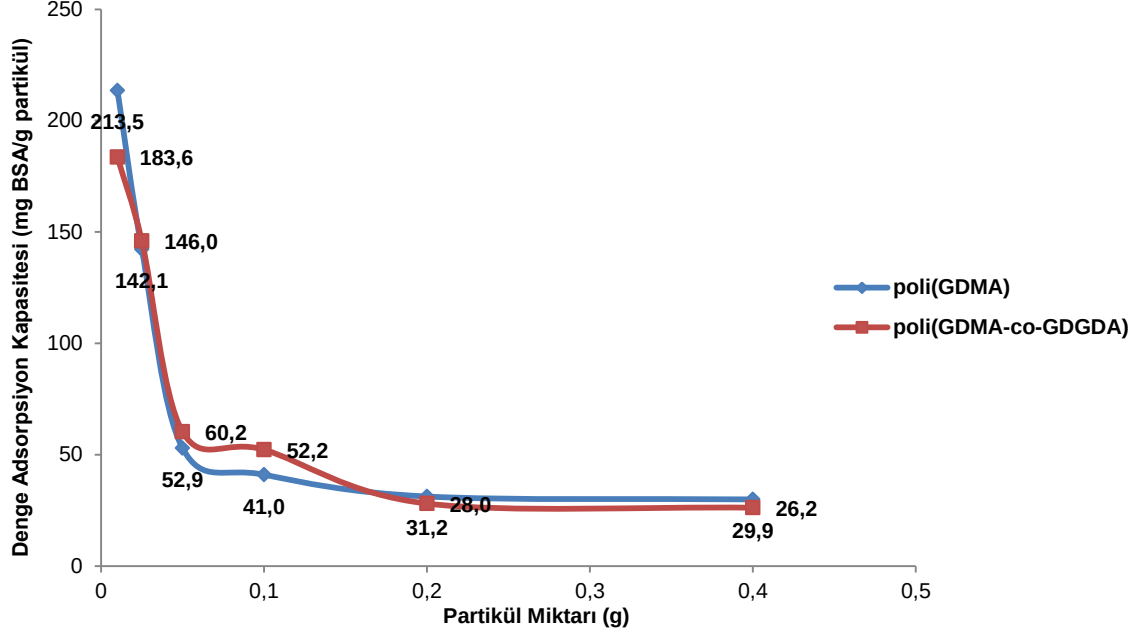


Şekil 4.8. Başlangıç BSA derişiminin adsorpsiyon üzerine olan etkisi

4.2.3. Partikül derişimi etkisi

Adsorpsiyon kapasitesinin BSA ile etkileşimde bulunan adsorbent miktarının artması ile azaldığı ve belirli bir değerde doygunluğa ulaştığı görülmüştür. Şekil 4.9'dan da görüldüğü gibi partikül derişimi düşük iken adsorplanan albümin miktarı daha fazladır. Bunun nedeni partikül başına düşen albümin derişiminin daha yüksek olması ile açıklanabilir. Partikül miktarının 0.05 g olduğu noktada ise poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin sırasıyla adsorpsiyon

kapasitesi değerleri 52.9 mg BSA/g partikül ve 60.2 mg BSA/g partikül değerindedir. Bu değerler yapılan pH etkisinde ve albümin derişimi etkisi çalışmalarında aynı koşullardaki (pH 5, 12 mg BSA/mL, 0.05 g partikül) değerleri ile uyumlu sonuçlar vermiştir.

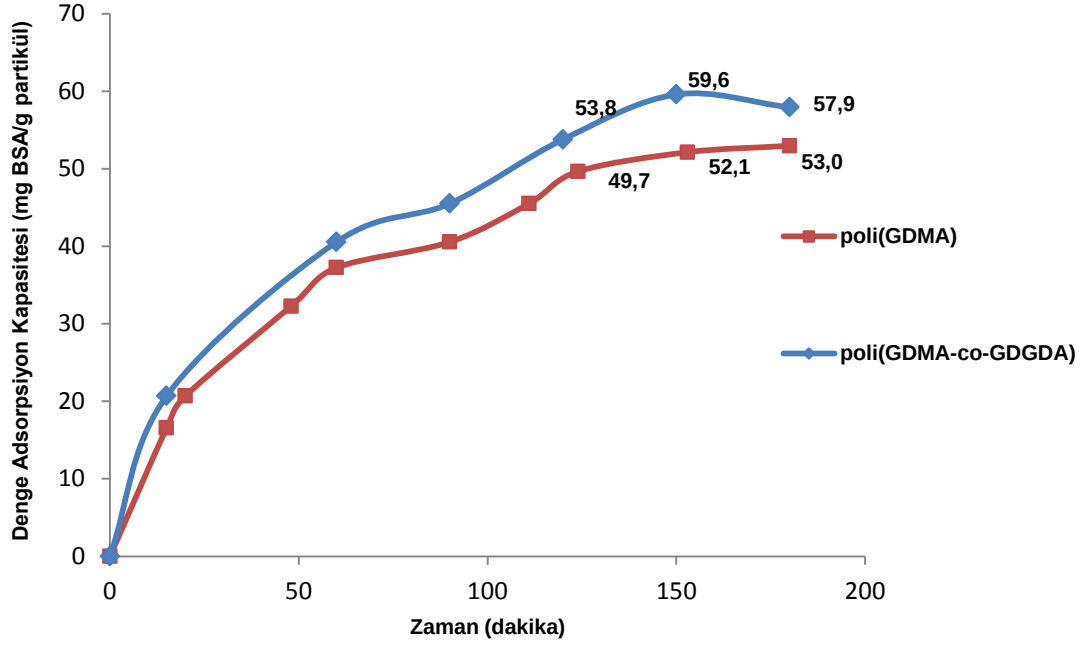


Şekil 4.9. BSA adsorpsiyonunda partikül derişimi etkisi

4.2.4. Adsorpsiyon hızı etkisi

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi ilk 60 dakikada adsorpsiyon hızlı gerçekleşmekte ve yaklaşık 180. dakikada dengeye ulaşmaktadır. Albümin moleküllerinin poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGA) partiküllerinin içine difüzyonu yavaş ve zor olduğundan adsorpsiyon yavaşlamaktadır. Adsorpsiyon dengesi albümin molekülleri ve partikül yapısındaki gözenekler arasındaki kompleksleşme ve geometrik yapı affinitesine bağlıdır. Albümin molekülleri için maksimum adsorpsiyon kapasitesi 120. dakikada platoya erişmiştir. Bu durum diğer denge adsorsiyon deneylerinde 2 saatlik süre seçiminin uygun olduğunu doğrulamaktadır. Poli(GDMA) partiküllerinin adsorpsiyon kapasitesinin daha düşük çıkması, yapısındaki hidroksil gruplarının daha az olması nedeniyle albümin moleküllerinin polimerik partiküle difüzyonu,

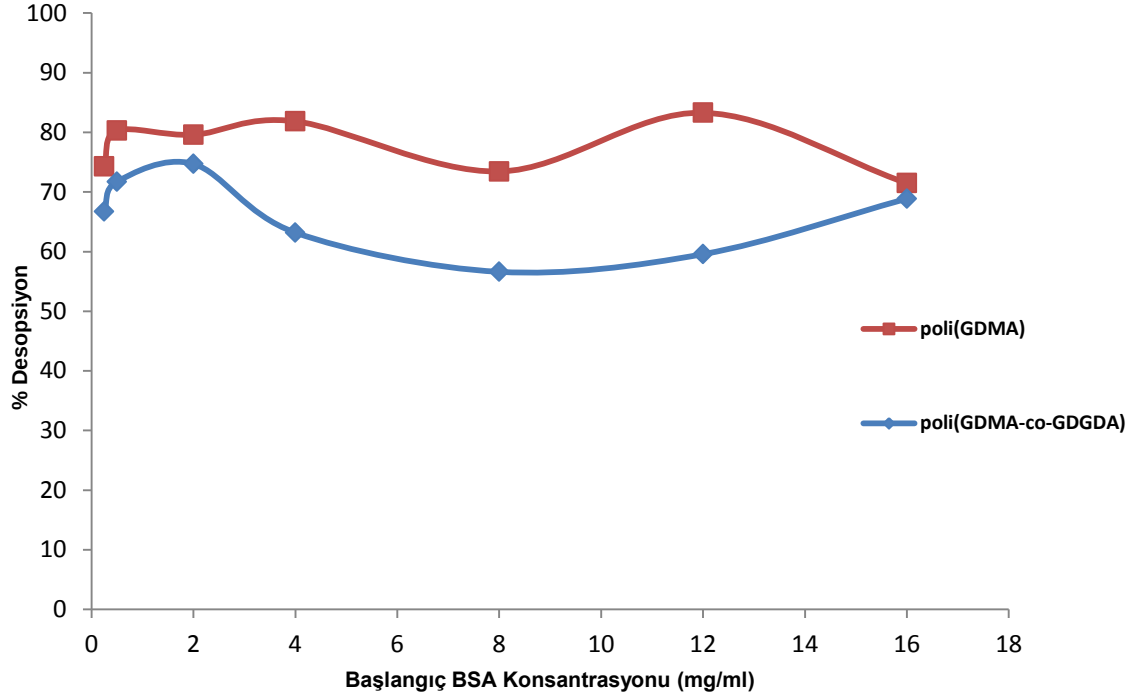
albümin ve partiküller arasındaki zayıf etkileşimlerle (van der waals ve hidrojen bağı) açıklanabilir.



Şekil 4.10. BSA adsorpsiyonunda zamanın etkisi

4.2.5. Desorpsiyon

Desorpsiyon çalışmaları partiküllerin kararlılığının anlaşılması ve desorpsiyon davranışlarını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Şekil 4.11’de poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGA) partikülün desorpsiyon davranışları görülmektedir. Grafik sonuçlarından da anlaşılacağı gibi poli(GDMA) partikülünün desorpsiyon yüzdesi daha fazladır. Bunun nedeninin kullanılan tampon çözeltideki tuz derişimi olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla poli(GDMA) partikülü için albümin desorpsiyonunda tampon çözelti içinde kullanılan tuz (NaCl) desorpsiyonu artırıcı etkide bulunmuştur sonucuna varabiliriz.



Şekil 4.11. BSA adsorpsiyonunda desorpsiyon

Tuz derişimi iyonik şiddeti arttırmakta ve dolayısıyla albümin ve partikül arasındaki bağlanmayı zayıflatmaktadır, bunun nedeni iki şekilde açıklanabilir; 1.tuz iyonları yük-yük etkileşimine girerek bağlanma bölgelerini maskeleymektedir, 2. İyonik şiddet arttıkça albümin ve partiküller arasındaki elektrostatik itmeler nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi azalmaktadır.

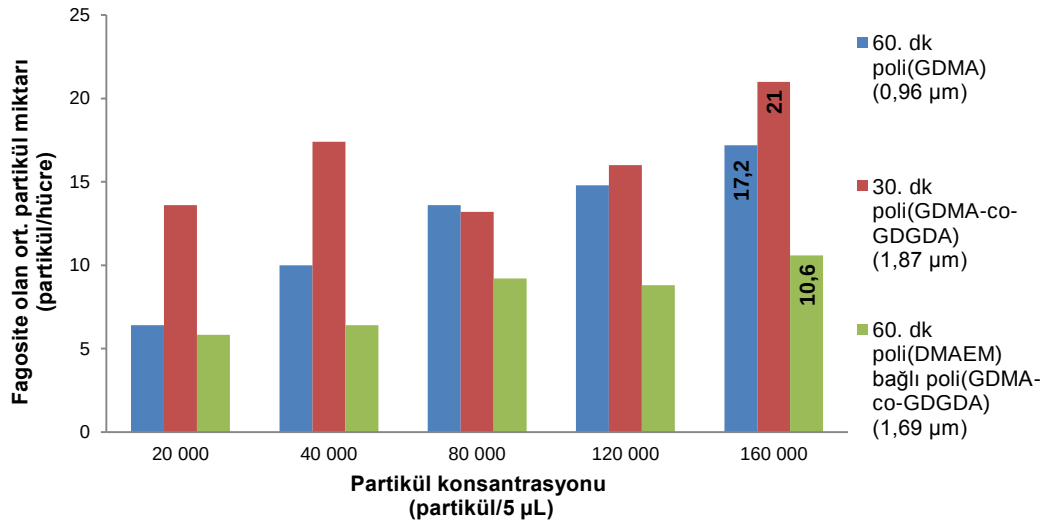
4.3 Partikül Hücre Etkileşim Çalışmaları

Hücre etkileşim çalışmaları sırasında kullanılan poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri makrofaj, nötrofil ve kanser hücreleri ile 20 000, 40 000, 80 000, 120 000 ve 160 000 partikül/ μ L tampon çözelti derişiminde etkileştirilmiştir. Yapılan çalışmalar makrofaj ve nötrofil hücreleri için 10., 20., 30., 60. ve 120. dakika, kanser hücreleri için ise 6., 24. ve 48. saat sonlarında fagositoz kapasitesi incelenmiştir. Makrofaj ve nötrofil hücreleri için fagositoz yapan hücrelerin içlerine aldıkları partikül miktarı optik mikroskop ile sayılarak, ortalaması zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. Daha sonra hücre-partikül etkileşimleri SEM cihazı ile görüntülenmiştir. HeLa

hücrelerinin ise optik mikroskop ile görüntüleri alınarak partiküller ile olan etkileşimleri incelenmiştir.

4.3.1. Makrofaj hücreleri ile etkileşim

Alveoler makrofaj hücrelerinin partiküller ile olan etkileşimleri optik mikroskop ile 400 büyütme ile incelenerek fagositoz yapan hücrelerin içlerine aldıkları partikül miktarı sayılmıştır ve ortalaması alınmıştır. Bu sayım farklı derişimlerdeki her bir partikül ve zaman aralıkları için yapılmış ve sonuçlar karşılaştırıldıktan sonra her bir partikül için optimum değerdeki hücre-partikül etkileşimlerinin taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır.



Şekil 4.12 Poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin makrofaj hücreleri ile etkileşimi sonucu sırasıyla 60., 30. ve 60. dakikada fagosite değerleri

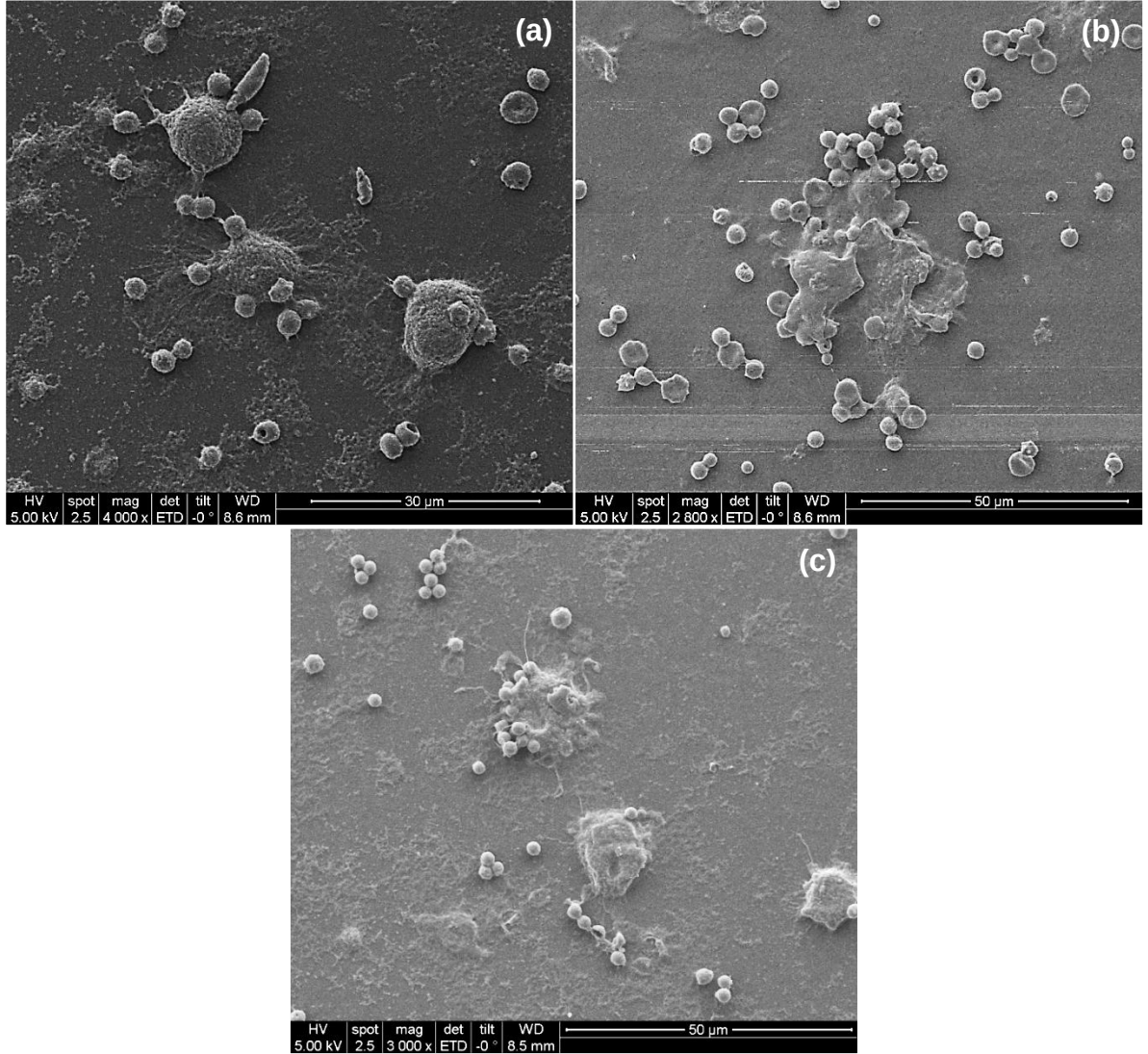
Şekil 4.12'den de görüldüğü gibi makrofaj hücrelerinin poli(GDMA) partikülünü fagosite ettiği miktar 60. dakikada ortalama 17.2 partikül/hücre olarak maksimum değerine ulaşmıştır. Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü 30. dakikada ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü için ise 60. dakikada sırasıyla ortalama 21 partikül/hücre ve 10.6 partikül/hücre olarak maksimum fagosite değerine ulaşmıştır. Elde edilen bu sonuçlara arasında karşılaştırma yapılacak olursa 30. dakikada en hızlı ve en fazla fagosite olan poli(GDMA-co-GDGDA) partikülüdür.

Çizelge 4.4. Makrofaj hücreleri ile partiküllerin etkileşim sonucu maksimum fagosite değerleri

Partikül	Partikül Boyutu (µm)	~96 000 Makrofaj Hücresi ile Etkileşim		
		<i>Partikül Derişimi (partikül)</i>	<i>Fagositoz Süresi</i>	<i>Fagositoz (partikül/hücre)</i>
Poli(GDMA)	0.96 µm	160 000	60. dk	17.2
Poli(GDMA-co-GDGDA)	1.87 µm	160 000	30. dk	21.0
Poli(DMAEM) bağlı Poli(GDMA-co-GDGDA)	1.69 µm	160 000	60. dk	10.6

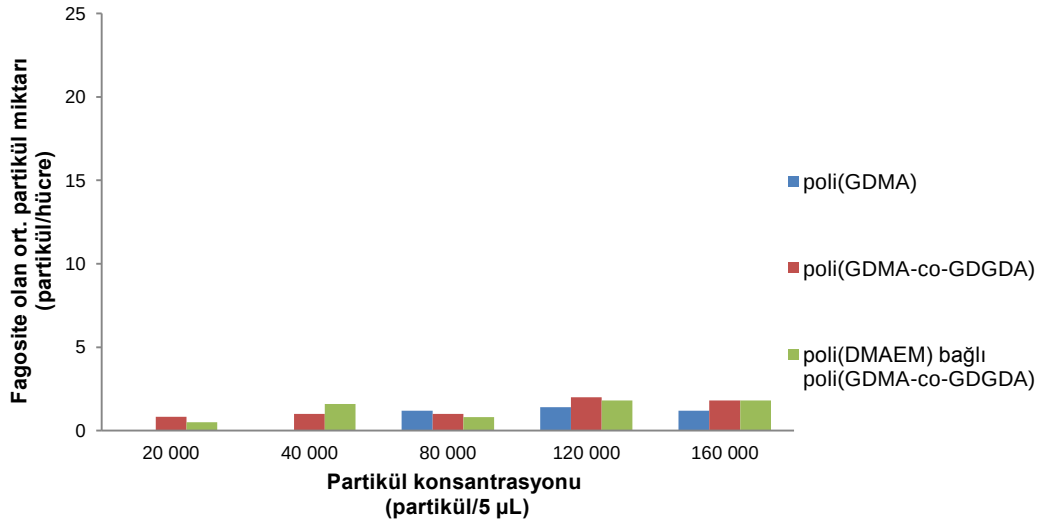
Çizelge 4.4'den görüldüğü gibi makrofaj hücrelerinin maksimum fagosite ettikleri partikül miktarları karşılaştırma yapıldığında fagositoz kapasitesi en fazla 21.0 partikül/hücre değeri ile poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü bu sırayı poli(GDMA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri izlemiştir. Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün fagositoz kapasitesi poli(GDMA) partikülününkinden fazla çıkması yapısında bulundurduğu hidroksil gruplarının poli(GDMA)'nınkinden daha fazla olmasından dolayı besiyeri ortamındaki proteinleri daha fazla adsorbe etmiş ve hücrenin partiküle karşı affinitesinin artması ile açıklanabilir. Poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü amin grubu içerdiğinden fagositoz kapasitesinin diğerlerine göre daha düşük çıkması yapısında amino grubundan dolayı pozitif yüklü fonksiyonel grup bulundurduğu yani polikasyonik yapıda olduğu için beklenmeyen bir durumdur. Pozitif yüklü fonksiyonel grup içeren partiküller normalde içermeyenlere göre fagositozun daha yüksek çıkması beklenir çünkü hücre yapısı pozitif yüklü yüzeylere karşı daha çok eğilim gösterir. Ancak bu durum pozitif yüklü partiküllerin serum proteinlerini adsorplama özelliğinin daha az olmasına bağlı olarak hücrelere daha az tutunmasıyla açıklanabilir. Bunun yanında poli(DMAEM) bağlı partikül miktarının hücre miktarına oranla düşük olmasından da kaynaklanabilir.

Çizelge 4.4’de verilen koşullarda hücre-partikül etkileşimlerinin elektron mikroskobu ile alınan görüntüleri Şekil 4.13’de verilmiştir.

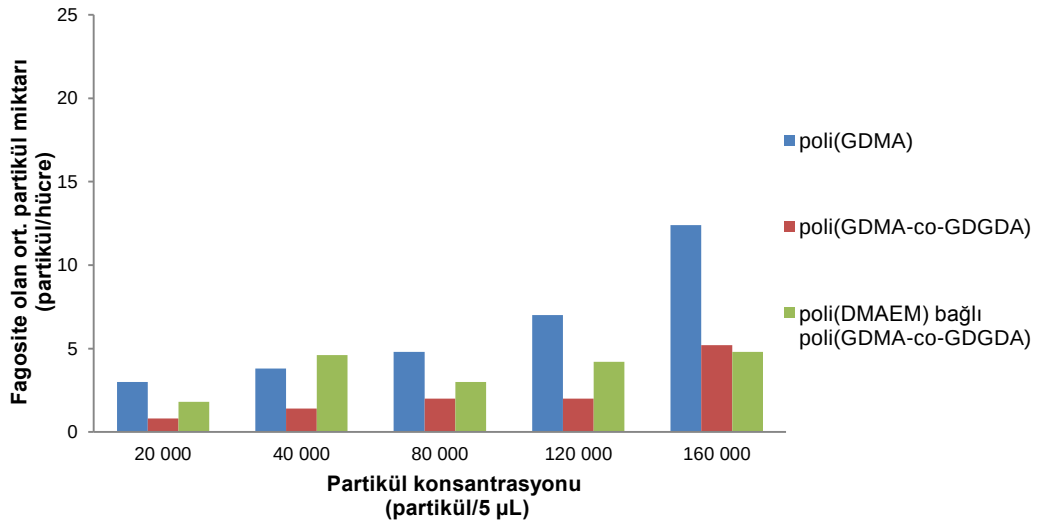


Şekil 4.13. Makrofaj hücreleri ile etkileştirilen 160 000 partikül/5µL derişimindeki (a) poli(GDMA) partikülünün 60 dakika (b) poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 30 dakika (c) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 60 dakika inkübasyonu sonucu SEM görüntüleri. Büyütme: (a) X4 000, (b) X800, (c) X3 000

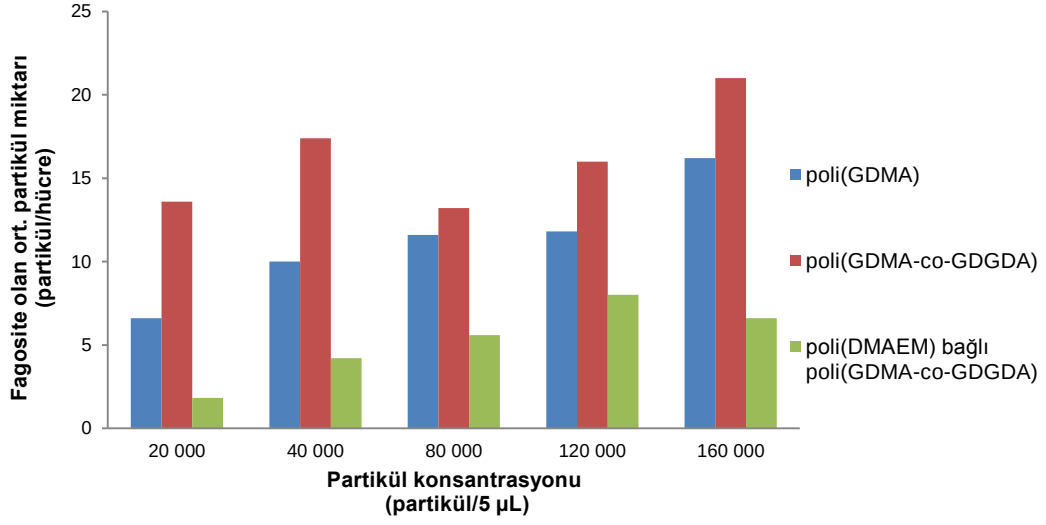
Sentezlenen bütün partiküllerin makrofajlarla etkileşimi sonucu elde edilen partikül derişimine karşı zamanın etkisi sonuçları Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18’de verilmiştir.



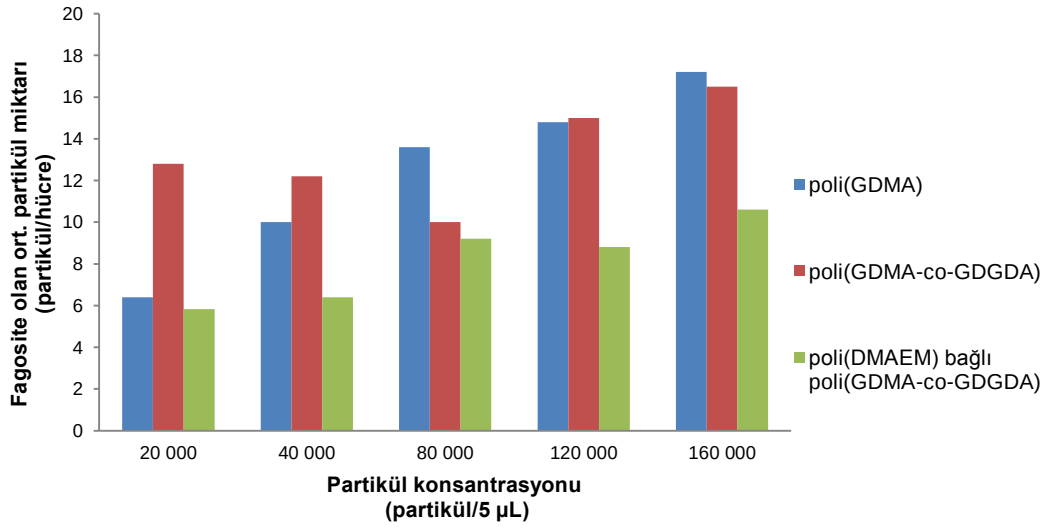
Şekil 4.14. Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 10 dakika inkübasyonu sonucu



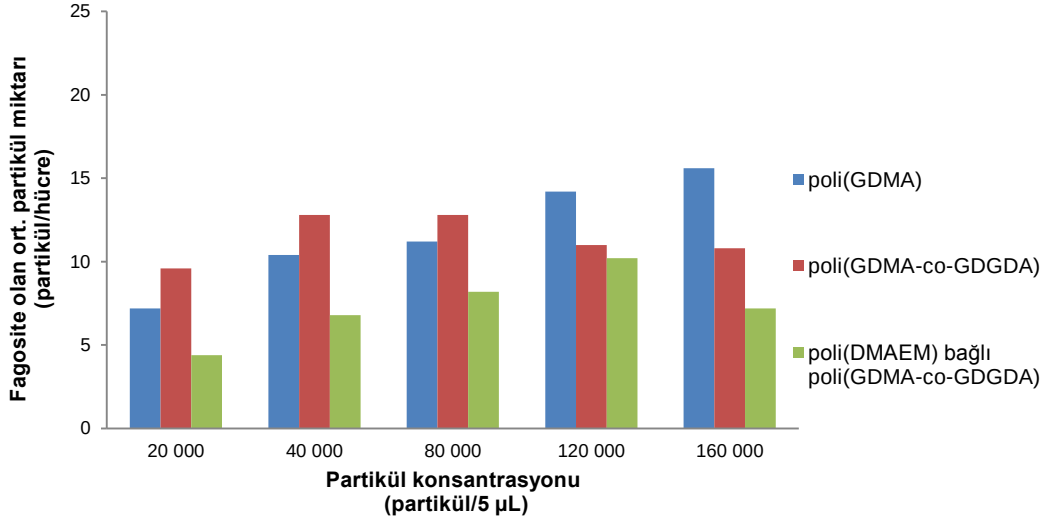
Şekil 4.15. Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 20 dakika inkübasyonu sonucu



Şekil 4.16. Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 30 dakika inkübasyonu sonucu



Şekil 4.17. Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 60 dakika inkübasyonu sonucu

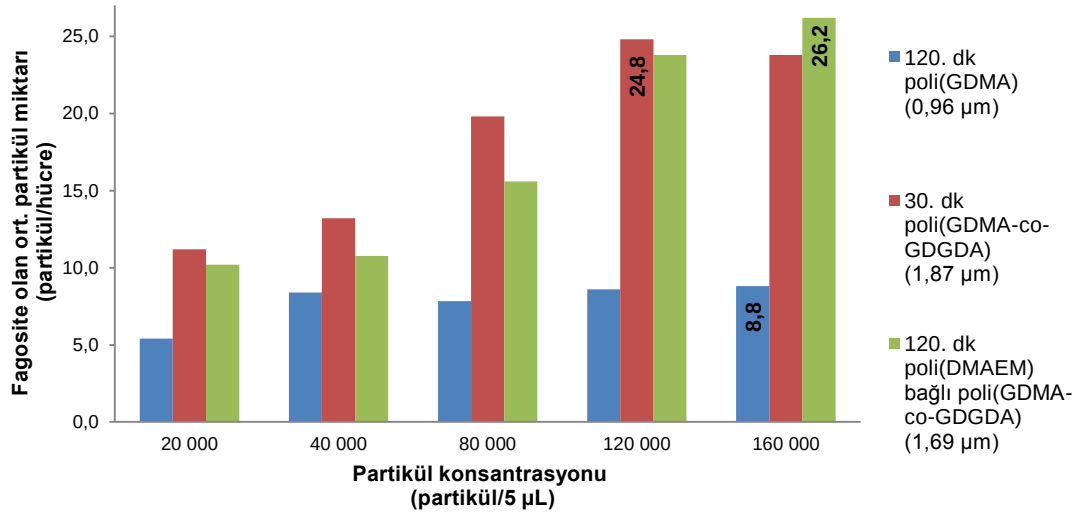


Şekil 4.18. Makrofaj hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 120 dakika inkübasyonu sonucu

4.3.2. Nötrofil hücreleri ile etkileşim

Periferik kandaki nötrofil hücrelerinin partiküller ile olan etkileşimleri optik mikroskop ile incelenmiş, fagositoz yapan hücrelerin içlerine aldıkları partikül miktarı sayılmış ve ortalaması alınmıştır. Bu sayım farklı derişimlerdeki her bir partikül ve zaman aralıkları için yapılmış ve sonuçlar karşılaştırıldıktan sonra optimum değerde olan kuyucuklardaki hücre-partikül etkileşimlerinin SEM cihazı (Nova Nanosem 430, UNAM) ile görüntüleri alınmıştır.

Poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve amin grubu içeren poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri optimum fagositoz kapasitesine sırasıyla 120. dakika, 30. dakika ve 120. dakika'da ulaşmaktadırlar (Şekil 4.19). Bu sonuca göre en hızlı fagositoz poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü için gerçekleşmektedir. Ancak en fazla fagositoz edilen partikül ise amin grubu içeren poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partiküldür. Amin grubu pozitif yüklü fonksiyonel grup olduğu için bu grubu içeren partiküller normalde içermeyenlere göre fagositozun daha yüksek çıkması beklenir çünkü hücre yapısı pozitif yüklü yüzeylere karşı daha çok eğilim gösterir.



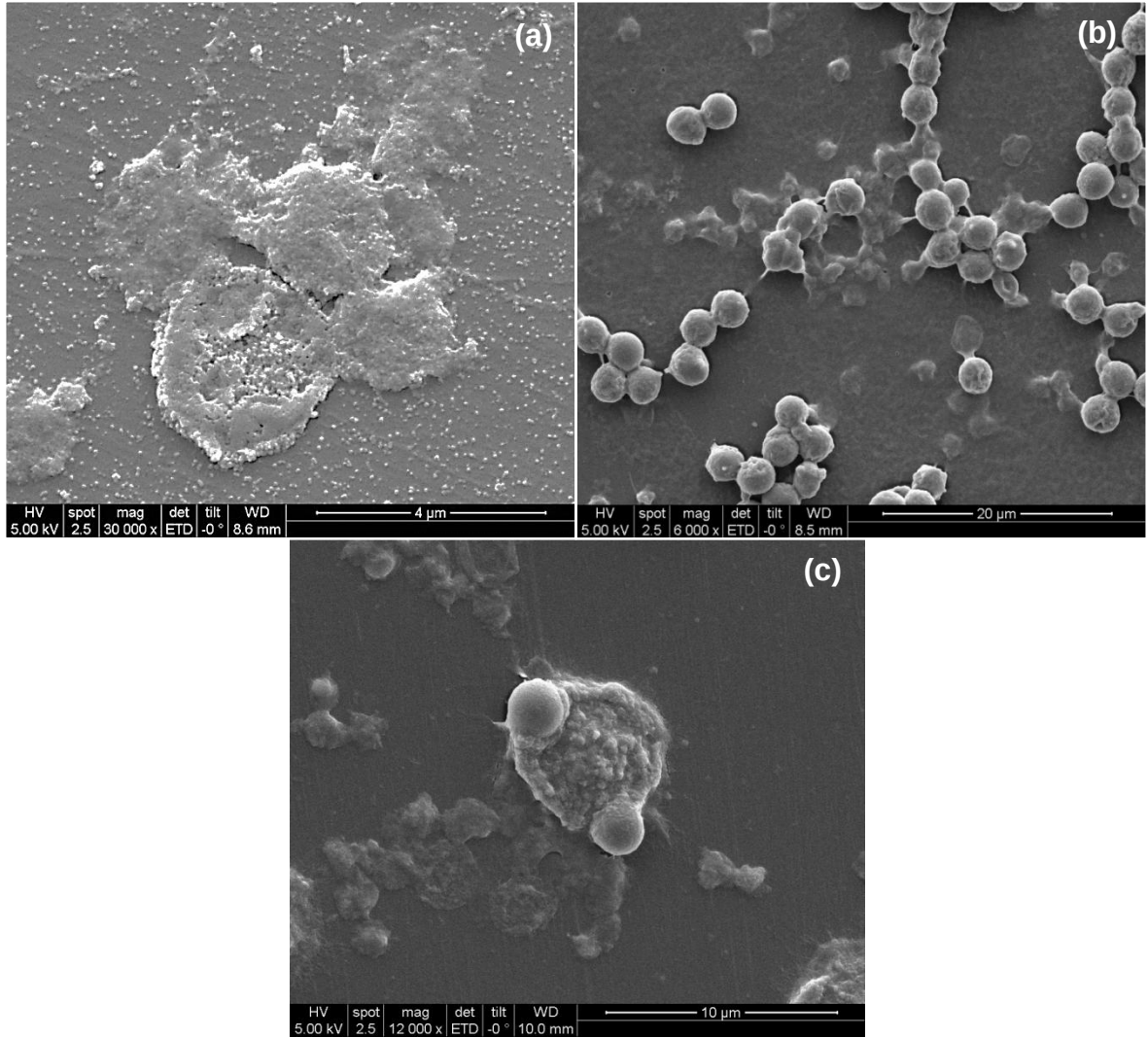
Şekil 4.19. Poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin nötrofil hücreleri ile etkileşimi sonucu sırasıyla 120., 30. ve 120. dakikada fagosite değerleri

Çizelge 4.5'den görüldüğü gibi makrofaj hücrelerinin maksimum fagosite ettikleri partikül miktarları karşılaştırma yapıldığında fagositoz kapasitesi en fazla 26.2 partikül/hücre değeri ile poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü bu sırayı poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(GDMA) partikülleri izlemiştir

Çizelge 4.5. Nötrofil hücreleri ile partiküllerin etkileşimi sonucu maksimum fagosite değerleri

Partikül	Partikül Boyutu (µm)	~107 000 Nötrofil Hücresi ile Etkileşim		
		Partikül Derişimi (partikül)	Fagositoz Süresi	Fagositoz (partikül/hücre)
Poli(GDMA)	0.96 µm	160 000	120. dk	8.8
Poli(GDMA-co-GDGDA)	1.87 µm	120 000	30. dk	24.8
Poli(DMAEM) bağlı Poli(GDMA-co-GDGDA)	1.69 µm	160 000	120. dk	26.2

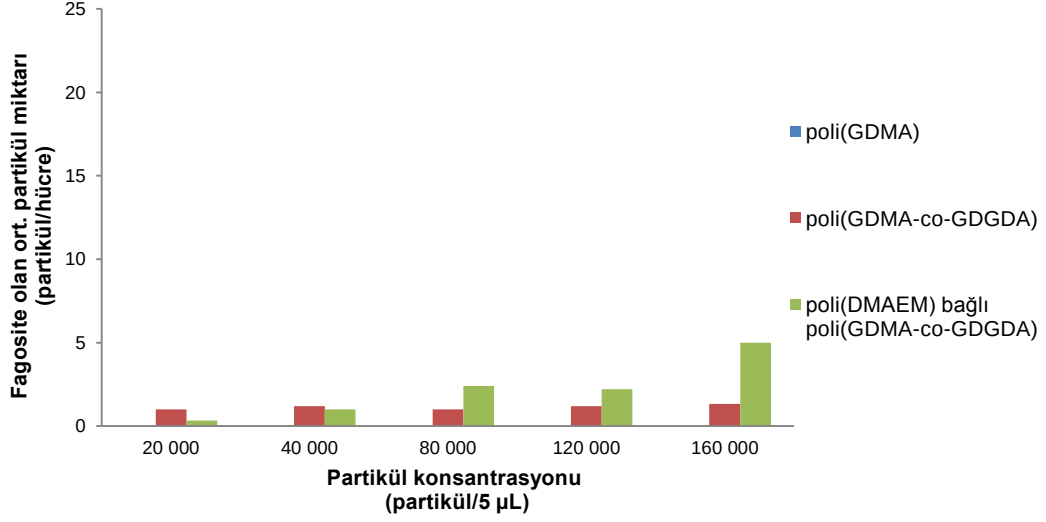
Çizelge 4.5’de verilen koşullarda hücre-partikül etkileşimlerinin elektron mikroskobu ile alınan görüntüleri Şekil 4.20’de verilmiştir.



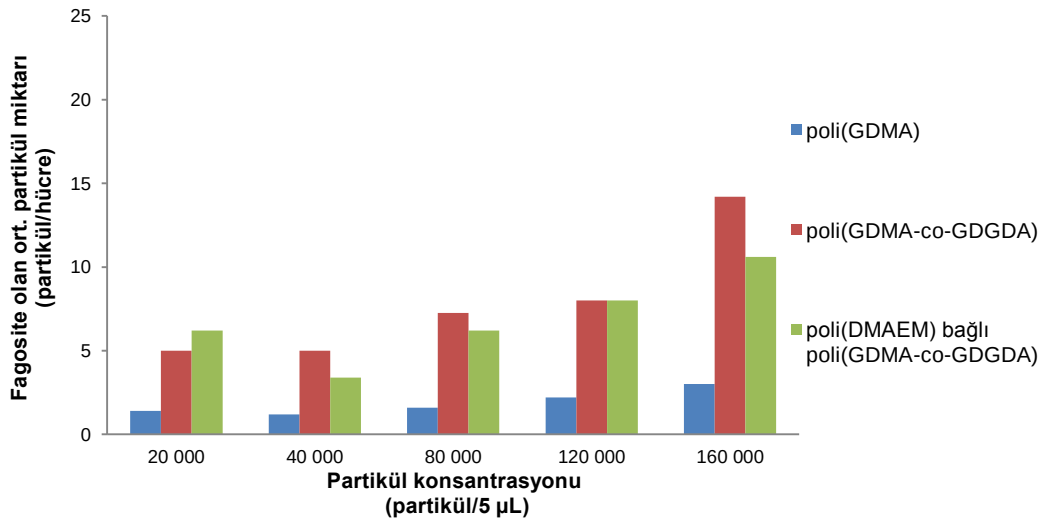
Şekil 4.20. Makrofaj hücreleri ile etkileştirilen (a) 160 000 partikül/5µL derişimindeki poli(GDMA) partikülünün 120 dakika (b) 120 000 partikül/5µL derişimindeki poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 30 dakika (c) 160 000 partikül/5µL derişimindeki poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün 120 dakika inkübasyonu sonucu SEM görüntüleri. Büyütme: (a) X30 000, (b) X6000, (c) X6 000

Taramalı elektron mikroskobundan (SEM) elde edilen görüntüler ve Şekil 4.19’deki grafikten elde edilen sonuçlar uyumludurlar. Nötrofil hücrelerinde poli(GDMA) için 120. dakika, poli(GDMA-co-GDGDA) 30. dakikada ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) 120. dakikada maksimum fagositoz değerine ulaşmıştır.

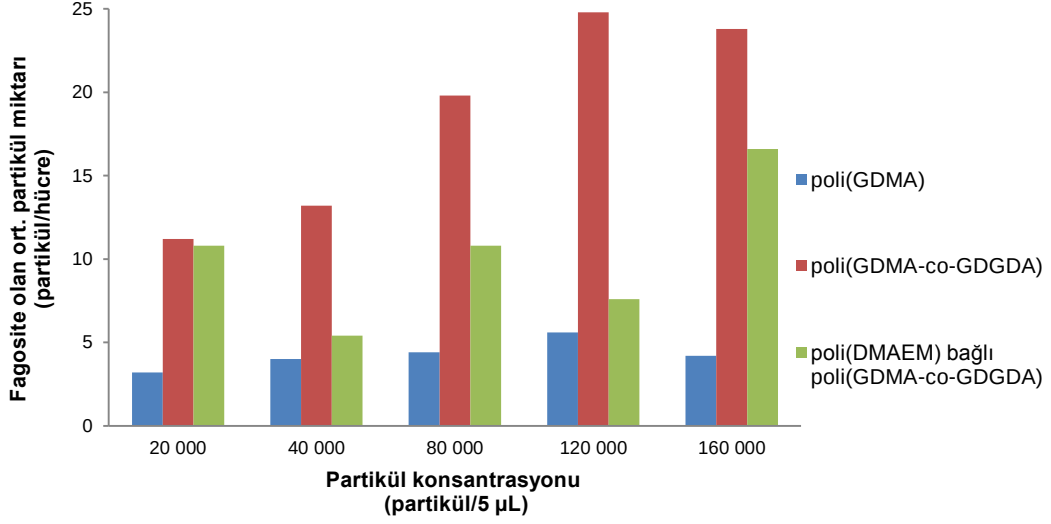
Polimerik partiküllerin fagosite ettiği partikül miktarı üç farklı partikül için de zamanla artışı Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'den görülmektedir.



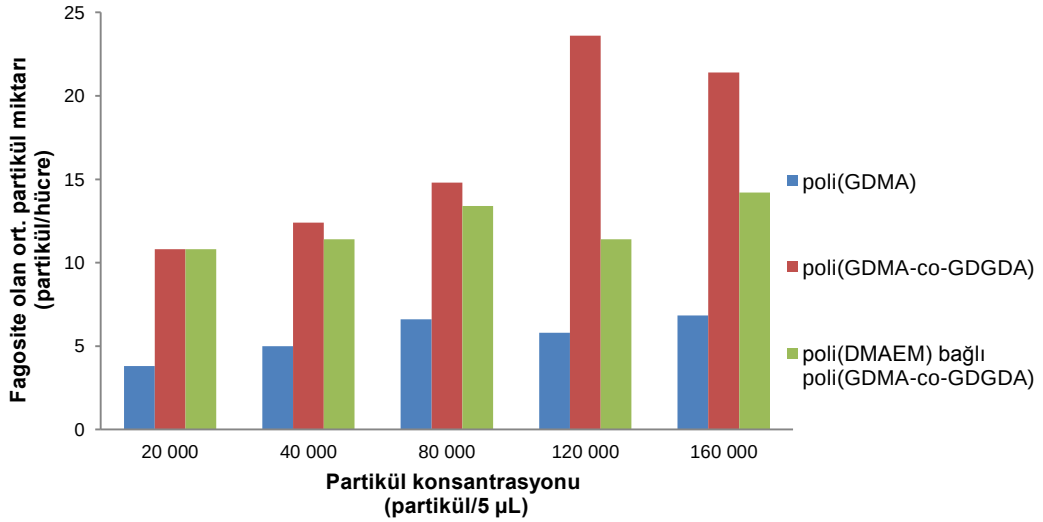
Şekil 4.21. Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 10 dakika etkileşimi sonucu



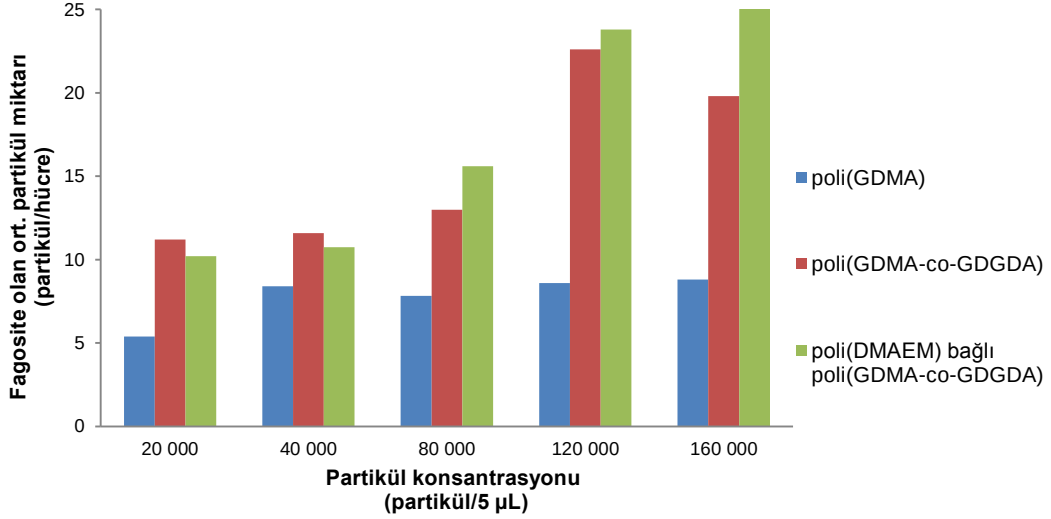
Şekil 4.22. Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 20 dakika etkileşimi sonucu



Şekil 4.23. Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 30 dakika etkileşimi sonucu



Şekil 4.24 Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 60 dakika etkileşimi sonucu



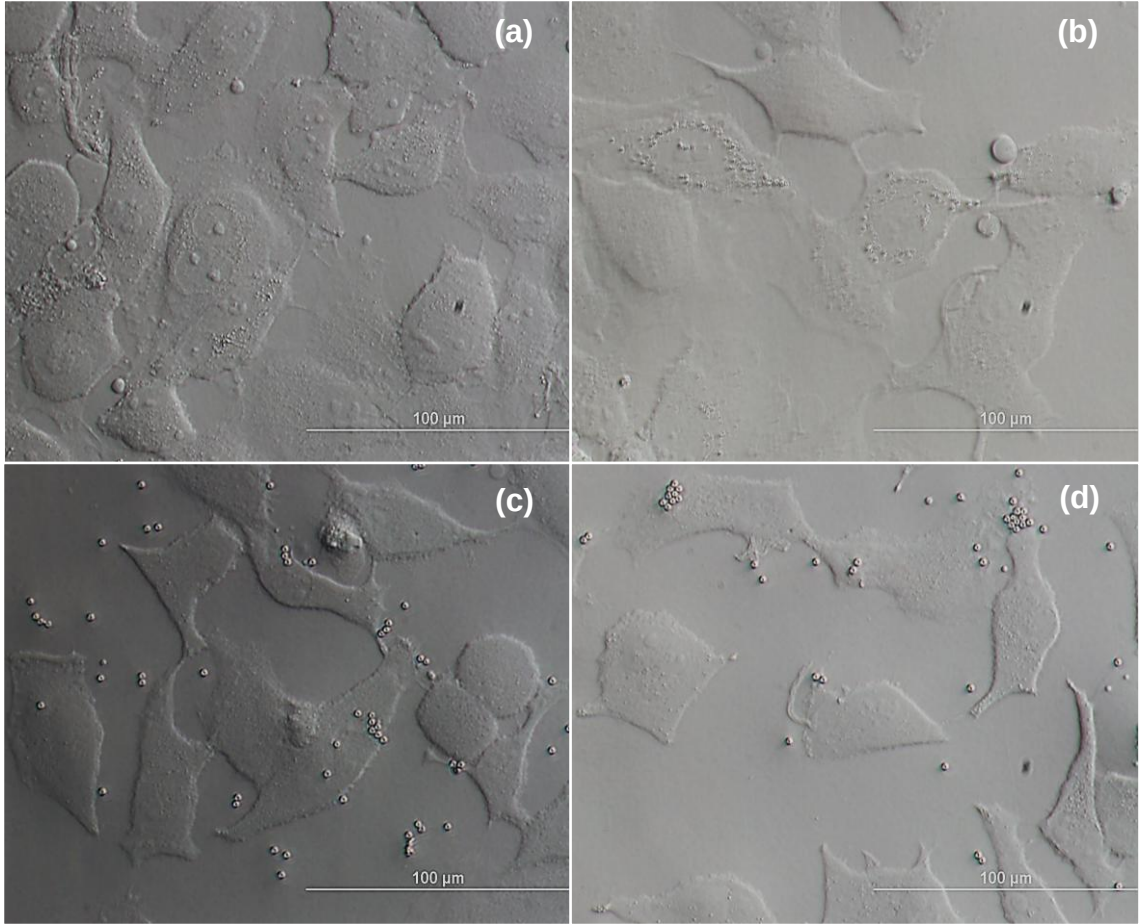
Şekil 4.25. Nötrofil hücrelerinin poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri ile 120 dakika etkileşimi sonucu

4.3.3. HeLa hücreleri ile etkileşim

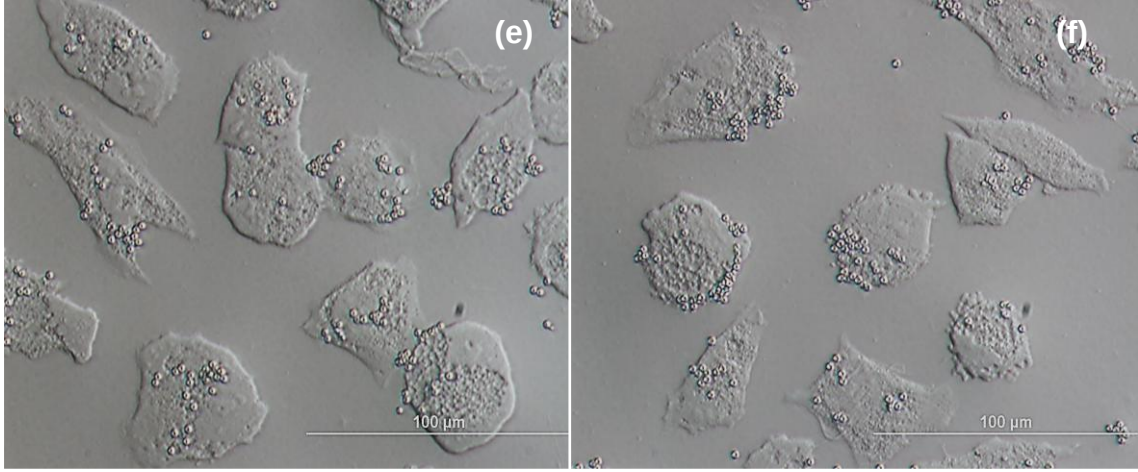
Başlangıçta her bir örnek başına yaklaşık 2000 HeLa hücresi ile iki gün inkübasyon süresince etkileştirilen poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri 5 farklı derişimde (bkz. 3.4.1.) 6. saat, 24. saat ve 48. saat sonlarında optik mikroskop ile görüntüleri alınmıştır.

Elde edilen görüntülerin sonuçlarına göre en fazla 5. derişim değeri olan 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküllerin HeLa hücrelerinin yüzeyine tutunduğu gözlemlenmiştir. Hücre kültür ortamlarından belirli sürelerde alınan, hücre tutunmasını gösteren optik mikroskop fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de verilmektedir. Elde edilen optik mikroskop görüntülerine göre inkübasyon süresince HeLa hücreleri ile aynı besiyeri içinde süspanse haldeki poli(GDMA) ve poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri hücre canlılığına ve morfolojisine hiçbir olumsuz etkisi olmadığı gözlenmiştir. Sadece poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin agregasyonunu önlemek amacıyla %0.025’lik CTAB çözeltisinde ortama eklendiği için hücrelerin yüzey morfolojisini değiştirdiği düşünülmektedir. HeLa hücrelerinin boyutunda azalmalar gözlenmiştir.

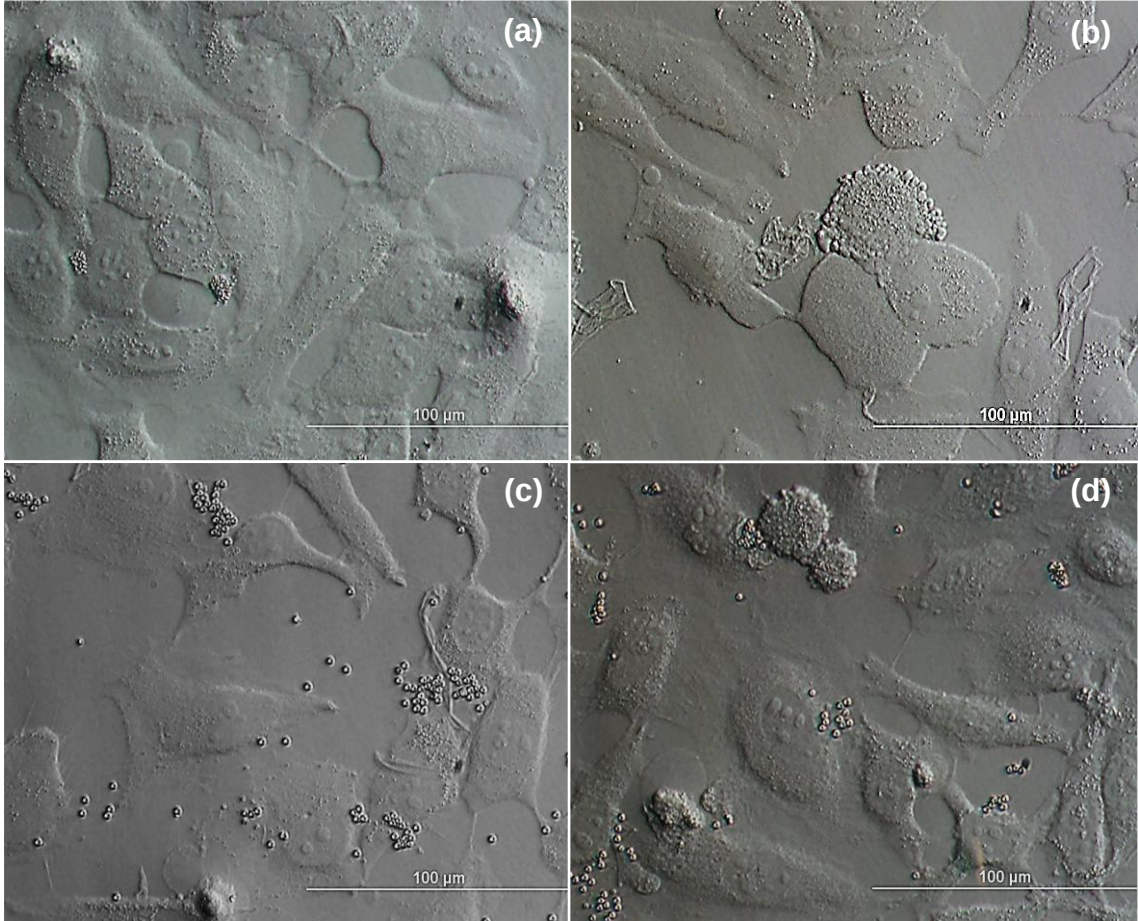
Optik mikroskop görüntülerinden de anlaşılacağı gibi poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri tüm zaman aralıklarında HeLa hücre yüzeyine en fazla tutunan partiküldür. HeLa hücrelerinin hücre zarı negatif yüklüdür ve pozitif yüklü mikropartiküller ile elektrostatik etkileşiminden dolayı hücre yüzeyinde mikropartiküllerin hızlı birikmesi sonucu hücre yüzeyinde yüksek oranda tutunmasına neden olduğu düşünülmektedir (Hauck et al., 2008). Mikropartiküllerin hücre yüzeyine tutunmasını arttırmak amacıyla katyonik özellikte fonksiyonel grup bağlanarak pozitif yüklenmesi sağlanmıştır. Bu nedenle poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinin hücre yüzeyine tutunmasının diğer partiküllere göre daha fazladır.



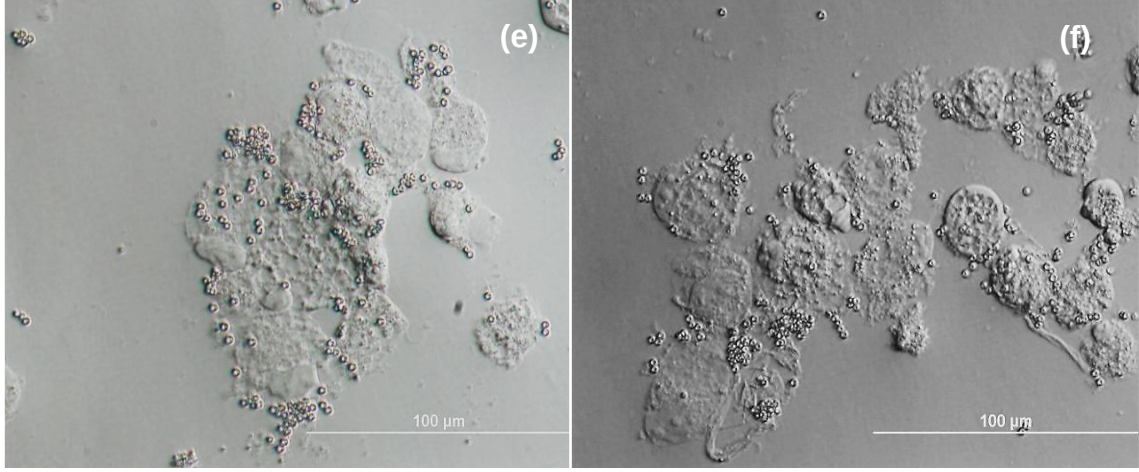
Şekil 4.26. HeLa hücrelerinin 6. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (a-b) poli(GDMA), (c-d) poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400



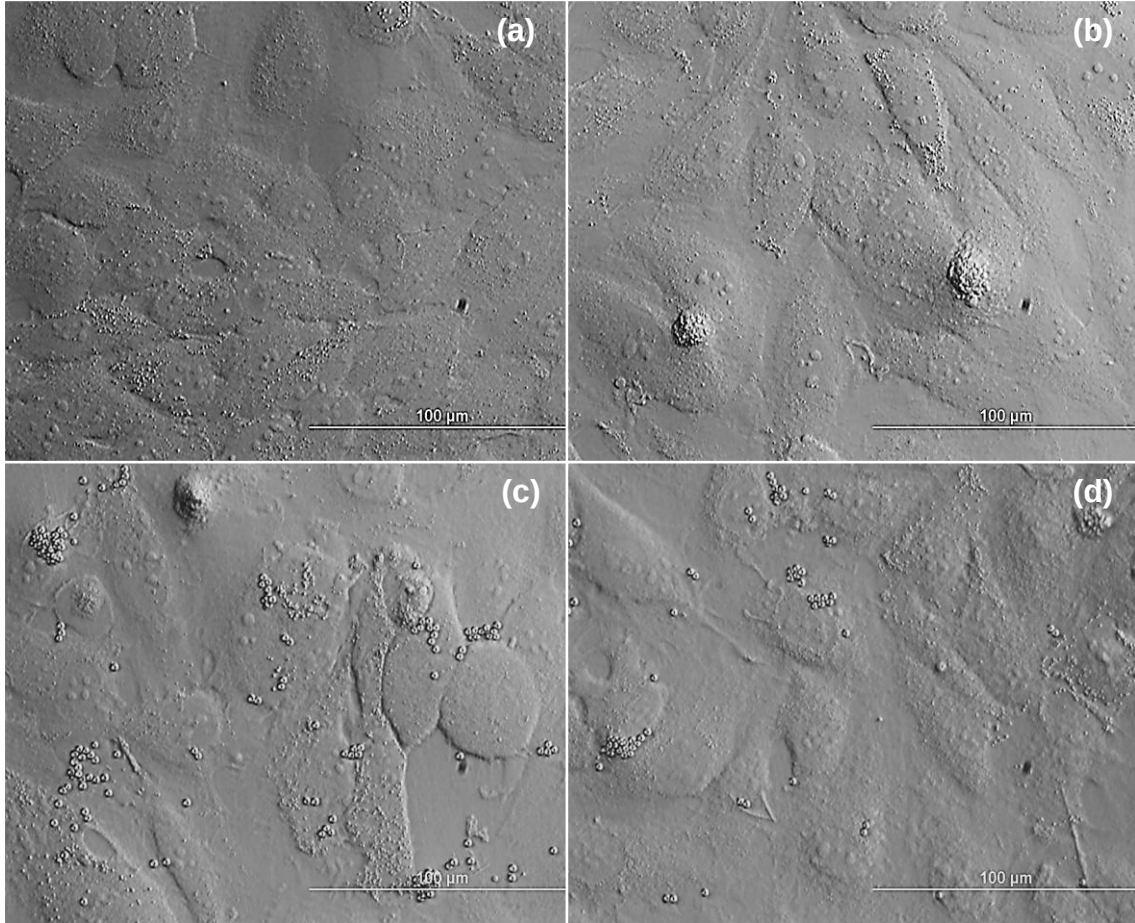
Şekil 4.26. devam ediyor. HeLa hücrelerinin 6. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (e-f) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400



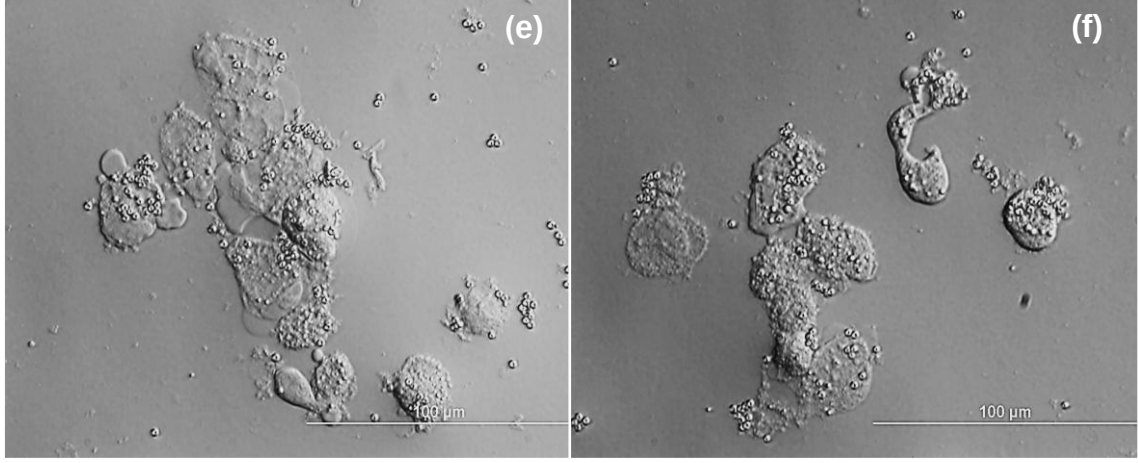
Şekil 4.27. HeLa hücrelerinin 24. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (a-b) poli(GDMA), (c-d) poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400



Şekil 4.27. devam ediyor. HeLa hücrelerinin 24. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (e-f) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400



Şekil 4.28. HeLa hücrelerinin 48. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (a-b) poli(GDMA), (c-d) poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400



Şekil 4.28. devam ediyor. HeLa hücrelerinin 48. saat sonunda 160 000 partikül/5µL tampon çözelti derişimindeki partiküller ile etkileşimi sonucu optik mikroskop ile alınan görüntüleri. (e-f) poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA). Büyütme: X400

5. SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında ulaşılan önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- ✓ Tez çalışmasının ilk bölümünde çöktürme polimerizasyonu yöntemi ile poli(GDMA), çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile monodispers, gözenekli poli(GDMA-co-GDGDA) ve atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi ile poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülleri sentezlenmiştir.
- ✓ Sentezlenen partiküllerin SEM cihazı ile yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen görüntülerden partiküllerin eş boy dağılıma ve küresel formda olduğu sonucuna varılmıştır. Ortalama çapları sırasıyla, 0.96 μm , 1.87 μm ve 1.69 μm ve değişim katsayıları % 4.62, % 5.29 ve % 5.15 olarak hesaplanmıştır.
- ✓ BET azot adsorpsiyon sistemi kullanılarak elde edilen yüzey alanı verilerinden, poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün en yüksek ve poli(GDMA)'nın en düşük yüzey alanına sahip olduğu görülmüştür. Poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün düz haline göre yüzey alanın daha düşük çıkması yapısına katılan DMAEM'nin yüzey alanını azaltıcı etkisinin olmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. BET analizi sonuçlarına göre poli(GDMA) partikülü gözenek boyutu en düşük olan partiküldür. SEM görüntülerinden de anlaşılabileceği gibi mikroküre yüzeyinin gözenekli bir yapıya sahip olması yüzey alanını arttıran bir faktördür.
- ✓ Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülüne bağlanan DMAEM miktarı elemental analiz sonucu 29.2 mg DMAEM/g partikül, potansiyometrik titrasyon sonucu 25.2 mg DMAEM/g partikül olarak bulunmuştur. DMAEM miktarının elemental analiz sonucunda daha fazla çıkması partikülünün sentezlenmesi sırasında yapısına katılan AIBN yapısındaki azottan kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.
- ✓ Farklı polimerizasyon yöntemleri ile hazırlanan partiküller ile yapılan BSA adsorpsiyon deneylerinde pH'ın protein adsorpsiyonu üzerindeki etkisi

incelenmiş ve pH değişimi ile BSA'nın maksimum adsorplandığı nokta beklenildiği gibi izoelektrik noktası olan pH 5 değeri olarak bulunmuştur. Diğer pH değerlerinde adsorpsiyonun daha düşük çıkmasının nedeni eş yüklü gruplar arasındaki itmeler ve proteinin yüzeyinde pH'a bağlı olarak bazı konformasyonel değişimlerin gerçekleşmesi olabileceği düşünülmüştür. Bazı bölgelerde ise aynı yük yoğunluğuna sahip ara yüzeydeki itme kuvvetlerinin baskın olması sonucunda adsorpsiyon önemli ölçüde azalmıştır.

- ✓ Başlangıç BSA derişimindeki değişimin adsorpsiyona etkisi incelenmiş, başlangıç BSA derişimi arttıkça gram partikül başına adsorplanan BSA miktarının artmış, poli(GDMA), poli(GDMA-co-GDGDGA) ve poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülleri için adsorpsiyon kapasitesi değerleri sırasıyla 52.4 BSA/g partikül, 61.0 BSA/g partikül ve 78.4 mg BSA/g partikül olarak elde edilmiş ve daha sonra adsorpsiyon kapasitesi doygunluğa ulaşmıştır. Bu durum partikül yapısındaki hidroksil ve amin grupları ile albümin molekülündeki aminoasitlerin yan zincirleri arasındaki hidrofobik, elektrostatik ve hidrojen bağı etkileşimlerden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.
- ✓ BSA çözeltisi ile etkileştirilen partikül miktarı değişiminin BSA adsorpsiyonuna etkisi incelendiğinde, etkileştirilen partikül miktarı arttıkça partikül başına adsorplanan BSA miktarında azalma olduğu görülmüştür. Bunun nedeni partikül başına düşen albümin derişiminin daha yüksek olması ile açıklanabilir. 0.05 g partikül miktarı için albümin adsorpsiyon kapasitesi poli(GDMA) partikülü için 52.9 mg BSA/g partikül ve poli(GDMA-co-GDGDGA) için 60.2 mg BSA/g partikül değerindedir Bu değerler yapılan pH etkisinde ve albümin derişimi etkisi çalışmalarında aynı koşullardaki (pH 5, 12 mg BSA/mL, 0.05 g partikül) değerleri ile uyumlu sonuçlar vermiştir.
- ✓ Adsorpsiyon zamanla değişim etkisi çalışmalarında zamanla adsorplanan BSA miktarı değişimi incelendiğinde, ilk 60 dakikada adsorpsiyon hızlı gerçekleşmektedir. Daha sonra, adsorplanan BSA miktarının zamanla artış

gösterdiği ancak iki saatin sonunda sabitlenerek dengeye geldiği görülmüştür. Bu durum diğer denge adsorpsiyon deneylerinde iki saatlik süre seçiminin uygun olduğunu doğrulamaktadır. Poli(GDMA) partiküllerinin adsorpsiyon kapasitesinin daha düşük çıkması, albümin moleküllerinin polimerik partiküle difüzyonu sırasındaki albümin ve partiküller arasındaki zayıf etkileşimlerle açıklanabilir.

- ✓ Desorpsiyon çalışmalarında BSA'nın poli(GDMA-co-GDGDA) partiküllerinden desorpsiyonunun poli(GDMA) partikülüne göre daha az olduğu gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünün yüzey alanının daha düşük olması ile açıklanmıştır.
- ✓ Hücre etkileşim çalışmalarında makrofaj hücrelerinde elde edilen sonuçlar arasında karşılaştırma yapılacak olursa 30. dakikada en hızlı ve en fazla fagosit olan poli(GDMA-co-GDGDA) partikülüdür.
- ✓ Nötrofil hücrelerinde en hızlı fagositoz poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü için gerçekleşmektedir. Ancak en fazla fagositoz edilen partikül ise amin grubu içeren partiküldür. Amin grubu pozitif yüklü fonksiyonel grup olduğu için bu grubu içeren partiküller normalde içermeyenlere göre fagositozun daha yüksek çıkması beklenir çünkü hücre yapısı pozitif yüklü yüzeylere karşı daha çok eğilim gösterir.
- ✓ Nötrofil ve Makrofaj hücreleri ile etkileşim çalışmalarında zamana bağlı olarak tüm gruplarda fagosit edilen partikül miktarının hücreler belli bir kapasiteye ulaşıncaya kadar arttığı görülmüştür.
- ✓ HeLa hücrelerinde ise optik mikroskop sonuçlarına göre HeLa hücrelerine en fazla tutunan, partikül poli(DMAEM) bağlı poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü olduğu sonucuna varılmıştır

KAYNAKLAR

- Abbas, A.K. and Lichtman, A.H., **2003**, Cellular and Molecular Immunology, Elviesier, 5th edition, 476p.
- Acharya, S. and Sahoo, S.K., **2011**, PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect, Advanced Drug Delivery Reviews, 63-3, p170–183
- Akçalı, A., **2010**, Derleme: Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi, Türk Onkoloji Dergisi, 25(3), p119-123
- Amin, S., Rajabnezhad, S., Kohli., K., **2009**, Review: Hydrogels as potential drug delivery systems, Scientific Research and Essay, Vol. 3 (11), p1175-1183
- Bennett, S.L., Melanson, D.A., Torchiana, D.F., Wiseman, D.M., Sawhney, A.S., **2003**, Journal of Cardiac Surgery, 18(6), p494-499
- Bonfá, A., Saito, R.S.N., França, R.F.O., Fonseca, B.A.L., Petri, D.F.S., **2011**, Poly(ethylene glycol) decorated poly(methylmethacrylate) nanoparticles for protein adsorption, Material Science and Engineering C 31, p562-566
- Cassatella, M.A., **2003**, An Emerging Regulator of Inflammatory and Immune Response, Karger Publishers, ISBN: 9783318009521, Basel, Switzerland, 247p.
- Cheng, C.M., Micale, F.J., Vanderhoff, J.W., El-Aesser, M.S., **1992**, Pore structural studies of monodisperse porous polymer particles, Journal of Colloid and Interface Science, volume 150, p549-558
- Colm, G., **2009**, Wikipedia Free internet encyclopedia, Phagocytosis, <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Phagocytosis2.png>
- Colombo, P., **1993**, Swelling-controlled release in hydrogel matrices for oral route, Adv. Drug Deliv. Rev, 11, p37–57
- Deligkaris, K., Tadele, T.S., Olthuis, W., Berg, A., **2010**, Review: Hydrogel-based devices for biomedical applications, Sensors and Actuators B, p 147, p765–774
- Denizli, A. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., **2010**, Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, Ankara
- Drake, V.J., **2010**, Linus Pauling Institute, Oregon State University, Immune cell phagocytosis, <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phagocytosis.html>
- Ellingsen, T., Aune, O., Ugelstad, J., Hagen, S., **1990**, Monosized stationary phases for chromatography, Journal of Chromatography A, Volume 535, p147-161.

- Gaselowitz, D.A. and Neckers, L.M., **1995**, Bovine serum albumin is a major oligonucleotide-binding protein found on the surface of cultured cells, *Antisense Res. Dev.*, 5 (3), p213-217.
- Gökmen, M.T. and Du Prez, F.E., **2012**, Porous polymer particles—A comprehensive guide to synthesis characterization, functionalization and applications, *Progress in Polymer Science*, Volume 37, Issue 3, p365–405
- Güler, S., **2011**, Sağlıklı ve Diyabetik Kişilerden Elde Edilen Kan Hücrelerinin Doku Faktörü Aktivitesi Üzerine *Candida Albicans*'ın Etkisinin İn-Vitro İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 93s.
- Hasegawa, T., Iijima, K., Hirota, K., Nakajima, T., Makino, K., Terada, H., **2008**, Exact determination of phagocytic activity of alveolar macrophages toward polymer microspheres by elimination of those attached to the macrophage membrane, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63, p209–216
- Hauck, T.S., Ghazan, A.A., Chan, C.W.W, **2008**, Assessing the Effect of Surface Chemistry on Gold Nanorod Uptake, Toxicity, and Gene Expression in Mammalian Cells, 4(1), p53-159
- İmir, T., **1997**, Fare makrofaj hücrelerinde IL-12 salınmasına leishmania majora ait çeşitli antijenik yapıların etkisi, Tübitak, Proje No:SBAG AYD-149, Ankara
- Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., Tuncel, A., **2011**, Cellular Interactions of Monodisperse Poly(GDMA) Latex Particles Containing DMAEM Brushes, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, Article in Press, Accepted Manuscript, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*
- Kai, M.Y., **2008**, The Adsorption of Bovine Serum Albumin on Fused Silica: A Single Molecules Study, Doctor of Philosophy, Hong Kong Baptist University
- Karataş, A. ve Sonakın, Ö.,**2007**, Mikrofabrikasyon teknolojisi ve ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde uygulamaları, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 36 (1), s47–74
- Kashyap, N., Kumar, N., Kumar, M., **2005**, Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, 22, p107–149
- Kim S.W., Bae, Y.H. and Okano T., **1992**. Hydrogels: Swelling, drug loading and release. *Pharm Res* 9(3), p283-290
- Kim, J.H. and Yoon, JY., **2002**, Protein adsorption on polymer particles encyclopedia of surface and colloid science, p4373–4380
- Kim, D. and Park, K., **2004**, Swelling and mechanical properties of superporous hydrogels of poly(acrylamide-co-acrylic acid)/polyethylenimine interpenetrating polymer Networks, *Polymer*, 45, p189–196

- Koeppen, B.M and Stanton, B.A., **2008**, Berne & Levy Physiology, Mosby Elsevier, 6th edition, 848p., USA
- Kohane, D.S., **2007**, Microparticles and Nanoparticles for Drug Delivery, Biotechnology and Bioengineering, 96(2), p203-209
- Kopeček, J. and Yang, J., **2007**, Review: Hydrogels as smart biomaterials, Polym Int., 56, p1078–1098
- Kricheldorf, R. H. and Rost, S., **2005**, A-B-A-Triblock and multiblock copolyesters prepared from ϵ -caprolactone, glycolide and L-lactide by means of bismuth subsalicylate, Polymer, Volume 46, Issue 10, p3248–3256
- Kricheldorf, R. H., Nuyken, O. and Swift, G., **2005**, Handbook of Polymer Science, Second Edition, ISBN 0-8247-5473-5, New York, 946p.
- Lee, K.Y., Mooney, D.J., **2001**, Hydrogels for tissue engineering, Chemical Reviews, 101(7), p1869-1880
- Lee, W.L., Harrison, R.E., Grinstein, S., **2003**, Phagocytosis by neutrophils, Microbes and Infection 5, p1299–1306
- Liu, T., DeSimone, J.M., Roberts, J.W., **2006**, Kinetics of the precipitation polymerization of acrylic acid in supercritical carbon dioxide: The locus of polymerization, Chemical Engineering Science ,61, p3129–3139
- Lowman, A.M., and Peppas, N.A., **1997**, Analysis of the complexation/decomplexation phenomena in graft copolymer networks, Macromolecules, 30, p4959–4965
- Lu, J., Peng, B., Li, M., Lin, M., **2010**, Dispersion Polymerization of Acrylamide and Acrylic Acid in Aqueous Media, Advanced Materials Research, 87-88, p233-238.
- Lutolf M.P., Raeber G.P., Zisch, A.H., Tirelli, N, Hubbell, J.A., **2003**, Cell responsive synthetic hydrogels, Adv. Mater., 15, p888-892
- Onur, M.A., **2011**, Kan Dolaşımı Ders Notları, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 146s.
- Park, H., K. Park, Hydrogels in bioapplications, in: R.M. Ottenbrite, S.J. Huang, K. Park (Eds.), Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications, American Chemical Society, Washington, DC, 1996, p2–10.
- Peppas, N.A., **1986**, Hydrogels in Medicine and Pharmacy, CRC Press, vol. 1.
- Peppas, N.A., Sahlin, J.J., **1996**, Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review, Biomaterials 17, p1553–1561

- Peppas, N.A., Keys, K. B., Torres-Lugo, M., and Lowman, A. M., **1999**, Poly(ethylene glycol)-Containing Hydrogels in Drug Delivery. *J. Controlled Release*, 62, p81–87
- Peppas, N.A., Burer, P., Leobandung, W., Ichikawa, H., **2000**, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50, p27-46.
- Peppas, N. A., **2004**, Review: Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, 2. Edition, p35-42
- Ruacan, Ş., **2009**, Sunum: Evrim, Bağışıklık, Kanser, Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Ankara
- Saraçoğlu, B., Uğuzdoğan, E., Gölgelioğlu, Ç., Tuncel, A., **2009**, Synthesis of Monodisperse Glycerol Dimethacrylate-Based Microgel Particles by Precipitation Polymerization, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, p4844–4851
- Siepmann, J. and Siepmann, F., **2006**, Microparticles Used as Drug Delivery Systems, *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 133, p15–21
- Singh, A., Sharma, P.K., Garg, V.K., Garg, G., **2010**, Hydrogels: A Review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 4, p97-101
- Stuart, L.M. and Ezekowitz, R.A.B., **2005**, Phagocytosis: Elegant Complexity, *Immunity*, 22, p539–550.
- Toth, J., **2003**, Adsorption Theory, modelling and analysis, p1-20
- Tuncel, A., **1999**, Electron microscopic observation of uniform macroporous particles. II. Effect of DVB concentration, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 71, p2291-2302
- Tuncel, A., Tuncel, M., Salih, B., **1999**, Electron microscopic observation of uniform macroporous particles. I. Effect of seed latex type and diluent, *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 71, p2271-2290
- Tümsek, F., **2008**, Adsorpsiyon ve katı yüzeylerin karakterizasyonu yüksek lisans ders notları, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi.
- Ulusoy, A., Onur, M.A., **2003**, Measurement of in vitro phagocytic activity using functional groups carrying monodisperse poly(glycidyl methacrylate) microspheres in rat blood, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, 14(11), p1299-1310
- Van der, L.H.J., Herber, S., Olthuis, W., Bergveld, P., **2003**, Patterned dual pH responsive core shell hydrogels with controllable swelling kinetics and volume, *Analyst*, 128, p325-331
- Wang, K., Burban, J., Cussler, E., **1993**, Hydrogels as separation agents Responsive gels, *Adv. Polymer sci. II*, p67-79

- Wang, Q.C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., **1994**, Reversed-phase chromatography of small molecules and peptides on a continuous rod of macroporous poly (styrene-co-divinylbenzene), *Journal of Chromatography A*, Volume 669, p230-235.
- Wartlick, H., Spankuch-Schmitt, B., Strebhardt, K., Kreuter, J., Langer, K., **2005**, Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 96 (3), p483-495.
- Wichterle, O., **1960**, Hydrophilic gels for biological use, *Nature*, 185 p117

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nilüfer EMİNOĞLU

Doğum Yeri : Çorum-TÜRKİYE

Doğum Yılı : 1983

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise: 1994-2001 Fethiye Kemal Mumcu Anadolu Lisesi

Lisans: 2002-2007 Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği

Yüksek Lisans: 2009-2012 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Yabancı Dil: İngilizce

İş Tecrübesi:

09.2010- : MİKRO-TASARIM, Odtü Teknokent, Ankara

01-07 2010 : Nobel İlaç, FARGEM, Düzce

07-10.2008 : SIMAJ Patent, Ankara

06-07.2005 : TSE, Ankara

07-08.2004 : MarSA, Adana

06-07.2004 : ASAŞ, Ankara