

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANILABİLECEK FONKSİYONEL
POLİMERİK YAPILARIN HAZIRLANMASI**

GÖZDE DEVECİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUHAMMET Ü. KAHVECİ**

İSTANBUL, 2017

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANILABİLECEK FONKSİYONEL
POLİMERİK YAPILARIN HAZIRLANMASI**

Gözde Deveci tarafından hazırlanan tez çalışması 05.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Muhammet Ü. Kahveci
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Muhammet Ü. Kahveci
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Binnur Aydoğan Temel
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. M. Murat Özmen
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün YULAP_2016-07-04-YL11 numaralı projesi ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun 2150139 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmamda bilimsel katkılarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimi ile her daim yol gösteren, değerli hocam Doç. Dr. Muhammet U. KAHVECİ' ye,

Attığım her adımda destekçim olan annem Nermin DEVECİ ve babam Enver DEVECİ'ye,
Çalışma Grubumdaki çok değerli arkadaşlarım Sinem SİPAHİOĞLU ve Mustafa Yasin ATEŞ'e Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'ndeki tüm hocalarıma,

Yüksek lisans tezimi hazırlama sürecimde benden yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Mayıs, 2017

Gözde DEVECİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez.....	3
BÖLÜM 2	
FONKSİYONEL POLİMERLER	4
2.1 Uyarılara Yanıt Oluşturan Polimerler.....	4
2.1.1 Sıcaklığa Duyarlı Polimerler	5
2.1.2 pH'a Duyarlı Polimerler.....	5
2.1.3 Işığa Duyarlı Polimerler	7
2.1.4 Glukoza Duyarlı Polimerler	8
2.1.5 Alan Duyarlı Polimerler	9
2.2 Biyoaktif Polimerler	10
2.2.1 Protein-Polimer Konjugatları	11
2.2.1.1 Polimer-Protein Konjugasyon Stratejileri	13
2.3 Kontrollü Yaşayan Polimerizasyon Yöntemleri	15

2.3.1	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP).....	16	
2.4	Polimerizasyon Stratejileri	19	
2.4.1	Süspansiyon Polimerizasyonu.....	19	
2.4.2	Emülsiyon Polimerizasyonu	20	
2.4.2.1	Mini Emülsiyon Polimerizasyonu	21	
2.5	Fonksiyonel Polimerik Yüzeyler	22	
2.5.1	Hibrit Yüzeyler.....	22	
2.5.2	Polimerik Küreler	24	
2.6	Fonksiyonel Polimerlerin Biyomedikal Uygulamaları	25	
2.6.1	Tıbbi Tanıda Kullanılan Polimerik Sistemler.....	25	
2.6.1.1	Biyosensör Sistemleri	25	
2.6.1.2	Görüntüleme Sistemleri	27	
2.6.1.3	Tanı kitleri	28	
2.6.2	Polimerik İlaç Salım Sistemleri	28	
BÖLÜM 3			
DENEYSEL BÖLÜM.....			30
3.1	Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	30	
3.1.1	Kullanılan Kimyasallar	30	
3.1.2	Kullanılan Cihazlar.....	30	
3.1.2.1	NMR.....	30	
3.1.2.2	UV-Vis Spektroskopisi.....	30	
3.1.2.3	SEM	31	
3.1.2.4	Bradford Testi	31	
3.1.2.5	Yüzey Temas Açılı Ölçüm Cihazı	31	
3.1.2.6	FT-IR.....	31	
3.1.2.7	Floresans Mikroskobu	32	
3.2	Biyoaktif Polimer-Cam Hibrit Yüzeylerin Hazırlanması.....	32	
3.2.1	Amin Fonksiyonlu Cam Yüzeylerin Oluşturulması	32	
3.2.2	Brom Fonksiyonlu Cam Yüzeylerin Oluşturulması	32	
3.2.3	SI ATRP Yöntemi ile Cam Yüzeylerin Kovalent Bağlı Polimerler ile Kaplanması.....	32	
3.2.4	Polimer Fonksiyonlu Cam Yüzeyler ile Con A Konjugasyonu.....	33	
3.2.5	GFP <i>E. coli</i> JM109 hücreleri.....	33	
3.2.6	Con A Dekore Edilmiş Polimer Fonksiyonlu Cam Yüzeyler ile <i>E. coli</i> 'nin Tespit Edilmesi	33	
3.3	Polimerik Küreler	34	

3.3.1	Polimer Saçaklı Mikroküre Sentezi	34	
3.3.1.1	Brom fonksiyonlu mikro kürelerin sentezi	34	
3.3.1.2	Küresel Polimer Üzerinde SI-ATRP ile Süksinimidil İçeren Polimer Saçaklarının Hazırlanması	34	
3.3.1.3	Saçaklı Küresel Polimere Concanavalin A Konjugasyonu	35	
3.3.1.4	Concanavalin A Konjuge edilmiş P(PEGMA-co-NMAS) Saçaklı Polimerik Küreler ile GFP eksprese eden E.Coli Hücrelerinin Belirlenmesi	35	
3.3.1.5	Işıktta Parçalanır Mikro ve Nanokürelerin Sentezi	36	
3.3.1.6	Süspansiyon Polimerizasyonu Yöntemiyle Işıktta Parçalanabilir Mikroküre Sentezi.....	36	
3.3.1.7	Miniemülsiyon Polimerizasyonu ile Işıktta Parçalanabilir NanoküreSentezi.....	37	
3.3.1.8	Mikro ve Nanokürelerin Işık Etkisi ile Parçalanma Çalışması	37	
BÖLÜM 4			
SONUÇ VE ÖNERİLER			38
4.1	Biyoaktif Polimer-Cam Hibrit Yüzeyler.....	38	
4.2	Polimerik Saçaklı Mikroküre Sentezi.....	42	
4.3	Işıktta Parçalanır Mikro-Nano Küre Sentezi	49	
KAYNAKLAR.....			59
ÖZGEÇMİŞ.....			63

SİMGE LİSTESİ

°C Santrigrat Derece
 λ Işığın Dalga Boyu



KISALTMA LİSTESİ

AAC	Akrilik asit
AAM	Akril amit
AIBN	Azobisizobutironitril
APTES	3-Aminopropiltrietoksisilan
BBEMA	2(2-Bromobütürlloksi)etil metakrilat
Con A	Concanavalin A
DEAM	N,N dietil akrilamit
DHPMA	3-dihidroksi propil metakrilat
DMAEMA	N,N dimetil aminoetil metakrilat
E.coli	Escherichia coli
EDC	Etil dimetil aminopropil karbodiimid
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Infrared
GFP	Yeşil fluoresans protein
GO	Grafen Oksit
H1 NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
HPMA	N-(2-hidroksipropil)metakrilamit
NIPAM	N-izopropilakrilamit
NMAS	N-metkrilamido suksinimid
NPNIPAAm	Poli(N-izopropilakrilamit)
NVCI	N-vinil kaprolaktam
PAMAM	Poli(amidoamin)
PCL	Polikaprolakton
PEG	Poli etilen glikol
PEGMA	Poli(etilen glikol) metakrilat
PEI	Polietilenimin
PHPMA	Poli(N-(2-hidroksipropil)-metakrilamit))
PLA	Polilaktik asit
PMAA	Polimetakrilik asit
PMDETA	Pentametildietilentriamin
Poli(PEGMA-co-NMAS)	Poli etilen glikol-co-N- N- metkrilamido suksinimid)

SEM
SI-ATRP

Taramalı elektron mikroskobu
Yüzey Başlatıcılı Atom transfer radikal polimerizasyonu



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1	Genel Biyokonjugasyon Şeması	10
Şekil 2. 2	Protein-Polimer Konjugatları için gerçekleştirilen yüzeye aşılama (grafting to), yüzeyden aşılama (grafting from) ve içine aşılama (grafting through) konjugasyon mekanizmaları	15
Şekil 2. 3	Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu Mekanizması.....	16
Şekil 2. 4	Süspansiyon Polimerizasyon Mekanizması.....	19
Şekil 2. 5	Süspansiyon Polimerizasyonu Basamakları	20
Şekil 2. 6	Mini-emlsiyon Polimerizasyon Mekanizması.....	22
Şekil 4. 1	Concanavalin A ile dekore edilmiş Polimer Fonksiyonlu Hibrit Cam Yüzeylerin Sentez Basamakları.....	39
Şekil 4. 2	A)Herhangi bir işlem uygulanmamış cam yüzeyin temas açısı ölçüsü, (B) –OH fonksiyonlu cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü, (C) –NH ₂ fonksiyonlu cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü, (D) Brom fonksiyonlu cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü, (E) Polimer saçaklı cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü.....	40
Şekil 4. 3	a) Con A konjuge edilmiş cam yüzey, b) brom fonksiyonlu cam yüzey c) PEGMA- süksinimidil ester fonksiyonlu saçaklar bulunduran cam yüzey. ..	40
Şekil 4. 4	a) GFP içeren E.Coli ile muamele edilmiş cam yüzey (pozitif kontrol), b) E.Coli ile muamele edilmiş ve yıkanmış cam yüzey, c) E.Coli ile muamele edilmiş ve yıkanmış P(PEGMA-co-NMAS) fonksiyonlu cam yüzey, d) E.Coli ile muamele edilmiş ve yıkanmış P(PEGMA-co-NMAS) fonksiyonlu Con A ile dekore edilmiş cam yüzey.....	41
Şekil 4. 5	Concanavalin A ile konjuge edilmiş Polimer Kaplı hibrit cam yüzeyin konjugasyon kimyası	42
Şekil 4. 6	Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin ışık mikroskobu görüntüleri.....	43
Şekil 4. 7	Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin (A) ve bu kürelerin PEGMA, NMAS kopolimerizasyonu ile yüzeyi modifiye edilen polimerlerin (B) FT-IR spektrumları.	43
Şekil 4. 8	Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin farklı büyütme oranlarında taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.	44
Şekil 4. 9	ATRP ile yüzeyinde P(PEGMA-co-NMAS) saçaklar oluşturulan mikro kürelerin farklı büyütme oranlarında taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.	45

Şekil 4. 10	Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Concanavalin A çözeltilerinin 400-700 nm aralığında alınan UV-Vis spektrumları. Kör numune olarak su kullanılmıştır.....	46
Şekil 4. 11	Concanavalin A'nın Bradford Testi için hazırlanan kalibrasyon eğrisi	46
Şekil 4. 12	Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin (a), bu bromo fonksiyonel kürelerden ATRP ile elde edilen saçaklı kürelerin (b) ve saçaklı polimere Concanavalin A konjugasyonu sonrası elde edilen kürelerin (c ve d) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.	47
Şekil 4. 13	Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin (A) ve bu kürelerin PEGMA, NMAS kopolimerizasyonu ile yüzeyi modifiye edilen polimerlerin (B) FT-IR spektrumları.	48
Şekil 4. 14	Con A ile dekore edilmiş polimerik saçaklı kürelerin GFP ekspres eden <i>E.coli</i> ile muamelesi sonucu floresans mikroskoptaki görüntüleri	49
Şekil 4. 15	Işıқта parçalanır mikro ve nano kürelerin sentez ve foto parçalanma basamakları	49
Şekil 4. 16	Passerini Reaksiyonu ile ışıkta parçalanır çapraz bağlayıcı sentezi.....	44
Şekil 4. 17	Işıқта parçalanır çapraz bağlayıcı (C), mikroküre (B) ve nanokürenin (A)FT-IR Spektrumu.....	50
Şekil 4. 18	UV Işıқта parçalanır çaprazbağlayıcının FT-IR analizi	51
Şekil 4. 19	Işıқта parçalanır çapraz bağlayıcının UV spektroskopisindeki degradasyon öncesi (Siyah eğri) ve bir saat degradasyon sonrası sonucu (kırmızı eğri) ..	52
Şekil 4. 20	a) 15 gün karantıkta THF içerisinde bekletilen mikroküreler ile b) 48 saat UV ışığa maruz bırakılan mikrokürelerin NMR Spektrumları	53
Şekil 4. 21	O-nitrobenzil ester fonksiyonlu çapraz bağlayıcının UV ışık altında foto parçalanma mekanizması	53
Şekil 4. 22	THF içerisindeki mikrokürelerin UV ışığa maruz bırakıldıktan sonra her altı saatteki uv spektrumu	54
Şekil 4. 23	THF içerisindeki nanokürelerin UV ışığa maruz bırakıldıktan sonra her altı saatteki uv spektrumu	55
Şekil 4. 24	Işıқта parçalanır mikrokürelerin parçalanma öncesi (A1, B1) parçalanma sonrası görüntüleri (A2,B2)	55
Şekil 4. 25	Işıқта parçalanır polimerik kürelerin degradasyon öncesi ve sonrası görüntüleri, ışıkta parçalanır mikro küre öncesi (A)- sonrası (B), ışıkta parçalanır nanoküre öncesi(C)-sonrası (D)	56
Şekil 4. 26	Işıқта parçalanır mikrokürelerin parçalanma öncesi(A1,B1,C1) ve sonrası (A2,B2,C2) görüntüleri	57
Şekil 4. 27	Işıқта parçalanır nanokürelerin parçalanma öncesi(A1,B1) ve sonrası (A2,B2) görüntüleri	57

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 4. 1 Concanavalin A miktarının Bradford Testi ile belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi için hazırlanan örnekler ve konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorbens değerleri.....	45
---	----

**BIYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANILABİLECEK FONKSİYONEL
POLİMERİK YAPILARIN HAZIRLANMASI**

Gözde DEVECİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ

Fonksiyonel polimerik malzemeler ana zincir ya da yan zincirlerinde fonksiyonel gruplar bulunduran makromoleküler yapıların eşsiz bir sınıfıdır. Çevresel uyarılara yanıt oluşturabilme, biyoaktivite gibi özellikler fonksiyonel polimerlere kolaylıkla kazandırılabilen bu sebeple; ilaç salımı, sensör ve görüntüleme sistemleri gibi çeşitli biyomedikal uygulamada sıklıkla tercih edilmektedirler. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında biyomedikal uygulamalar için özgün ve yüksek kullanılma potansiyeline sahip biyoaktif fonksiyonel mikroküre ve fonksiyonel polimer-cam hibrit yüzey ile ışıkla parçalanabilir mikro-nano partikül olmak üzere üç farklı polimerik yapı sentezlenmiştir.

Tez çalışmasının ilk bölümünde poli[poli(etilen glikol) metakrilat-co-N-akrilamido süksinimid] (Poli(PEGMA-co-NMAS)) saçaklar bulunduran mikro küreler sentezlenmiş ve glukoz reaktif bir çeşit lektin proteini olan Concanavalin A ile konjugasyon gerçekleştirilerek polimerik kürelere biyoaktivite kazandırılmıştır. Son olarak biyoaktif mikroküreler bakterilerin hücre duvarındaki mannoz reseptörlerini hedefleyerek bakteri belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılmıştır. Öncelikle yüzeyinde alkil bromür gibi bir Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) başlatıcısı içerecek şekilde metil metakrilat esaslı mikroküreler, metil metakrilat, 2(2-Bromobütiriloksi)etil metakrilat (BBEMA) ve etilen glikol dimetakrilatın benzoilperoksit ile başlatılan serbest radikal süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Elde edilen brom fonksiyonlu mikroküreler PEGMA ve NMAS monomerlerinin ATRP ile kopolimerizasyonunda başlatıcı olarak kullanılmış ve yüzeyde başlatılan ATRP (SI-ATRP) ile kürelerin yüzeyinde poli(PEGMA-co-NMAS) zincirleri oluşturulmuştur. Ardından Concanavalin A, üzerine

aşılama yöntemi kullanılarak polimer saçaklarındaki amino (-NH₂) gruplarıyla süksinimidil ester gruplarının reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Süspansiyon polimerizasyonu sonrası FT-IR karakterizasyonunda elde edilen 1760 cm⁻¹ civarındaki keskin karbonil pikleri ile ışık ve SEM mikroskobunda görülen 20-80 µm boyutundaki pürüzsüz küreler çalışmanın ilk aşmasının başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Sentezlenen brom fonksiyonlu küreler yüzey başlatıcılı atom transfer radikal polimerizasyonu için başlatıcı olarak kullanılmış ve bu başlatıcı üzerinden PEGMA ve NMAS monomerlerinin polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yine FT-IR spektrumundan elde edilen verilere göre 3600 cm⁻¹ civarında görülen -OH bandının oluşması, 1782 cm⁻¹ ve 1811 cm⁻¹ civarında iki yeni karbonil bandı ile 1100 cm⁻¹ civarında örülen eterik bandların görülmesi küresel polimerin başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir. Saçaklı küresel polimerlerin sahip olduğu amin reaktif NHS grupları ile bir çeşit lektin proteini olan Concanavalin A konjuge edilmiş ve Protein polimer konjugasyonu ise Bradford testi kullanılarak belirlenmiştir. Daha sonra kürelerin bakteri tespitinde kullanıma potansiyelleri yeşil floresans proteini (GFP) eksprese eden *E.coli*'lerin belirlenmesinde test edilmiştir. Floresans mikroskobunda görülen ışımaya yoğunluğundaki değişme bu çalışmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ispatlamıştır.

Tez kapsamındaki bir diğer bir çalışma olan fonksiyonel hibrit cam yüzeylerin hazırlanması için, cam yüzeyler sırasıyla Piranha Çözeltisi, 3-amino propil trietil siloksan (APTES) ve 2-bromobütünil bromür - trietil amin solüsyonlarıyla muamele edilerek brom fonksiyonlu cam yüzeyler elde edilmiştir. Ardından fonksiyonel küresel polimer çalışmasında belirtilen yaklaşıma benzer olarak SI-ATRP ve Concanavalin A konjugasyonu uygulanmış ve Concanavalin A bulunduran polimer kaplı cam yüzeyler elde edilmiştir. Her aşamadan sonra cam yüzeyler sırasıyla -OH, -NH₂, -Br grupları ve poli(PEGMA-co-NMAS) polimerik saçaklarla fonksiyonlandırılmış ve temas açısı ölçüm cihazı ile elde edilen 68,046°, 21,38°, 56,22°, 80,63° ve 66,65° açı değerleri fonksiyonlandırma işleminin başarısını kanıtlamıştır. Ayrıca FT-IR spektrumunda 1734 cm⁻¹'de poli(PEGMA)'nın karakteristik piklerinden biri olan -C=O- bantlarının polimer fonksiyonlu ve Con A konjugatı bulunan camlarda görülmesine karşın brom grupları içeren camlarda gözlenmemesi, yine polimer saçaklı ve Con A konjugatlı camlarda 1500 cm⁻¹ civarında görülen -N-O- bandı başarılı bir sentez olduğunu desteklemektedir. Diğer çalışma ile benzer şekilde hücre tesbiti çalışması GFP *E. coli* ile gerçekleştirilmiş ve floresans mikroskobunda elde edilen yoğun ışımaya yüksek afinite de bakterilerin yüzeye bağlandığını ispatlamıştır.

Son olarak tez çalışmasında ışıkta parçalanabilir mikro ve nano polimerik küreler sentezlenmiş ve parçalanma eğilimleri incelenmiştir. Bunun için 1,6-diizosiyoheksan, 2-nitrobenzaldehit ve akrilik asit reaktiflerinin Passerini Reaksiyonu ile o-nitro benzil ester fonksiyonlu çapraz bağlayıcı sentezlenerek mikropartikül için süspansiyon, nanopartikül için mini-emülsiyon polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir ve o-nitrobenzil ester fonksiyonlu çapraz bağlayıcı FT-IR ve ¹H NMR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Işıktaki parçalanır çapraz bağlayıcının FT-IR spektrumunda 1530 cm⁻¹ ve 1350 cm⁻¹ 'deki pikler çapraz bağlayıcıda bulunan nitro gruplarını göstermektedir. Ek olarak 1730 cm⁻¹ daki pik C=O bağlarını, 1200 cm⁻¹ daki pik ise çapraz bağlayıcının ucunda bulunan alken gruplarını temsil etmektedir. ¹H NMR spektrumuna bakıldığında ise 7,81 ve 8,04 ppm arasındaki 4 pik aromatik grupları temsil ederken molekülün sonunda bulunan çift bağ

6,73 ppm de görülmüştür. H NMR ve FT-IR spektrumlarından elde edilen sonuçlar çaprazbağlayıcının başarılı bir şekilde sentezlendiğini desteklemiştir. Mikro ve nanoküreler SEM ile görüntülendiğinde mikroküreler için yaklaşık 60 µm nanoküreler içinse 600 nm.'lik boyurlara sahip pürüzsüz kürelerin elde edildiği görülmüştür. Bu çalışmanın son basamağında ise yaklaşık 350 nm.'lik UV ışık altında polimerik kürelerin parçalanma çalışması gerçekleştirilmiş UV spektroskopisinde her altı saat için parçalanmış kürelerin absorbanısındaki değişim incelenmiştir. Degradasyon sonrası kromoforik gruplardaki artış sonucu absorbanstaki artış ve parçalanma sonrası polimerik kürelerin SEM görüntülerindeki şekilsizlik parçalanma işleminin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.

Sentezlenen tüm fonksiyonel polimerik yapıların istenilen kimyasal ve morfolojik özelliklere sahip farklı formlarda hazırlanması tercih edilen polimerizasyon yöntemleri ile hem de kullanılan fonksiyonel gruplarla etkili bir şekilde gerçekleşmiştir. Biyoaktif polimerik küreler ile polimer-cam hibrit yüzeylerin tıbbi tanı amaçlı görüntüleme ve sensör ve kit uygulamaları için büyük bir potansiyele sahip olduğu, ışıkta parçalan kürelerin de ilaç salım istemleri için önemli bir model çalışma olduğu bu çalışmada ispatlanmıştır. Kolaylıkla modifiye edilebilir olan bu polimerik yapılar biyomedikal uygulamalar için umut vaadedicidir. Çalışma boyunca fonksiyonel yapıların karakterizasyonu ¹H NMR, Bradford Assay, FT-IR, UV Spektroskopi, ışık mikroskobu, SEM, Temas Açık Ölçüm Cihazı ve Floresans Mikroskobu ile sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fonksiyonel polimer, fonksiyonel hibrit yüzey, saçaklı küresel polimer, ışıkta parçalanır polimer, biyoaktif polimer, polimer-protein konjugatları

**PREPARATION OF UTILIZABLE FUNCTIONAL POLYMERIC STRUCTURE IN
BIOMEDICAL APPLICATIONS**

Gözde DEVECİ

Department of Bioengineering

Master Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammet KAHVECİ

Functional polymeric materials are one of the unique class of macromolecules that carry functional groups on the main chain or side chain. Several properties such as stimuli responsiveness or bioactivity can be gained easily to functional polymers, therefore these polymers often have been preferred especially for biomedical applications like drug delivery, sensors or bioimaging systems. In this thesis, a bioactive functional polymeric microspheres, a bioactive polymer-glass hybrid surface, and photodegradable micro-nano particles had been synthesized, such materials would have high potential for biomedical applications.

In the first part, microspheres that have poly(PEGMA-co-NMAS) dangling chains on the surface were synthesized and mannose reactive, kind of lectin protein Concanavalin A was conjugated to hairy polymer spheres leading to bioactivity. In the last step, bioactive microspheres were employed in targeting sugar molecules on the cell surface receptors of bacteria effectively. During the preparation of bioactive polymeric microspheres, methyl methacrylate-based microspheres containing bromo functionality as an Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) initiator were synthesized by free radical suspension copolymerization of methyl methacrylate, 2(2-bromobutyryloxy)ethyl methacrylate (BBEMA), ethylene glycol methacrylate in the presence of benzoyl peroxide. Copolymerization of poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) and N-meth acryl amido succinimide (NMAS) monomers on bromo functional polymeric microspheres was performed via surface initiated ATRP (SI-ATRP) yielding an amine reactive polymeric surface. Next, Concanavalin A, was conjugated to the

polymer surface via grafting to conjugation method. Bacterial detection efficiencies of the Concanavalin A conjugated microspheres were analyzed using GFP expressing *E. coli* as a model bacterium. Regarding characterization of the polymers and the conjugates, first FT-IR analysis was carried out. Strong carbonyl bands around 1760 cm^{-1} which were observed in FT-IR spectrum after suspension polymerization. SEM and light microscopy analyses revealed that the microspheres had a smooth texture on the surface and 20-80 μm diameter. Bromo functional microspheres were used as SI-ATRP initiator and PEGMA and NMAS monomers were polymerized over bromide functional microspheres. The FT-IR spectrum of hairy microspheres showed that a characteristic -OH band around 3600 cm^{-1} , two new carbonyl bands around 1782 cm^{-1} and 1811 cm^{-1} and an etheric band around 1100 cm^{-1} ; all these results proved successful modification. Concanavalin A was conjugated onto polymeric microspheres through amine-reactive NHS groups located on hairy polymeric chains of the microspheres and amount of Concanavalin A conjugated was detected via Bradford assay.

The second study of the thesis is preparation of polymer-glass hybrid surfaces. Firstly, the glass surface has been treated with Piranha Solution, (3-aminopropyl) tetraethoxysilane, and 2-bromo-butyrylbromide-triethylamine solution, to obtain bromide functionalized surface initiator. Successively, SI-ATRP and Concanavalin A conjugation was performed similar to previous work. After each modification step -OH , -NH_2 , -Br and poly(PEGMA-co-NMAS) hairy surfaces were obtained respectively and contact angle measurement results were observed as $21,38^\circ$, $56,22^\circ$, $80,63^\circ$ ve $66,65^\circ$ each step. Moreover, untreated glass surface, bromo functional glass surface and polymeric hairy glass surfaces were examined via FT-IR spectroscopy. As a result of this study, while a characteristic feature of poly(PEGMA), -C=O- bands had been seen around 1734 cm^{-1} for polymeric hairy surfaces and Concanavalin A conjugated surfaces, Bromide functional glass surfaces did not have this peak on the spectrum. In addition, N-O- band around 1500 cm^{-1} in the spectrum of Concanavalin A conjugated glass surfaces proved successful synthesis. Concanavalin A conjugated microspheres were also employed in bacterial detection as well.

In the last part of the thesis, photo-cleavable micro/nano particles were synthesized and degradation of these spheres was examined. Passerini Reaction of 1,6-diisocyanohexane, 2-nitrobenzaldehyde, and acrylic acid yielded a diacrylate with o-nitrobenzyl ester moieties. Next, microspheres and nanospheres were synthesized via suspension and mini-emulsion polymerization, respectively. The characterization of the crosslinker and the resulted micro/nano spheres was analyzed via FT-IR and ^1H NMR spectroscopy. FT-IR spectra showed that cross-linkers displayed bands at 1530 cm^{-1} and 1350 cm^{-1} which implies that the cross-linker contains nitro groups. In addition, the band at 1730 cm^{-1} is attributed to C=O , and the band around 1200 cm^{-1} represents alkene end groups in cross-linker compounds. In the NMR spectrum, four peaks between 7,81 and 8,04 ppm represents aromatic groups. All spectroscopic analysis proved successful preparation. Polymeric microspheres and nanospheres diameter were determined 60 μm and 600 nm approximately via SEM microscopy. Finally, photo-degradation of polymeric spheres was examined for six hours intervals under UV light via UV spectroscopy. After degradation, spherical polymers were disintegrated and changed soft shapeless form observed by SEM.

Preparation of various functional polymeric structures with various topology and various functionalities have been performed successfully through different synthetic approaches. Bioactive polymeric spheres and polymer-glass hybrid surfaces have big potential for bioimaging, sensors and kits. Photocleavable spheres are important for drug delivery systems. These polymeric structures are easy to modify, thus each one shows big potential for biomedical applications.

Keywords: Functional polymer, functional hybrid surface, hairy polymeric microsphere, photodegradable polymeric micro-nanospheres , bioactive polymers, polymer-protein conjugates



1.1 Literatür Özeti

Fonksiyonel polimerler, biyosensörler, ilaç salım sistemleri, moleküler görüntüleme gibi birçok tanı ve tedavi sistemleri için sıklıkla kullanılan makromoleküler yapılardır. Çok çeşitli fonksiyonel polimerler içerisinde çevresel uyarılara yanıt oluşturan polimerler ile biyoaktif polimerler büyük önem taşımaktadır. Çevresel uyarılara yanıt oluşturan polimerlerde sıcaklık, pH, ışık, manyetik alan, elektrik alan ve glukoz konsantrasyonu gibi çeşitli çevresel faktörlerin değişmesi sonucu çözünmeme/çökme, bozunma, ilaç salımı, hidratlanma düzeyinde değişim, şişme/yığın oluşturma, hidrofilik/hidrofobik yüzey, şekil değişimi, komformasyon değişimi ve misel oluşturma gibi yanıtlar meydana gelmektedir [1]. Bu özelliklerden faydalanarak ilaç salımı, doku mühendisliği, hücre kültürü, biyo-ayırma ve sensör sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [2]. Biyoaktif polimerler ise ilaç, protein veya peptit gibi biyoaktif moleküllerin polimerlere kovalent olarak tutturulmasıyla oluşturulan polimerik konjugatlar genellikle polimerik terapötik olarak kullanılmakta ve modern ilaç teknolojilerinde büyük önem taşımaktadır [3]. Polimer protein/peptit konjugatları temel olarak üzerine aşılama, üzerinden aşılama ve içine aşılama (grafting through) teknikleriyle gerçekleştirilir [4]. Bu fonksiyonel polimerlerin sentezlenebilmesi için en çok tercih edilen yöntemlerden biri kontrollü yaşanan polimerizasyon yöntemlerinden biri olan Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)'dur. ATRP çok yönlü kontrollü radikal polimerizasyon yöntemlerinden biridir. Bu yöntem moleküler ağırlığı, monodispers moleküler ağırlık dağılımı ve fonksiyonellik üzerinde bir kontrol sağlar [5]. ATRP'nin yanında özellikle mikro ve nano boyutlu polimerik kürelerin sentezi için süspansiyon ve miniemülsiyon polimerizasyonu gibi

çeşitli polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır [6]. Bir polimerin çevresiyle ilk temasa geçtiği bölge yüzeyidir. Bu sebeple yüzey fonksiyonlandırma büyük önem taşır. Biyoaktif ya da çevresel uyarılara yanıt verecek şekilde kontrollü polimerizasyon yöntemleri ya da polimerizasyon teknikleri ile mikroküre yapılı ya da altın, cam ya da silikon gibi farklı inorganik yüzeylerin fonksiyonlandırılabilmesi mümkündür. Elde edilen bu fonksiyonel yüzeyler özellikle biyosensör, biyogörüntüleme ve tanı kitleri için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır [7].

1.2 Tezin Amacı

Bu tezde polimerlere dayalı farklı üç fonksiyonel malzemenin hazırlanması amaçlanmıştır. Tez kapsamında geliştirilen bu malzemeler polimer kaplı hibrit cam yüzeyleri, ışıkla parçalanabilir mikro/nano boyutlu küresel polimerik yapıları ve yüzeyi protein ile dekore edilmiş mikroküreleri içermektedir. Tüm bu geliştirilmesi hedeflenen yapılar biyomedikal uygulamalarda potansiyel olarak kullanılacak malzemeler olup fonksiyonel polimerlere dayanmaktadır.

Tezin amaçlarından biri fonksiyonel cam yüzeylerin, SI-ATRP ile PEGMA ve NMAS monomerlerinin kopolimerizasyonu sonucu elde edilmesidir. Bu doğrultuda, yaygın olarak kullanılan silanlama işlemi ile cam yüzeyde amin fonksiyonu ve bu amin grupları vasıtasıyla ATRP başlatıcı gruplar oluşturulacaktır. Elde edilen yüzeyler, tanı amaçlı protein immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Bunun için poli(PEGMA-co-NMAS) polimerik saçaklara Concanavalin A konjuge edilmiş biyoaktif cam yüzeyler elde edilmiştir.

Benzer şekilde SI-ATRP ile yüzeyinde saçaklı poli(PEGMA-co-NMAS) yapıları içeren polimerik yüzeyler tasarlanmıştır. İlk olarak süspansiyon polimerizasyonu ile brom fonksiyonlu poli (metil metakrilat) mikroküreleri elde edilmiştir. Kürelerin yüzeyinde bulunan brom uçları polimer kaplı hibrit cam yüzeylerde olduğu gibi başlatıcı olarak kullanılmış yüzey başlatıcılı atom transfer radikal polimerizasyonu yöntemi ile PEGMA ve NMAS 'ın blok kopolimeri oluşturulmuştur. Polimerik saçaklara Concanavalin A'nın üzerine aşılama yöntemi ile bağlanması etkili fonksiyonel malzemelerin elde edilmesi için geliştirilen önemli bir yoldur. Bu çalışmada Concanavalin A'nın *E.coli* hücrelerine olan afinitesi tanı sistemlerinde kullanmak için sahip olduğu potansiyeli göstermektedir.

Son olarak, *o*-nitrobenzil ester fonksiyonlu ışıktta parçalanabilir mikro ve nano boyutlu polimerik küreler sırasıyla süspansiyon polimerizasyonu ve miniemülsiyon polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Bu çalışmanın önemli noktası 1,6-diizosiyanohekzan, 2-nitrobenzaldehit ve akrilik asit reaktiflerinin Passerini reaksiyonu ile ışıktta parçalanır çapraz bağlayıcı oluşturulmasıdır. Passerini reaksiyonu ile kolay ve daha az basamakta fonksiyonlandırma gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Son olarak polimerik partiküllerin ışıktla parçalanma çalışması ilaç salımı için umut vaadedici sonuçlar ortaya koymuştur.

1.3 Hipotez

Çeşitli morfolojilerde (küre, yüzey, mikro-nano boyutlu partiküller gibi) ve fonksiyonellikte (pH, protein, DNA, elektrik alan glukoz, enzim, ışık, vb.) polimer elde etmek mümkündür. Gerçekleştirilen çalışmada poli(PEGMA-co-NMAS) polimeri ile kaplı cam yüzey ile poli(PEGMA-co-NMAS) saçaklara sahip mikro küreler oluşturulacaktır. NMAS monomeri NHS grubu bulduran bir polimerdir ve bu grubun NH₂ grubu ile konjugasyon gerçekleştirdiği bilinmektedir. Bu çalışmada Concanavalin A proteininin üzerindeki NH₂ grupları sayesinde polimere konjugasyon gerçekleştirilmiş ve Concanavalin A'nın *E. coli* hücrelerine olan afinitesi sistemin tanı sistemleri için sahip olduğu potansiyeli göstermektedir. Ayrıca NH₂ grubu bulduran herhangi bir protein, peptit ilaç ya da hücre polimere konjuge edilerek kolayca farklı hastalıkların tanısı için sistem modifiye edilebilecektir. Tez çalışmasında sentezlenen diğer bir fonksiyonel polimer ışıktta parçalanır *o*-nitro benzil ester grubu bulduran mikro ve nano yapıları partiküllerdir. Bu partiküllerin UV ışık altında parçalanması araştırılmıştır. Ancak literatür *o*-nitro benzil ester gruplarının NIR ışık altında da parçalanabildiğini göstermiştir[8]. Sentezlenen mikro ve nano partiküllerin NIR'a maruz bırakılarak kontrollü bir şekilde parçalanacağı beklenmektedir. Ayrıca bu sistemlerin içerisine ilaç yüklenerek hem UV hem de NIR ışık altında etkili bir salım yapması potansiyeldir.

FONKSİYONEL POLİMERLER

Bilinen tüm polimerler, yapısal uygulamalarına göre temel gruplara ayrıldığında spesifik fonksiyonlara sahip olanların diğerlerine göre üstün özelliklerinin olduğu görülmektedir. Fonksiyonel polimerler olarak adlandırılan bu eşsiz makromoleküler yapılar polimer biliminin ilk yıllarından beri yoğun şekilde çalışılan bir konudur. İlk sentetik fonksiyonel polimer 20. yy'nin ilk dönemlerinde ortaya çıkmıştır. Bu polimerler serbest radikal ya da zincir büyüme polimerizasyonu gibi standart polimerizasyon yöntemleriyle sentezlenmiştir. Günümüz sentetik teknolojisi, polimerlerin yapısı, fonksiyonelliği, molar kütlesi, yoğunluğu ve istenilen özelliğin eklenebilmesi için çok daha kontrollü polimerlerin sentezlenmesine izin vermektedir. Fonksiyonel polimerler, polimerin mekanik özelliklerinin ötesinde çok çeşitli uygulamalara uyarlanmasına odaklanır. Çevresel uyarılara yanıt oluşturan polimerler, biyoaktif polimerler ve hibrit polimerik yapılar fonksiyonel polimerlerin önemli çeşitleridir [9].

2.1 Uyarılara Yanıt Oluşturan Polimerler

Uyarılara yanıt oluşturan polimerler, çevresel uyarılarda meydana gelen bir değişiklik sonucunda özelliklerini değiştirerek, biyolojik sistemleri taklit eden polimerlerdir. Bu değişim; komformasyon, çözünürlük değişimi, hidrofilik/hidrofobik dengesinde değişim ya da biyoaktif molekülün salımı şeklinde görülebilir. Ayrıca birden fazla yanıtın kombinasyonunu da içerebilmektedirler. Tipik uyarılar; sıcaklık, pH, elektrik alan, ışık, manyetik alan, elektrolit ya da glukoz konsantrasyonudur. Bu uyarılara karşı çözünmeme/çökme, bozunma, ilaç salımı, hidratlanma düzeyinde

değişim, şişme/yığın oluşturma, hidrofilik/hidrofobik yüzey, şekil değişimi, komformasyon değişimi ve misel oluşturma gibi yanıtlar meydana gelmektedir [10]. Diğer bir yaklaşım da çevresel uyarılara yanıt veren polimerleri fiziksel yapılarına göre sınıflandırmaktır: solventte serbest zincir formuna geçen polimerler, yüzeye aşılınmış polimerik zincirler, kovalent bağlarla çapraz bağlanmış jeller ile tersinir ya da fiziksel jeller örnek olarak verilebilir [11]. Son yıllarda çevresel uyarılara yanıt oluşturan polimerlerin gelişmiş tasarımları biyomedikal uygulamalar için birçok fırsat oluşturmuştur. Şekil, yüzey özellikleri, çözünürük, sol-jel geçişleri, kendinden katlanabilme gibi özelliklerle çevresel uyranlara yanıt oluşturan polimerler ilaç salımı, doku mühendisliği, hücre kültürü, biyo ayırma ve sensör sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır [12].

2.1.1 Sıcaklığa Duyarlı Polimerler

Sıcaklığa duyarlı polimerler, belirli bir sıcaklıkta çözünme durumundayken ani bir hacim-faz geçişi sergiler. Bu polimerler, belirli bir sıcaklığın altında, alt kritik çözünme sıcaklığına sahiplerken; belirli bir sıcaklığın üzerinde çözünür olan polimerler ise üst kritik çözünürlük sıcaklığına sahiplerdir. Hacim-faz geçişine sebep olan hidrasyon durumundaki değişim, polimer moleküllerinin moleküller arası hidrojen bağı yapma rekabetini kıyaslamaktadır. Termodinamik, bunu ayrışma prosesi nedeniyle oluşan entropik etki ve polimer içerisindeki su moleküllerinin düzen yatkinliği arasındaki denge ile açıklayabilmektedir. Geçiş, yumak halinden küre haline geçiş ile gerçekleşir. Hem alt kritik çözünme sıcaklığı hem de üst kritik çözünme sıcaklığına sahip polimerik sistemler bulunmakta, ancak biyomedikal uygulamalar için tercih edilmemektedir. Tipik alt kritik çözünme sıcaklığına sahip polimerlere, monomer olarak *N*-izopropilakrilamit (NIPAM), *N,N*-dietil akrilamit (DEAM), metil vinileter ve *N*-vinil kaprolaktam (NVCİ) verilebilir. Tipik bir üst kritik çözünme sıcaklığına sahip sistemler ise akril amit (AAM) ve akrilik asit (AAc) kombinasyonlarını temel alır [10], [11].

2.1.2 pH'a Duyarlı Polimerler

İyonlaşabilen fonksiyonel grüplara sahip polimerlerin pH değişimlerine yanıt vermesi ile pH'a duyarlı polimerler oluşur. Polimer ana zinciri boyunca yük oluşturulmasıyla

elektrostatik itme sonucu polimerin hidrodinamik hacminde artış meydana gelir. Poliakrilik asit, poli(metakrilik asit) (PMAA), polietilen imin, poli L-lisin ve poli(*N,N*-dimetil aminoetil metakril amit) pH'a duyarlı polimerlerin tipik örnekleridir. Vücudumuzdaki pH değişimini düşündüğümüzde gastrointestinal kanal pH' a duyarlı polimerlerin kullanılabileceği önemli bir alandır. Gastrik pH 2 iken intestinal pH 7.4-7.8 arasındadır [13]. PMAA ve poli etilen glikol (PEG) düşük pH'de PMAA'dan gelen karboksilik asitteki hidrojen bağları ve PEG' de bulunan eter grupları sayesinde kompleks oluştururlar. PMAA aşılmiş PEG kopolimeri intestinde kalsitonin salımı için incelenmiştir. Bu sistemde kalsitonin salımı kontrollü bir mekanizmayla gerçekleştirilmiştir. Son yıllarda pH'a duyarlı sistemler gen salımı ve gen terapisi çalışmalarında büyük ilgi görmektedir. Çıplak DNA' nın hücreye taşınımında DNA'nın büyük boyutlu olması ve negatif yükü sebebiyle zorluklar yaşanmaktadır. Bu sebeple pozitif yüklü polimerler DNA' nın dış yükünü dengede tutmak ve -100 nm.'lik partikül boyutunda sabitlemek için bu polimerler kullanılır. Bu amaç için poli(L-lizin), poli(etilen imin) ve amin içeren dendrimerler araştırılmaktadır. DNA polimer nanopartiküllerin taşıma mekanizması reseptör aracılı endositoz olarak düşünülebilir. Endositoz boyunca endozomun pH' ı 5-6' ya düşer. Ardından endozom golgiden salgılanan nükleaz gibi sindirim enzimi içeren öncül lizozomla birleşir. Çekirdeğe DNA taşınımını arttırmak için lizozomal füzyondan önce endozomdan kaçılmalıdır. Bu sebeple poli L lizin aşılı polihisitidin DNA taşınımı için gerekli membran füzyon polimeri tasarımlarından biridir [14]. Hidrazon bağı ilaç salım uygulamaları için sıklıkla kullanılan pH' a duyarlı bir sistemdir. Hidrazon bağı genellikle polimer ana zincirine ilaç ya da anibadi bağlar böylece terapötik ajanın minimum toksisitede ve uzun yarılanma ömrüyle hedefe taşınımını sağlar. Çeşitli *N*-(2-hidroksipropil)metakrilamit (HPMA)' i temel alan pH' a duyalı polimer ilaç konjugatı içeren hidrazon bağı kullanılmış polimerler rapor edilmiştir. HPMA ilaç konjugatları paklitaksel ve docetaksel salımı için geliştirilmiş ve nötral pH' ye göre asidik ortamdaki konjugasyonunda 3-5 kat daha hızlı salım yaptığı gözlemlenmiştir. Hidrazonun yanında asetal, orto ester ve vinil ester gibi pH 'ye duyarlı diğer gruplar da kullanılmaktadır. Örneğin; PEG-*b*-poli(etil gloksilat)-*b*-PEG, poliasetal-*b*-Pluronik ve PEG-*b*-poli(2,4,6-trimetoksibeniklidenepentaeritritol karbonat) ilaç yüklü

polimerik misellerin oluşturulmasında kullanılmış ve asidik ortamda nötral ortama göre daha hızlı salım yaptığı gözlemlenmiştir [15].

2.1.3 Işığa Duyarlı Polimerler

Polimerlerin özelliklerini değiştirmek için kullanılan geniş çeşitlilikteki uyaranlar göz önüne alındığında ışık sahip olduğu özelliklerle üstün bir noktada yer alır. Kullanılan kromoforun hassasiyetine göre ışığa maruz bırakma koşulları ayarlanarak hassas bir uygulama gerçekleştirilebilir. Bu sebeple uygun dalga boyu, yoğunluk ve polarizasyon yönü seçilerek istenmeyen yan reaksiyonlar ya da reaktif olmayan grupların fiziksel etkilerinden kaçınılabılır. Ayrıca ışık temas etmeyen bir yaklaşımla uygulanabilmektedir. Işığın bu doğal özellikleri ışığa duyarlı malzemeleri kimyasal çevredeki değişimlere göre daha üstün kılmaktadır. pH, enzim konsantrasyonu ya da solvent bileşimine duyarlı bazı sistemler reaksiyonun belirli bir çevrede olmasını ya da spesifik bileşiklerin eklenmesini gerekli kılmaktadır. Işık ise kapalı reaksiyon sistemlerinde ve kuru ortamda uygulanabilir. Bunun yanında komfokal ya da holografik yöntemlerle polimerin özellikleri iyileştirilebilir. Fotoreaksiyonlar genellikle ışık varlığında gerçekleşir ve karanlıkta reaksiyon sonlanır. Bu özellik polimere kinetik olarak kontrol imkânı tanır ya da her adımda yanıt oluşturan bir mekanizma sağlar. Polimerlerde bulunan kromofor gruplar cis-trans izomerizasyonu, iyonizasyon reaksiyonları, dimerizasyon reaksiyonları, radikal formasyon ya da bağ yarıma reaksiyonları gerçekleştirerek ışığa karşı yanıt oluşturur. Özellikle ester, karbonat ve karbamat türevleri gibi o-nitro benzil ester türevleri hızlı yarıma ve $\lambda > 300$ nm olduğu için yoğunlukla çalışılmıştır. O-nitrobenzil ester içeren bağlar polimer ana zincirine ya da yan zincirlere ışığa duyarlı polimer elde edebilmek için eklenir [16], [17]. O-nitro benzil ester temelli çapraz bağlayıcılar hidrofilik poli etilen glikol zincirlerinin çapraz bağlanmasıyla oluşturulan hidrojellerde kullanılmış ve ilaç salım mekanizmaları için başarılı bir aday olduğu gözlemlenmiştir. Toro ve arkadaşları bu çapraz bağlı hidrojel sistemini 2 adımda gerçekleştirmişlerdir. İlk olarak, *tert*-bütil akrilatın atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile azid sonlu ve o-nitro benzil içeren çapraz bağlayıcı ile dört kollu yıldız polimer elde edilmiştir. İkinci basamakta, çapraz bağlanma Cu kataliz koşulları altında bifonksiyonel alkin ekleyerek CuAAC 1,2,3,-triazol bağının oluşmasıyla gerçekleşmiştir. Alternatif bir

yöntem olarak da CuAAC çapraz bağlama reaksiyonu için bifonksiyonel o-nitrobenzil ester ve tetrafonksiyonel birim kullanılmıştır. Böylece CuAAC/ATRP yöntemiyle tek basamaklı azid sonlu ışıkta parçalanır dört kollu yıldız polimer sentezlenmiştir. Çözünmeyen bu ağ yapısı UV ışık altında parçalanarak lineer duruma getirilmiş ve moleküler ağırlığı belirlenmiştir [18]. Işığa duyarlı polimerler parçalanmanın yanısıra ışığa maruz bırakıldıklarında faz geçişi de gösterirler. Bu sebeple meydana gelen ani sol-jel geçişi büyük önem taşır. Bu özellikleriyle çeşitli mühendislikler ve biyomedikal uygulamalar için avantajlıdır. Işığa duyarlı polimerler ilaç salımını başlatmada ilgi çekicidir çünkü zamansal ve boyutsal özelliklerin kontrolü sağlanabilmektedir. Bunun anlamı vücut dışarısından ışık kaynağı uygulandığında enkapsülendirilmiş ilacın salınması ya da aktif hale gelmesidir. Bu polimerlerde görülen kısıtlamalar ise kovalent bağlanmamış kromofor grupların şişme ya da büzülme yanıtlarının tutarsız olması ve hidrojelde yavaş yanıt oluşabilmesidir. Bu polimerler UV' ye ve görünür ışığa duyarlı polimerler olarak 2' ye ayrılır. Görünür ışığa duyarlı polimerler bulunabilirlik, güvenlik ve kolay kullanımları sebebiyle UV' ye duyarlı polimerlerden daha fazla tercih edilirler. Leuco- türevli molekül içeren polimerik jeller (bis (4-dimetilamino) fenilmetil lökosiyanid gibi), UV ışık uygulandığında faz geçişi gösterirler. Trifenilmetan-löko türevleri UV ışık uygulandığında trimetil fenik katyonları gibi iyon çiftlerine ayrılırlar. Bu hidrojel UV uyarana yanıt olarak şişme davranışı gösterirler ancak uyarandan ortadan kalktığında büzülürler [19].

2.1.4 Glukoza Duyarlı Polimerler

Glukoz yanıtı polimer sistemleri kontrollü insülin salımı için sahip olduğu potansiyel sebebiyle biyomedikal alanda yoğunlukla çalışılan polimerik sistemlerdir. İnsülin hormonunun metabolizma tarafından kontrolsüz olarak salımı, kan seviyesindeki insülin miktarını artırır bu da düzenli enjeksiyona bağlı şeker hastalığını ortaya çıkarır. Ancak bu tedavi ile kandaki glukoz seviyesi normal seviyede tutulamaz. Glukoz yanıtı hidrojel sistemleri kandaki glukoz konsantrasyonuna yanıt olarak kendinden düzenli insülin salımı gerçekleştirir ve insülin konsantrasyonunu normal seviyede tutar. Bu amaç için geliştirilen stratejilerden bir tanesi glukoz oksidaz, katalaz ve insülin tutturulmuş pH'a duyarlı hidrojel sistemi temel alır [20]. Örnek olarak zayıf katyonik grup

bulunduran N,N dimetil aminoetil metakrilat (DMAEMA) hidrojel, kopolimer içerisine tanıtılmıştır. 2 hidroksietil metakrilat ve DMAEMA' nın kopolimerizasyonu ile elde edilen hidrojellere glukoz oksidaz ve katalaz immobilize edilmiştir. Hidrojelin içine aşırı glukoz difüze olduğunda glukoz oksidaz glukozu glukonik aside katalizler. Glukonik asit hidrojel ağı ile pH'ı düşürür ve DMAEMA nın üçüncü amin grupları hidrojelin şişmesi sonucu protonlanır. Böylece elektrostatik itme kuvveti artar. Şişmiş hidrojeller artmış ağ yapısı ile sonuçlanır ve böylece matriksten salınan insülin miktarı artar. Hidrojen peroksitten oksijene dönüştüren katalazlar glukoz oksidasyonu için gereklidir ve glukoz oksidazın hidrojen peroksit inhibisyonunu azaltır. Çapraz bağların şişme ve salım etkisi araştırılmıştır. Fareler üzerinde gerçekleştirilen in vivo çalışmalar glukoz yanıtı insülin salım sistemlerinin kandaki glukoz seviyesini düşürmek için etkili olduğunu göstermiştir [21].

2.1.5 Alan Duyarlı Polimerler

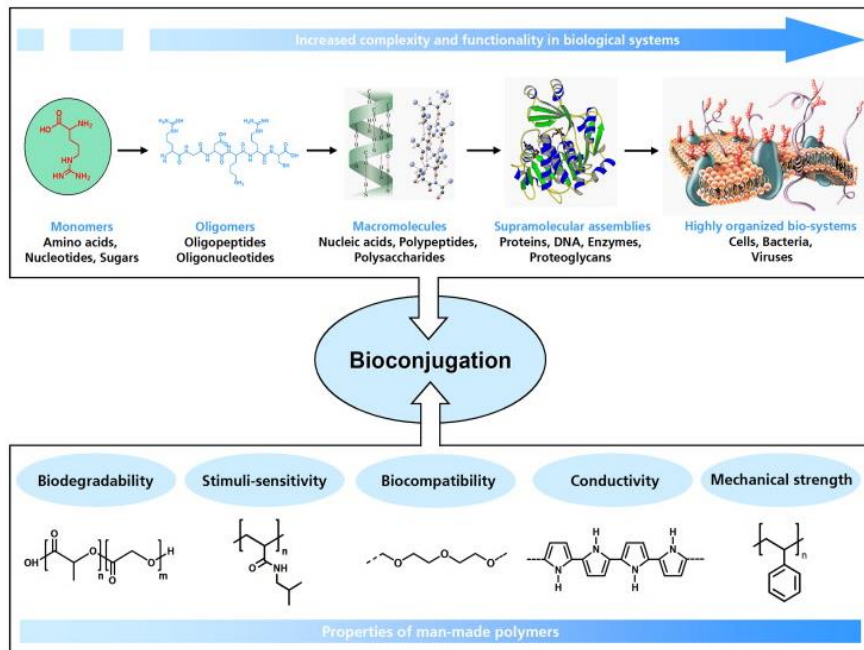
Elektrik ya da manyetik alana yanıt oluşturan polimerlerin hidrojeller çalışmalarında çevresel alan sonucu şişme büzülme bükülme gibi davranışları araştırmaktadır. Bu özelliğe sahip bazı polimerler ilaç salım sistemleri, yapay kas ya da biyomimetik başlatıcı olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada çapraz bağlı güçlü hidrojellerin elektromekanik davranışları, 1.6 V/cm dc elektrik alanda ve farklı tuz konsantrasyonlarında araştırılmıştır. Sülfonlanmış polistiren temelli kopolimer ağlarında tuz çözeltisinin içerisinde dengeye gelirken katoda doğru bir eğilme görülür. Politiofen temelli yürütücü polimer jellerin potansiyel uygulandığında kasılma/gevşeme davranışları gösterdiği rapor edilmiştir. Birçok çalışmada elektrik alan yanıtı polimerik ağların elektrik ile yürütüldüğü bilinmektedir. Diğer yandan bazı doğal polimerlerin de elektrik alana duyarlı olduğu gösterilmiştir. Zayıf çapraz bağlı polidimetil siloksan jellerde elektrik alana duyarlı TiO₂ partiküllerinin iyi dağılması sonucu silikon yağı içerisinde belirgin eğilmeler görülmüştür. Bu tür yanıt mekanizmalarında güçten etkilenerek jelden ayrılamayan partiküller jel için lokomotif görevi görür ya da jelin deformasyonuna sebep olur.

Manyetik alana duyarlı jeller çapraz bağlı PNIPAAm-co-poli(vinil alkol) hidrojelin içerisine tutturulmuş koloidal manyetik parçacıklarla elde edilmişlerdir. Bu jel

boncuklar manyetik alan içerisinde homojen düz zincir benzeri yapılar halini alırken homojen olmayan alanda yığın halinde bulunur. Bu jellerin hızlı ve kontrol edilebilir şekil değişimlerinin kas kasılmalarını taklit edebileceği düşünülmektedir [21].

2.2 Biyoaktif Polimerler

ilaç protein ve peptit gibi biyoaktif moleküllerin polimerlere kovalent olarak tutturulmasıyla oluşturulan polimerik konjugatlar genellikle polimerik terapötik olarak kullanılmakta ve modern ilaç teknolojilerinde büyük önem taşımaktadır. Polimer temelli çeşitli konjugatlar kanser, inflamatuvar hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları için kullanılmaktadır. Konjugatın polimere kovalent ya da kovalent olmayan şekilde bağlanması ile böbrekte ilaç birikiminin azaltılması, kandaki dolaşım yarı ömrünün artırılması, ilaçların toksisitelerinin azaltılması gibi avantajlar sağlamaktadır. Polimerin proteine kovalent bağlanması immünojenite ve antijenitenin azalmasını sağlarken proteinin vücuttaki yarılanma ömrünü ve terapötik stabilizasyonunu artırır. Farklı polimerik sistemler içerisinde PEG en çok çalışılan ve ticari olarak kullanılan bir sistemdir. PEG'e alternatif olarak son yıllarda poligliserol keşfedilmiş ve aşırı dallanmış poligliserol ve doğrusal poligliserol yapıları kullanılmaktadır. Aşırı dallanmış poligliserol dendrimer yapıdadır ve PEG' in tüm karakteristik özelliklerini taşımaktadır [20].



Şekil 2. 1 Genel Biyokonjugasyon Şeması [22]

2.2.1 Protein-Polimer Konjugatları

Protein-polimer konjugatları hem biyolojik hem de sentetik malzemenin eşsiz kombinasyon özelliklerini sergiler. Protein biyotanıma özelliği, hatalı ya da eksik doğal polimerlerin değiştirilmesi, var olan yolların düzenlenmesi ya da molekül veya organizmaların inhibisyonu için kullanılır. Proteinler hedefli ajan olarak kemoterapötik salım ilaçları olarak da görev alırlar. Ek olarak, enzimler in vivo ve in vitro koşullarda kimyasal reaksiyonların katalizi için de kullanılırlar. Sentetik polimerlerin sergilediği yüksek termal ve kimyasal stabilite ile kontrollü molekül ağırlığı ve düşük dispersite büyük önem taşır. Ayrıca sentetik polimerler istenilen fonksiyonel grubun eklenmesini ve pH, sıcaklık, redoks potansiyeli gibi biyolojik ya da biyolojik olmayan uyarılara yanıt oluşturulmasını sağlar. Bu sebeple polimer protein konjugatları kimya, biyoloji, nanoteknoloji ve tıp alanlarında kullanılmaktadır [22]. PEG, FDA onayı sebebiyle birçok çalışmada sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmaların birinde, Poli(etilen glikol)-b-poli(aspartik asit) (PEG-*b*-PAsp)'ın peptit segmentindeki karboksilik asidinin fonksiyonlandırılması ile antikanser ilacı doksorubisin (Dox) fiziksel yakalama ile kendinden katlanabilir amfibilik blok kopolimerler elde edilmiştir. Diğer bir çalışmada sentetik polimer peptit konjugatları PEG-*b*-PAsp'nin karboksilik asit grubu ile kompleks oluşturması sonucu cispatin yüklü miseller elde edilerek kanser terapisinde kullanılmıştır. Diğer bir çalışmada ise neovasküler tümörün hedeflenmiş radyoterapisi için Ghandehari ve arkadaşları poli(*N*-(2-hidroksipropil)-metakrilamit) (PHPMA) ~16 kopyalı halkasal Rvβ3 integrin hedefli RGD peptidi konjuge edilmiştir. Hubbell ve arkadaşları kollajen II a 1'i bağlayan kısa peptitlerin keşfini göstermiş ardından intra-artiküler hedeflemeye izin veren polimer nanopartiküllerin yapılandırılması için kullanılmıştır [23]. PEGilasyon antibadilerin modifikasyonu için de kullanılmaktadır. Hem tek zincirli antibadiler hem de monoklonal antibadilerin çözünürlüğü hem de in vivo dolaşımdaki yarılanma ömürlerini arttırmaktadır. Lee ve arkadaşları tek zincirli antibadi CC49/218 sFv ile farklı molekül ağırlıklarındaki (2-20 kDa) ve yapılarındaki(düz, dallanmış) PEG ile konjugasyonu üzerinde çalışmışlardır. PEG:sFv' nin 2:1 ve 1:1 oranlarındaki konjugasyonlarında sFv afinitesinin modifiye olmamış haline göre afinitesinin 2 kat arttığı belirlenmiştir [24]. Diğer bir çalışmada yüksek molekül ağırlığına sahip PEG (40kDa) ile ErbB2 (HER2) onkoproteinine spesifik mAbs' nin N12 ve

L26 türleri ile konjugasyonu Hurwitz tarafından rapor edilmiştir. Bu antibadiler tümör tarafında aşırı eksprese edilen ErbB2' yi baskılar. N-hidroksisüksinimid ile aktive edilmiş dallanmış PEG' in proteinlerin amino grubu ile konjugasyonları tüm antibadiyi ya da monomerik Fab fragmentini bağlamada kullanılmıştır. Antibadi konjugasyonlarının bağlanma afinitesi ve tümörü inhibe etme aktivitesi insan gastrik N87 karsinoma hücresi için yapılar in vitro çalışmalarda keşfedilmiştir. Ayrıca konjugatların antitümör aktivitesi in vivo olarak da gösterilmiştir [25]. Certolizumab Pegol, TNF-a için antitümör nekroz faktörü a mAb' nin PEG konjuge edilmiş insansı Fab fragmentidir. Certolizumab pegol' un romatizmal eklem iltihabı hastalarında, eklem hasarlarının uzun ömürlü etkisini azaltmada ve fiziksel fonksiyonunun arttırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Bu yöntem 2009 yılında monoterapi olarak FDA tarafından onaylanmış ve yetişkin eklem romatizması hastalarının tedavisi için romatizmal ilaçlar listesine eklenmiştir [26]. Diğer bir polimer-peptit konjugasyon çalışmasında, Fong ve arkadaşları anti-tavuk yumurta beyazı lizozimlerinin Fv fragmentlerini poli(N-izopropilakrilamid) (NPNIPAAm)' a konjuge ederek HEL' nin bağlanmasını sağlamıştır. Saflaştırılmış Fv fragment-polimer konjugatı HEL içeren solüsyonla karıştırılmış ve 37 °C' de % 80' den fazlası çöktürülmüştür. Ayrıca konjugat, antijen bağlama ve saflaştırma için tekrar tekrar kullanılmıştır. Bu çalışma ile antibadi fragmenti konjuge edilmiş polimerlerin etkili ayırma işlemi için ne kadar kullanışlı olduğunu göstermiştir [27]. Quchi ve arkadaşları ise poli(L-laktit)-b-PAsp(PLLA-b-PAsp) diblok kopolimeri PLLA-NH₂ makro başlatıcı kullanarak BLA-NCA' nın halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. PLLA-b-PAsp diblok kopolimeri sulu ortamda pH' a duyarlı PAsp kabuğu ile PLLA merkezli miseller oluşur ve partikül büyüklükleri PAsp ve PLLA' nın pH solüsyonundaki blok uzunluklarına bağlıdır. Elde edilen miseller toksik olmayan L929 fibroblast hücrelerine konjuge edilmiştir [28]. Son zamanlarda PEGilasyon işlemi hücre ve dokuların modifiye edilerek yeni ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesi, immünojenitenin düşürülmesi, güvenli nakil işlemleri için hücrelerin non-immünojenik olarak geliştirilmesi için uygulanmaktadır. Çeşitli araştırma grupları kırmızı kan hücrelerinin membranlarını evrensel donör hücreleri oluşturabilmek adına PEG konjuge edildiğini rapor etmiştir. Scott ve arkadaşları siyanürik klorür eşleşme reaksiyonu aracılığıyla farklı memeli kırmızı kan hücrelerini mPEG ile (Mw:5kDa) konjuge etmişlerdir. PEG modifikasyonunun kırmızı

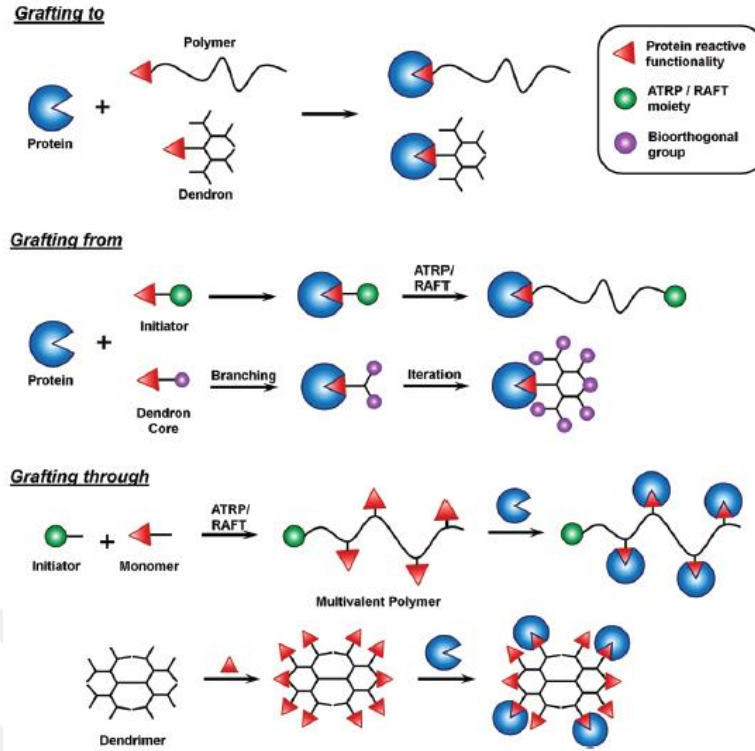
kan hücreleri üzerine herhangi bir zarar oluşturmadığı ve lizis, morfoloji, ozmotik kırılabilirlik, hemoglobin oksidasyon durumu, hemostaz, oksijen bağlama durumu ve hücrel deformasyon gibi fonksiyonların etkilenmediği görülmüştür. Ancak insan kan hücreleri ABO duyarlılıklarını ve antijen-antibodi bağlayabilme özelliklerinde düşüş gözlemlenmiştir [29]. Hücre yüzeylerinin PEG ile modifikasyonu yabancı hücrelerin immün tanınmasında değişikliğe sebep olmuş bu sebeple T hücreleri ve antijen sunucu hücre molekülleri arasındaki gerekli hücre-hücre etkileşimlerinin engellendiği gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra başlangıç adezyonu ve immün tanıma ve yanıt için gereken zorunlu uyarıların benzer bir şekilde önlenmesi görülmüştür. PEGlenmiş kan ürünleri kan transfüzyonu immünosupresif ve sürekli trasplantasyon gerektiren hastalar için büyük bir potansiyel taşımaktadır [30].

20 yıldan fazla süredir virüsler gen terapide hücrel hedeflerde yüksek etki göstermesi sebebiyle kullanılmaktadır. Ancak toksisite ve immünojenite ve dolaşımdan kolaylıkla uzaklaşmaları sebebiyle kullanımları kısıtlandı. Bu sebeple virüslerin kılıflarındaki proteinlerin PEG ile kovalent modifikasyonları, virüslerin biyolojik ve fizyokimyasal özelliklerinin geliştirilmesi için geliştirilmiştir. Adeno virüsler uzun dönem transgen ekspresyonu sebebiyle en az toksik vektörlerden biridir. Bu sebeple adeno virüsler PEGilasyon için en çok çalışılan vektörlerden biridir. Bu amaçla siyanurik klorür, tresil klorür ve süksinimid süksinat ile aktive edilmiş PEGler virüs kılıf proteinlerinden biri olan lizinin epsilon amino grubu ile konjugasyon çalışmaları yapılmıştır. Lentivirüs, retrovirüs, baculovirüs, virüs benzeri partiküller ve influenza virüsleri ile PEGilasyon çalışmaları yapılmış ve birçok çalışmada PEG modifikasyonu sonrasında in vivo gen aktarımının geliştiği görülmüştür [30].

2.2.1.1 Polimer-Protein Konjugasyon Stratejileri

Hem kovalent hem de kovalent olmayan teknikler düşünüldüğünde yüzeye aşılama (grafting to), yüzeyden aşılama (grafting from) ve içerisinden aşılama (grafting through) olmak üzere 3 temel strateji bulunmaktadır. Sentetik polimerin hedef proteine doğrudan tutturulması işlemin yüzeye aşılama stratejisi denir ve en çok kullanılan tekniklerden biridir. Kovalent protein etiketleme kimyası (tiol-maleimide, succinimid ester vb.) kullanılarak PEG temelli konjugatlar bu yöntemle hazırlanır. Bağımsız olarak

yüzeiden aşılama ve içersinden aşılama (grafting through) yaklaşımlarının geliştirlmesi özellikle ATRP ve RAFT gibi kontrollü yaşayan polimerizasyon tekniklerinin geliştirlmesiyle elde edilmiştir. Yüzeide aşılama yönteminin temel avantajı, polimerin susuz ortamda ayrı olarak sentezlenmesi ve konjugasyon işleminin son basamak olmasıdır. Sonuç olarak, çok çeşitli kimyasal fonsiyonelliğe ve monomer kombinasyonuna sahip polimerler elde edilebilmektedir. Yüzeide aşılama yaklaşımı uygun bir sonlu grup içeren polimer sentezini ardından da protein konjugasyonunu içeriir. Protein reaktif gruplar polimere polimerizasyon sonrası ya da polimerizasyon sırasında polimer reaktif gruplar kullanarak tanıtılırlar. Protein reaktif sonlu grup elde edebilmek için ikinci yöntem daha kesindir. Konjugasyon reaksiyonları için yoğun miktarda polimer kullanmak gerekmektedir. Ancak polimer-protein konjugatlarının saflaştırılmasını gerektirir. Bu durum yüzeiden aşılama yaklaşımıyla ortadan kaldırılabilir. Bu noktada polimer zincirleri doğrudan protein üzerinden uzar. İlk olarak küçük başlatıcı molekül proteinin yüzeidine bağlanır ve oluşan makrobaşlatıcı polimerizasyonda kullanılır. Yüzeiden aşılamada bir polimere çeşitli proteinlerin konjuge edilmesine karşın, içine aşılama (grafting through) yaklaşımında çeşitli proteinler bir polimer zincirine bağlanarak multivalent protein elde edilmiş olur. Protein ilk olarak bir polimer zincirine kopolimerleşir ardından polimer ana zinciri boyunca bağlanarak multivalent proteinler oluşur [31], [32].



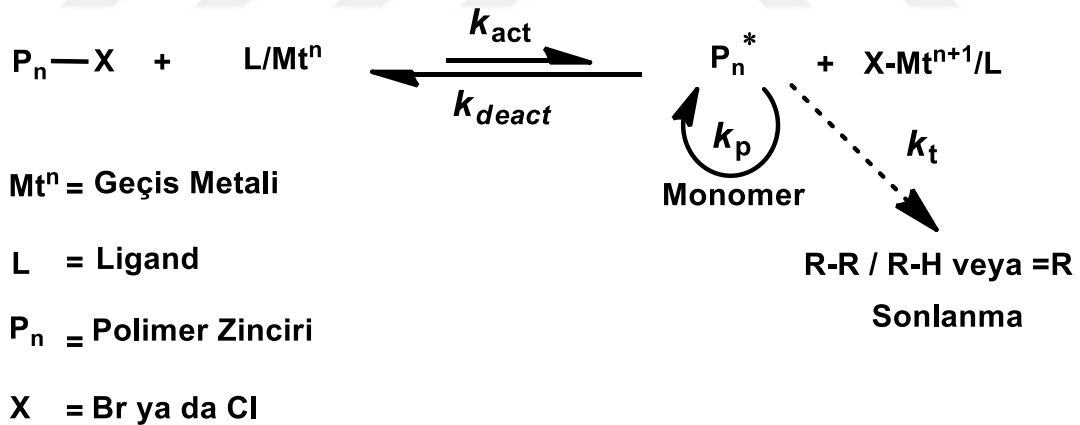
Şekil 2. 2 Protein-Polimer Konjugatları için gerçekleştirilen yüzeye aşılama (grafting to), yüzeyden aşılama (grafting from) ve içine aşılama (grafting through) konjugasyon mekanizmaları [31]

2.3 Kontrollü Yaşayan Polimerizasyon Yöntemleri

Polimerlerin iyi tanımlanmış bileşim, yapı ve fonksiyonellikte sentezlenebilmesi polimer kimyasında uzun zamandır yoğun ilgi gören bir konudur. Genellikle yaşayan polimerizasyon teknikleri, tersinmez zincir transferleri ve zincir sonlanmalarının olmaması sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Birçok akademik ve endüstriyel araştırma, yaşayan polimerizasyonun anyonik, katyonik, halka açılma ve koordinasyon polimerizasyonu türlerine odaklanmıştır. Geçtiğimiz birkaç yıl, kontrollü yaşayan polimerizasyon yöntemlerindeki hızlı büyümeye ve yeni yöntemlerin anlaşılmasına şahit olmuştur. Bu yöntemlerin hepsi yok denecek kadar az büyüyen serbest radikal ve büyük çoğunluktaki baskın tür arasında gerçekleşen hızlı ve dinamik bir eşitlenmeyi temel alır. Baskın zincirler atom transfer radikal polimerizasyonu için alkil halit, RAFT polimerizasyonu için tiolester, nitroksit aracılı polimerizasyon ya da stabil serbest radikal polimerizasyonu için alkoksiamin olabilir.

2.3.1 Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)

ATRP ile ilgili ilk makale 1995 yılında yayımlanmıştır. Bu çalışma polimer bilimindeki birçok alana etki etmiş ve kontrollü polimerizasyon yöntemine ilgi artmıştır. ATRP'yi farklı kılan özellik geçiş metal kompleksi tarafından içteki küre elektron transferi aracılığıyla aktif çoğalan türün düşük konsantrasyonu ile yoğun miktardaki aktifleşmemiş tür arasındaki dengedir. Klasik serbest radikal polimerizasyonunda k_p ve k_t sabitleri ile radikal uzama ve sonlanma basamakları gerçekleşir. ATRP nin genel mekanizması şekil 2.3'te görülmektedir. Radikaller ya da aktif gruplar bir geçiş metali kompleksi aracılığıyla aktif gruptan bir bir halojen atomun çıkarılmasının ardından elektron oksidasyonuna dayalı bir tersinir redoks prosesi yaratılır. Bu proses aktivasyon ve deaktivasyon hız sabitleri arasında gerçekleşir. Polimer zincirleri klasik radikal polimerizasyonuna benzer bir şekilde aracı radikalın monomere katılmasıyla büyür. ATRP' de sonlanma reaksiyonları da görülür ancak iyi kontrol edilebilen bir ATRP de sonlanma tüm zincirlerin % 1-2 sinden fazla değildir. Başarılı bir ATRP' de düşük oranda sonlanma görülmesinin yanı sıra hızlı başlama ve hızlı tersinir deaktivasyon ile tüm zincir büyümelerinin eşit boyda olması da büyük önem taşımaktadır [33].



Şekil 2. 3 Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu Mekanizması

Multikomponent bir sistem olan ATRP monomer, transfer edilebilir bir halojene sahip başlatıcı, uygun bir ligant ile bir geçiş metalinin birleşiminden oluşan bir katalizörden oluşur. Başarılı bir ATRP için sıcaklık ve solvent seçimi de büyük önem taşımaktadır.

Monomerler: Birçok monomer ATRP kullanılarak başarıyla polimerleştirilmiştir. Tipik monomerler stirenler, metakrilatlar, metakrilamitler ve akrilonitriller olarak verilebilir.

Aynı koşullar altında ve aynı katalist kullanıldığında her bir monomer kendi aktif ve pasif grupları için kendi eşsiz atom transfer eşitlik sabitine sahiptir. Radikal sonlanmanın dışında herhangi bir yan reaksiyonun yokluğunda eşitlik sabitinin büyüklüğü polimerizasyon oranını belirler. Eğer eşitlik sabiti çok küçükse ATRP gerçekleşmez ya da çok yavaş gerçekleşir. Aksine eşitlik sabitinin çok büyük olması yüksek radikal konsantrasyonu sebebiyle büyük oranda zincir sonlanmalarına sebep olacaktır. Her monomer kendi içsel radikal uzama oranına sahiptir. Bu sebeple spesifik bir monomer için çoğalan radikal konsantrasyonu ve radikal deaktivasyonu oranı polimerizasyon kontrolünü korumak için ayarlanmalıdır. Ancak bir katalitik proses olan ATRP' den beri denge pozisyonları sadece radikal ve pasif türe değil eklenen geçiş metalinin miktarı ve reaktivitesi ile de ayarlanabilir [34].

Başlatıcılar: Başlatıcının temel görevi büyüyen zincir sayısını belirlemektir. Eğer başlama hızlı ve transfer ve sonlanma önemsizse büyüyen zincir sayısı sabittir ve başlangıçtaki başlatıcı konsantrasyonuna eşittir. Teorik molekül ağırlığı ya da polimerizasyon derecesi yaşayan polimerizasyondaki başlatıcının başlangıçtaki konsantrasyonu ile karşılıklı olarak artar. ATRP de tipik olarak alkil halitler başlatıcı olarak kullanılır ve polimerizasyon oranı ilk olarak alkil halidin konsantrasyonu ile ilintilidir. Düşük moleküler ağırlığa sahip iyi tanımlanmış bir polimer elde etmek için halit grubu hızlı ve seçici bir şekilde büyüyen zincir ve geçiş metal kompleksi arasında göç etmelidir. Bu zamana kadar, halit genellikle ya bromür ya da klorür olduğunda molekül ağırlığı kontrolü en iyisi olduğu belirlenmiştir. İyodinin akrilatla bakır aracılı ATRP' de iyi çalıştığı, ve stirenin polimerizasyonunda rutenyum ve rutenyum temelli ATRP' de iyi çalıştığı bulunmuştur. Florin kullanılmamaktadır çünkü C-F bağı yarıma için çok kuvvetlidir. Bazı psödo halojenler özellikle thiooktanat ve thiokarbamatlar akrilat ve stirenlerin polimerizasyonunda başarıyla kullanılmaktadır. Başlama iyi bir başlatıcıyla hızlı ve belirlenebilir olmalıdır. Genellikle herhangi bir aril karbonil ya da alil gibi α -karbon üzerinde bulunan aktive edilebilir değişimli karbon atomuna sahip alkil halit potansiyel olarak ATRP başlatıcısı olabilir [34].

Katalizör: ATRP' nin en önemli elemanlarından biri katalisttir. Katalist atom transfer eşitliğinin pozisyonunu ve aktif ve pasif türler arasındaki değişim dinamiğini belirlemesi sebebiyle ATRP' de anahtar role sahiptir. Etkili bir geçiş metali için çeşitli koşullar

vardır. İlk olarak metal merkez en az iki ulaşılabilir oksidasyon durumuna sahip olmalıdır. İkinci olarak metal merkez halojene karşı etkili bir afiniteye sahip olmalıdır. Son olarak metal ve ligant güçlü bir kompleks oluşturabilmelidir.

Çözücü: ATRP yığın, solvent ya da heterojen sistemler içinde uygulanabilir. Benzen, toluen, anisol, difenileter, etil asetat, aseton, dimetilformamit, etilen karbonat, alkol, su, karbondioksit gibi çeşitli solventler farklı monomerler için kullanılmaktadır. Solvent özellikle polimer monomerin içinde çözünmüyorsa gereklidir. Çeşitli faktörler solvent seçimini etkileyebilir. Solvente zincir transferi minimum koşullarda olmalıdır. Ek olarak, katalitik sistem ve solvent arasındaki etkileşim göz önünde bulundurulmalıdır. Solvent tarafından katalizör zehirlenmesi ve solvent yardımcı yan reaksiyonlar minimuma düşürülmelidir [34].

Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi: ATRP'de polimerizasyon derecesi hem radikal uzama oranı sabiti hem de atom transfer eşitlik sabiti artıyorsa sıcaklıkla artar. Radikal terminasyondan daha yüksek radikal uzama aktivasyon enerjisi sonucunda yüksek kp/kt oranı ve daha iyi kontrol daha yüksek sıcaklıkta gözlenebilir. Ancak zincir transferi ve diğer yan reaksiyonlar yükselen sıcaklıkla artış gösterebilir. Genellikle katalizörün çözünürlüğü yüksek sıcaklıkta artar ancak sıcaklık artışıyla katalizör yapısının bozunması da mümkündür. Optimal sıcaklık çoğunlukla monomer, katalist ve hedeflenmiş molekül ağırlığına bağlıdır. Yüksek monomer dönüşümünde zincir büyüme oranı yavaşlayabilir ancak herhangi bir yan reaksiyon belirli bir şekilde değişmez [34].

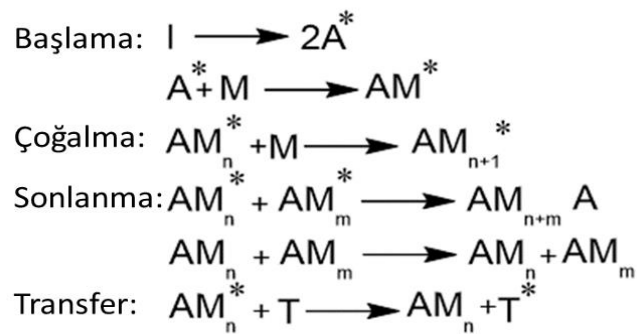
Fonksiyonel polimerik malzemeler ilaç salımı, doku mühendisliği ve medikal görüntüleme gibi çeşitli biyolojik ve biyomedikal uygulamalar için önemli bileşenlerdir. Proteinler doğada var olan mükemmel yapılara bir örnektir. Proteinler aminoasitlerden oluşur ve kontrollü bileşim, kimyasal özellik, fonksiyonellik, moleküler ağırlık, ve moleküler ağırlığındaki dağılım gibi üstün özelliklerle meydana gelir. Polimer bilimindeki uzun dönem hedefler, polimer sentezini mümkün olduğunca doğadaki haline yaklaştırmaktır. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) en güçlü ve çok yönlü kontrollü radikal polimerizasyon yöntemlerinden biridir. Bu yöntem moleküler ağırlık, monodispers moleküler ağırlık dağılımı ve fonksiyonellik üzerinde bir kontrol sağlar. Oda sıcaklığındaki su da dahil olmak üzere çeşitli solvent ve reaksiyonlarda

polimerizasyon gerçekleştirilebilir ve birçok fonksiyonel gruba tolerans gösterir. Polimerizasyon koşulları ve parametreler ayarlanabilir, reaksiyon kinetiği üzerinde kontrol sağlanabilir. Homojen ve heterojen çözelti polimerizasyonlarına ek olarak, polimerler yüzeyden, proteinden, organik malzemelerden ve nanopartikülleri de içeren inorganik metallerinden büyüyebilirler. Bu sebeple Atom transfer radikal polimerizasyonu fonksiyonel polimer elde etmek için büyük önem taşımaktadır [35].

2.4 Polimerizasyon Stratejileri

2.4.1 Süspansiyon Polimerizasyonu

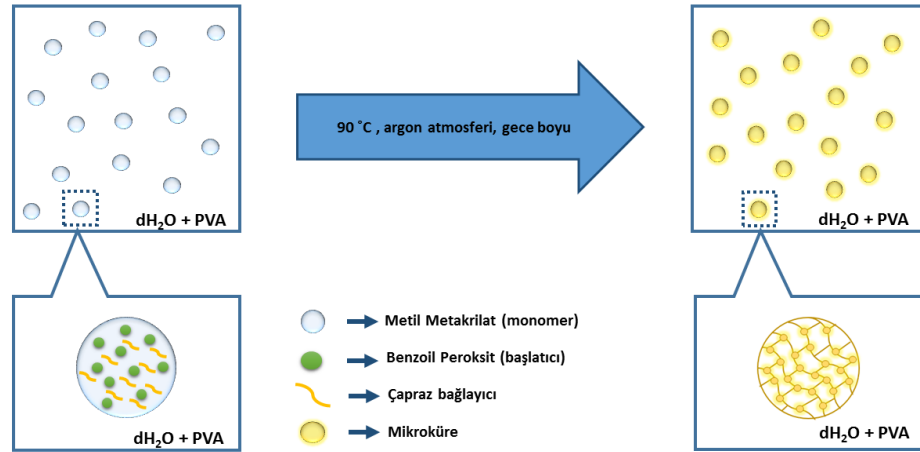
Süspansiyon polimerizasyonu polivinil klorür, polimetil metakrilat, polistiren, stiren akrilonitril kopolimer ve çeşitli iyon değişim rezinleri gibi ticari önemi bulunan polimerlerin polimerizasyonunda kullanılır. Süspansiyon polimerizasyonunda monomer damlaları içeren faz inorganik faz içerisine dağıtılır ve polimerizasyon oluşan damlaların içerisinde gerçekleşir. Birçok durumda monomerler damlaların içerisinde herhangi bir seyreltici içermezler yani polimerizasyon damlaların içerisinde yığın polimerizasyonu gibidir. Birçok süspansiyon polimerizasyonu geleneksel polimerizasyon basamakları olan başlama, çoğalma, sonlanma ve zincir transfer reaksiyonları ile ilerler.



Şekil 2. 4 Süspansiyon Polimerizasyon Mekanizması

Şekil 2.4'te M anyonik, katyonik ya da serbest radikal olan bir monomerdır. M yaygın olarak vinil monomerleri kullanılır ve gerçekleşen serbet radikal zincir mekanizmasıdır. Sonra büyüyen polimer zincirleri AM_n oluşur. Türlerin kısa ömürleri sebebiyle proses boyunca polimer molekülleri oluşur. Radikalin oluşturulması A*, organik başlatıcının termal bozunması I, ile gerçekleşir ve monomer içerisinde çözüdür. Organik

peroksitler sıklıkla başlatıcı olarak kullanılır. T monomer, polimer, solvent ya da zincir transfer ajanı gibi spesifik bir işleve sahip bir tür olabilir. Eğer T* etkili bir şekilde aktifse A* gibi davranabilir ve yani bir polimer zinciri oluşturabilir. Bazı durumlarda vinil klorürün polimerizasyonu gibi monomere zincir transferi çok etkilidir ve polimerin ortalama molekül ağırlığını etkileyen temel etkidir. Süspansiyon polimerizasyonu kimyası disperse edilmiş fazda gerçekleşse de o monomer ve başlatıcı çözünmeyen fazla kısmen de olsa karıştığı sürece yığın polimerizasyonundan herhangi bir farkı yoktur. Eğer monomer damlaları çok küçükse sürekli fazdan monomerlerin uzaklaştırılması orijinal başlatıcılar damlalarda kalsa dahi radikal uzaklaşmayla ayrılır. Bu reaksiyon mekanizması miniemülsiyon polimerizasyonu ile yoğun bir benzerlik gösterir. Süspansiyon polimerizasyonu özellikle küçük polimerik küreler elde edilmek istendiğinde büyük avantaj sağlar. Ancak damlalarda kalan kontaminasyonlar uzaklaştırılmazsa sorun yaşanabilir [36].



Şekil 2. 5 Süspansiyon Polimerizasyonu Basamakları

2.4.2 Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu çeşitli kollodiyal ve fizikokimyasal özelliklere sahip özellikle su bazlı rezinlerin elde edilmesi için sıklıkla kullanılan kimyasal bir prosestir. Bu heterojen serbest radikal polimerizasyon prosesi, su içerisinde hisrofobik monomerin kısmi emülsifikasyonunu içerir. Ardından ya suda çözünmeyen başlatıcı (sodyum persülfat gibi) ya da yağda çözünür bir başlatıcı (AIBN) kullanılır. Emülsiyon

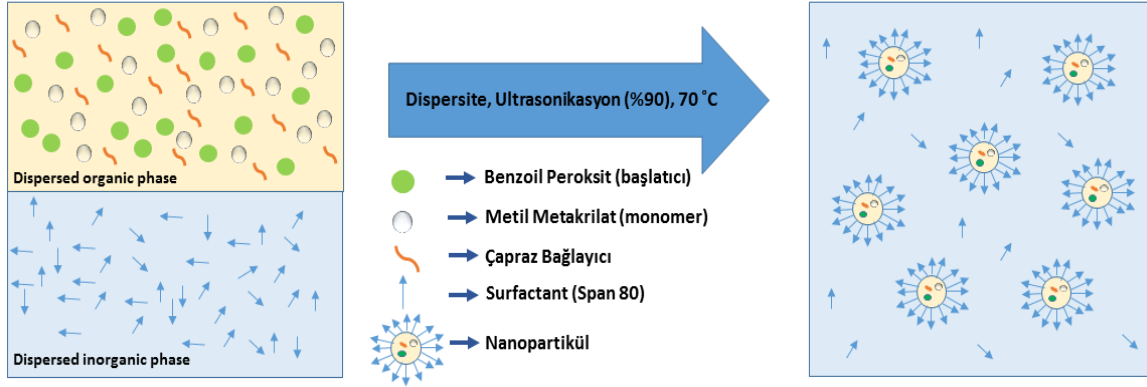
polimerizasyonunda kullanılan tipik monomerler bütadien stiren, akrilonitril, akrilat esterleri ve metakrilat ester monomerleri, vinil asetat ve vinil klorürdür. Çok geniş yağ-su arayüzey alanları partikül çekirdek formu olarak oluşturulur ve boyutları polimerizasyon prosesi ile büyür. Bu sebeple iyonik ve iyonik olmayan surfaktanlar gibi etkili stabilizatörler partikül yüzeyinde fiziksel ya da kimyasal etkileşim kuran koruyucu kolloidler koagülasyonu önlemek için gereklidir. Bu durum çerçevesinde kolloidal stabilizasyon; elektrostatik stabilizasyon mekanizması, sterik stabilizasyon mekanizması ya da her ikisiyle de sağlanabilir. Çevre dostu lateks ürünleri geniş bir polimer çeşitliliği kapsar. Bu emülsiyon polimerleri sentetik kağıt, termoplastik, kaplama, yapıştırıcı, bağlayıcı, plastik pigmenti, immünotanı testleri, protein saflaştırma için polimerik destek ve ilaç salım sistemleri gibi çok çeşitli uygulama alanları bulunmaktadır. Emülsiyon polimerizasyonu daha kompleks bir mekanizmadır çünkü polimer partiküllerinin büyüme ve stabilizasyonu kolloidal olgu içerisinde gerçekleşen bir serbest radikal polimerizasyonudur [37].

2.4.2.1 Mini Emülsiyon Polimerizasyonu

Klasik emülsiyon polimerizasyonunda monomerler kritik misel konsantrasyonu üzerindeki bir oranla surfaktan eklenmiş sulu fazda disperse edilerek bir başlatıcı sistemiyle polimerizasyon başlatılır. Ancak polimer partikülleri içerisinde radikal bulduran miseller şeklinde elde edilir. Ayrıca misellerin boyutları bu yöntemle büyük olarak elde edilir. Bu sorunları ortadan kaldırmak amacıyla miniemülsiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır. Bu polimerizasyon yöntemi Ugelstad, El-Aasser, ve Vanderhoff' un öncülüğü ile geliştirilmiş ve monomer damlaları mümkün olduğunca küçük hale getirilmiştir. Sürfaktan olarak genellikle uzun zincirli alkenler ya da alkoller kullanılır. Miniemülsiyondaki damlaların çapları genellikle 100-500 nm arasındadır.

Submikron monomer damlaları uygun bir emülsiyonlaştırıcı, etkili bir emülsifikasyon aparatı ve difüzyonal degradasyona karşı monomerlerin stabilizasyonu ile gerçekleştirilir. Mevcut sürfaktan damla üzerindeki geniş yüzey alanını adsorblar ve miseller oluşmaz. Başlatıcı sisteme eklendiğinde radikaller polimer partiküllerini oluşturmak için monomer damlalarının içine girerler. Damla çekirdekleri emülsiyon polimerizasyonu ile difüzyonal sınırlamanın üstesinden gelir ve suda çözünür

bileşiklerle etkileşime izin verir. Bu yöntem biyo temelli polimer dağılımı, gen ve ilaç salımı, antiviral terapi, düşük vizkosite, yüksek katı dispersiyonu, kemosenör, yanıtı polimerik malzemeler ve fonksiyonel polimerlerin elde edilmesine olanak tanır [38].



Şekil 2. 6 Mini-emlsiyon Polimerizasyon Mekanizması

2.5 Fonksiyonel Polimerik Yüzeyler

2.5.1 Hibrit Yüzeyler

Herhangi bir materyalin yüzeyi, çevre ile etkileşime giren ilk bölümdür. Bu etkileşim hakkındaki bilgi doku mühendisliği, hücre kültürü, kan teması, medikal tanı, mikro akışkanlı sistemler gibi birçok biyolojik uygulamada önem kazanmaktadır. Yüzey modifikasyon işlemleri genellikle malzemenin molekül ağırlığı değiştirilerek ya da polimerik bileşiklerle gerçekleştirilebilir. Polimerler, polimerik, ya da silikon, cam, kuantum dot ve altın yüzeyler gibi çeşitli inorganik malzemenin üzerine kaplanabilir [39]. Yüzey modifikasyonunda moleküllerle modifikasyon ya da küçük molekül zincirleri ile modifikasyon temel yaklaşımlardır. Küçük moleküllerle karşılaştırıldığında yüzey aktivasyonu için fonksiyonel polimerler birçok avantaj sağlar. İlk olarak, polimerler fonksiyonel gruplar taşır ve bunlar kovalent bağlanma ile yüksek yoğunluktaki prob immobilizasyonu için kullanılabilirler. İkinci olarak uygun polimerler seçilerek yüzey özelliklerinin kontrolü kolaylıkla sağlanabilir. Ayrıca uzun polimer zincirleri substrat ve prob arasında destek görevi görerek sterik etkiyi azaltır ve analiz için proba ulaşılabilirliği artırır [40]. Bu sebeple birçok hibrit yüzey çalışması gerçekleştirilmiştir. Eşsiz özellikleri göz önüne alındığında polimer/auNP hibritlerin terapötik ve multi-

modal görüntüme ajanı olarak kanser terapide büyük önem taşıdığı bilinmektedir. Örneğin polimer/auNP hibritler tümör doku hipotermisini yönlendirmek için ışık enerjisi termal olarak absorblanır veya yayılır. Bu yöntem hastalıklı bölgede boyutsal kontrol ve düşük yan etkiler oluşturması sebebiyle kanser terapide invaziv olmayan ve güçlü bir yöntemdir [41]. Diğer bir çalışmada kuantum dotlar kullanılmıştır. Uzun lüminesans ömrü ve foto stabilizasyonu sebebiyle yaşayan hücrelerin dinamik görüntülenmesinde kuantum dotlar büyük önem taşımaktadır. Ancak suda çözünürlüğünün az olması ve sulu ortamda fiziksel stabilitesinin kolaylıkla bozulması kullanımlarını sınırlandırmıştır. Ayrıca biyolojik sistemler için toksik özelliklere sahiptirler. Bu sebeple biyouyumluluğu arttırmak toksisiteyi azaltmak için kuantum dotlar polimerlerle birlikte kullanılmıştır. PEI, PEG, PLA, PAMAM, PNIPAM, PCL, kitosan ve dekstran kuantum dotların hibridizasyonu için kullanılan polimerlerdir. Yapılan bir çalışmada Wu ve arkadaşları thiol-PEG-peptit hibrit polimeri sentezlemiş ve pH'ye duyarlı kuantum dotlar hazırlamıştır. Sonuç olarak sulu ortamda harika bir dispesitede ve biyouyumlulukta hibrit polimerler elde edilmiştir. Bunun yanında thiol sonlu OH-poli(amidoamin) aşırı dallanmış polimerler kuantum dotların sulu ortamda stabilizasyonunu sağlamak için kullanılmıştır [42]. Son yıllarda elektronik araçların geliştirilmesinde büyük önem taşıyan grafen de polimerik hibrit yüzeylerin oluşturulmasında tercih edilmiştir. Grafen oksit bir araç olarak, ilaç ve gen taşınımı için araştırılmıştır. Bir çalışmada Zhang ve arkadaşları katyonik polimer olan polietilenimini (PEI) grafen oksite (GO) amidasyon prosesi ile kovalent olarak bağlamıştır. PEI-GO 'ya elektrostatik absorpsiyon yöntemiyle siRNA ve aromatik kanser ilaçları π - π istifleme ile yüklenmiştir. PEI-GO/Bcl-2-hedeflenmiş siRNA ve PEI-GO/DOX *Hela* hücrelerine sırasıyla gönderilmiştir. Bcl-2- hedeflenmiş siRNA' nin Bcl-2 proteinini inhibe etmesi ve DOX ile DNA ve RNA sentezinin inhibisyonu antikanser etkisini önemli bir ölçüde arttırmıştır [43]. Fonksiyonlandırılmış polimerik yüzeylere biyoaktif moleküllerin immobilizasyonu hibrit yüzeyler elde edilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu uygulama tıbbi tanı, mikro ya da nanoelektromekanikal sistemler (MEMS ya da NEMS) gibi çeşitli uygulamalara sahiptir. Saoudi ve arkadaşları DNA'nın aminlenmiş polipirol silika partiküllerine sığa yakın yüzey yüküyle adsorbe edildiğini rapor etmiştir. Polipirole DNA adsorpsiyonu DNA/polipirol ara yüzeyindeki fosfat iyon değişimi ile de

yakından ilişkilidir. Hook ve arkadaşları aminle zenginleştirilmiş alilamin plazma polimer filmin üzerine boyutsal kontrollü DNA adsorbsiyonunu aminle zenginleştirilmiş alilamin plazma polimer filmin dizisel birikimi ardından aşılınmış PEG'in indirgeyici aminasyonu ile sağlamıştır [44]. Son yıllarda, cam yüzey modifikasyonları araştırmacılar için büyük ilgi odağı olan hibrit yüzeylerden biridir. Cam yüzeyler yaşam bilimlerinde çok çeşitli uygulamalara sahiplerdir. Ancak düşük kimyasal aktivite ve cam yüzey üzerindeki silikon-oksijen bağları için yüzey aktivasyonu stabil duruma gelmeden deneysel olarak yeterince kullanılamamaktadırlar. Polimerik filmler bu sorunun ortadan kalkması için avantaj sağlayarak mikroarray ve sensör sistemleri için uygulamaları arttırmaktadır. Yüzey başlatıcılı atom transfer radikal polimerizasyonu ile cam yüzey üzerinde P(GMA-HEMA) saçaklarının oluşturulduğu ve tavşan Ig G' nin başarıyla belirlendiği bir mikroarray sisteminin oluşturulduğu gösterilmiştir [45].

2.5.2 Polimerik Küreler

Yüzeyinde bağlayıcı fonksiyonel grup bulunduran çapraz bağlı polimerik küreler, çok çeşitli kompozisyonlarda kolayca üretilebilmesi ve çeşitli aktivasyon yöntemleriyle immobilize edilerek modifiye edilebilmesi sebebiyle katalizör taşıyıcı ve polimerik ajan olarak büyük ilgi uyandırmaktadır [46]. Katı partikül üzerinde gerçekleşen reaksiyonlar ya da polimer destekli reaksiyonları olarak adlandırılır. Basit bir filtrasyonla ayrılabilen fonksiyonel polimer kürelerin kendini yenileyebilmesi ve tekrar kullanılabilmesi sağladığı avantajlardır. Fonksiyonel çaprazbağlı polimerik kürelerin hazırlanması için iki temel yaklaşım bulunmaktadır. İlki öncül polimerik kürenin modifikasyonu ikincisi monomer ile istenilen fonksiyonelliğin kazandırılmasıdır. İkinci yaklaşım iyi tanımlanmış polimerlerin hazırlanması için bir avantaj sağlar [47]. Polimerik kürelerin yüzey özellikleri fonksiyonel grup ve yeni monomerler kullanılarak değiştirilebilmektedir. Geçtiğimiz yıllarda kontrollü yaşayan radikal polimerizasyonu yönteminin geliştirilmesi ve yeni sentetik metodlar polimer partiküllerin fonksiyonlandırılmasına olanak tanır [46]. İyi tanımlanmış yapıya ve fonksiyonel gruplara sahip monodispers mikroküreler gelişmiş özellikleri ile biyomedikal bilimler, biyomühendislik, gen tedavisi gibi alanlarda büyük bir potansitele sahip olması sebebiyle büyük öneme sahiptir. Örneğin, metoksi poli(eilen glikol-blaktik asit) (mPEG-*b*-PLA) biyoparçalanır nanokürelere aktif enzim

enkapsüle edilmiştir. Polimerin amfifilikliği yükleme ve kargo stabilitesi, moleküler ağırlığın etkisi ve blok kopolimerin bileşiminin morfolojiye etkisi araştırılmıştır [48].

Polimerik kürelere fonksiyonel saçakların aşılması daha etkili fonksiyonel malzemelerin elde edilmesi için geliştirilen diğer bir yoldur. Biyokatalizör için saçaklı grafitlerin taşıyıcı olarak kullanılması aşılmalı zincirlerin kısmi hareketi sebebiyle reaksiyonların daha hızlı gerçekleşmesini sağlar. Yaygın polimerik küreler ile karşılaştırıldıklarında yüzeylerinde fonksiyonel grupların tutturulmuş olması sebebiyle saçaklı yapılar homojen reaksiyon koşullarına benzer şekilde reaksiyonların gerçekleşmesini sağlar. Mikro küre çekirdeklerinin çözünür olmaması ve aşılmalı zincirlerin çözücü ile karışabilirliği göz önüne alındığında saçaklı graft polimerler kolayca izole edilebilir ve hızlı reaksiyon yeteneğine sahiptirler. İçinden aşılama, yüzeye aşılama ve yüzeyden aşılama teknikleri bu yapıların oluşturulabilmesi için kullanılmaktadır. Yüzeyden aşılama, zincirlerin büyümesinde kontrol sağlama ve homopolimer formasyonundan kaçınması sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Bu teknikler kontrollü yaşayan polimerizasyon yöntemleriyle gerçekleştirilebilir. Kontrollü yaşayan polimerizasyon teknikleri içerisinde yüzey başlatıcılı atom transfer radikal polimerizasyonu (SI-ATRP) katı partikül yüzeyinden aşılama için en avantajlı yöntemlerden biridir. Polimer saçaklar geniş aralıkta moleküler ağırlığına sahip proteinlerin immobilizasyonu için kullanılabilir. Örneğin P(GMA) saçakları sırasıyla hidrazin ve laktaz ile fonksiyonlandırıldıktan sonra iyonik etkileşim ile invertaz ve laktaz immobilizasyonu için kullanılmıştır. Fe_3O_4/SiO_2 kompozit partikülleri SI-ATRP yöntemiyle sodyum 4-stiren sulfonat saçaklarının aşılması için kullanılmış ve pektinaz immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir [49].

2.6 Fonksiyonel Polimerlerin Biyomedikal Uygulamaları

2.6.1 Tıbbi Tanıda Kullanılan Polimerik Sistemler

2.6.1.1 Biyosensör Sistemleri

İlk biyosensör cihazı bir elektrot içerisine enzim entegre edilerek geliştirilmiş ve günümüze kadar görüntüleme ve tanı metabolitleri (glukoz, hormon, nörotransmitter,

antibadi, antijen gibi) alanında birçok ilerleme göstermiştir. Biyosensör algılayıcı biyoelement (biyomolekül) ve bir transdüserden oluşur. Biyomolekül analit ile etkileşime geçerek kimyasal sinyal oluşturur ve bu sinyaller elektriksel sinyal çıktıları olarak transdusere iletilir. İletken polimerler transduser olarak yoğunlukla kullanılır [50]. İletken polimerler biyomoleküller için uygun matrisler olarak stabilite, hız ve duyarlılığı arttırabilirliği sebebiyle biyomedikal tanı uygulamalarında büyük ilgi görmektedir. Fiziksel adsorbsiyon, elektrokimyasal yakalama ve etil dimetil aminopropil karbodiimid (EDC) ile N-Hidroksi süksinimid bağlama kimyası yöntemleriyle iletken polimerin üzerine tutturularak biyomolekülün stabilitesi arttırılır. Schuhmann ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada fonksiyonlandırılmış iletken polipirol filme karbodiimid aktivasyonundan sonra enzimlerin kovalent bağlanması için uygun bir yüzey oluşturmuştur. Cosnier ve arkadaşları asetonitril içerisinde N-hidroksisüksinimid gruplarıyla fonksiyonlandırılmış elektroaktif polidikarbazol filmler oksidatif elektropolimerizasyonunu keşfetmişlerdir. Fonksiyonlandırılmış dikarazol filmlerin sulu ortamlarda başarılı bir şekilde yakalama gerçekleştirildiği görülmüştür [51]. Glukoz biyosensörleri ilk oluşturulan sensör sistemlerinden biridir ve çoğunlukla glukozun enzimatik oksidasyonu sonucu meydana gelen oksijen tüketimini ya da hidrojen peroksit üretiminin amperometrik olarak belirlenmesini temel alır. Enzim olarak genellikle GOX kullanılır ve glukozla redoks reaksiyonu sağlamak ve elektrotlarda akım elde etmek için kullanılır. Ancak kısa yarılanma ömrü, rahatsız edici olması ve günlük kalibrasyona ihtiyaç duyması sebebiyle bu sensörler polimerler kullanılarak geliştirilmiştir. Elektrot üzerindeki polimere immobilize edilmiş enzimler elektron transfer prosesi boyunca analitler için yanıt oluşturur. Enzim tabakasıyla birlikte, GOX çapraz bağlı sentetik hidrojel ve iletken polimere immobilize edilmiştir. Hidrojeller yaygın olarak enzim immobilize etmek, biyoyumluluk, geçirgenlik, kirlenmeye karşı direnç oluşturmak amacıyla elektrotlara sıklıkla uygulanır. Poli HEMA ve kopolimerleri de hidrojellerin çevresinde sıklıkla kullanılır. Porozite, hidrofobiklik, biyoyumluluk ise 3-dihidroksi propil metakrilat (DHPMA), N-vinil prolidon, vinil alkol, etilen glikol, 2-metakriloksietil fosforkolin (MPC) ve karboksi betanin uygulanmıştır. Bu hidrojeller iyonik olarak iletken ancak elektronik olarak iletken değildir ve yüksek ara yüzeyel impedans gösterirler. İletken polimerler hidrojel ağlarıyla birlikte kullanılarak uyarılara

yanıt oluşturma özelliğini arttırır ve arayüzeysel elektrik impedansını azaltır. Osmium kompleksleriyle hidrojel ağlarının kullanılması redoks etkisini geliştirir [52].

2.6.1.2 Görüntüleme Sistemleri

Optik, manyetik rezonans, nükleer ve ultrason gibi çeşitli görüntüleme teknikleri uzun yıllardır klinik uygulamalarda başarıyla kullanılmaktadır. Ancak, *in vivo* koşullarda kullanılan problemlerin düşük molekül ağırlığında olması ve zayıf duyarlılığı biyogörüntüleme için yeni problemlerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Son yıllarda polimer kimyası ve biyogörüntüleme biliminin gerçekleştirdiği çalışmalar hastalıkların tanı ve tedavisinde polimer temelli biyogörüntüleme problemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Görüntüleme modaliteleriyle biyouyumlu, biyobozunur, doğal ve sentetik polimerlerin multivalent, dallanmış, graft, blok kopolimer, polisakkarit ve dedrimer gibi farklı yapılarla geliştirilmesini sağlamış böylece yarılanma ömrü, stabilite, toksisitenin azaltılması ve hedeflemenin arttırılması gibi özellikler geliştirilmiştir [53]. Polimerler tekli ya da ikili ligantlarla karşılaştırıldığında metal nanopartiküllerin üzerine birden fazla grup bağlanmasına olanak verir böylece inorganik nanokristallerin özellikleri arttırılmış olur. Birçok polimer elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinde geçirgendir ve bu sebeple görüntüleme sırasında biyolojik moleküllere engel olmamaktadır. Ayrıca polimer partikülleri ile mikro/nanojeller tedavi edici ve görüntüleme edici ajanları enkapsüle edebilir. İnorganik nanomalzemelerin fonksiyonel özellikleri ATRP yöntemi kullanılarak oluşturulması gerçekleştirilmiştir. Bir çalışmada nanokristaller sentezlendikten sonra nanokristal yüzeyine doğrudan blok kopolimerin adsorpsiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım blok ve bağlanma gruplarından oluşan kontrollü olarak sentezlenmiş blok kopolimerin nanokristal yüzeyine bağlanmasını içerir. CdSe/ZnS kuantum dotlar iyi tanımlanmış P(EG-b-DMAEMA) ile ligant değişimi aracılığıyla suda çözünür hale getirilmiştir. Saflaştırılmış TOPO- bağlı kuantum dotlarda P sinyali gözlemlenmemektedir. P(EG-b-DMAEMA) blok kopolimeri eklendiğinde polimer bağlanmayan nanopartiküllere göre 30-50 ppm de keskin P sinyalleri gözlemlendi. Ek olarak piren ile fonksiyonlandırılmış PDMAEMA, ligant geçişini ölçmek için jel geçirgenlik kromatografisinde kullanılmıştır [54].

2.6.1.3 Tanı kitleri

Proteinler çeşitli biyolojik fonksiyonlar için ve metabolik reaksiyonların katalizi, DNA'nın replikasyonu, uyarılara yanıt oluşturma, moleküllerin bir yerden başka bir yere taşınması ve doku iyileşmesi gibi proseslerde görev alır. Proteomik temelli çalışmalarda, spesifik protein biyomarkırlar doğrudan hastalığın seviyesini yansıtır ve hastalık tanısı için en önem vaadedici hedef moleküllerin belirlenmesini sağlar. Geleneksel tanıda klinikler MS ya da ELISA kullanır. Ancak MS in çok pahalı olması laboratuvar temelli ELISA IVD testleri için kullanılmaktadır. Günümüz protein analizleri temel olarak ELISA ve benzeri sistemler kullanılır. En çok bilinen IVD protein belirleme aracı hamilelik için olan LFA-formatlı testtir. Bu testin belirleme mekanizması insan kionik gonodotropin hormonunun (Hcg) ince bir filme tutturulmasıdır. PDMS mikroakışkanlı mikropartikül assayleri için jel temelli mikroyapılar amaçlanmıştır. Hcg ve PSA olarak bilinen iki tümör belirteç proteini belirlenmiştir. Bu mikroakışkanlı düzenlemede küresel biyofonksiyonlandırılmış polistiren mikropartiküller poliakrilamit mikro jel yapısı üzerine tutturularak kanser tanısında kullanılmıştır [55].

2.6.2 Polimerik İlaç Salım Sistemleri

Son yıllarda polimer kimyası sentez, degradasyon, karakterizasyon, uygulama geliştirme gibi birçok özellik üzerinde biyouyumlu ve biyobozunur polimer geliştirebilmek için çalışmış, geliştirilen bu polimerler polimerik ilaç salım sistemlerinde kullanılmıştır. Bu sistemler hedefleme, ulaşılabilirlik, sensör yanıtı alım gibi eşsiz özelliklere sahiptirler. Geliştirilen polimer terapötikler polimer kimyası ve biyomedikal bilimleri arasında bir arayüz oluşturur. Birçok geleneksel ilacın farmakolojik özellikleri polimerik ilaç salım sistemleri kullanılarak geliştirilmiştir. Öncül ilaç uygulamalarında PEGilasyon işlemleri sıklıkla uygulanmaktadır. PEGlenmiş ilaçlar hepatit C, akromegali, romatizmal enfeksiyon, nötrofeni, çeşitli kanser türleri, yara iyileştirme gibi durumlarda sıklıkla kullanılmaktadır [56]. Metabolik stabilizasyonunun olmaması suda düşük çözünürlük, doza bağlı toksisiteyi yüzünden sınırlı anti kanser ilaçlarının klinik kullanımı sınırlıdır. Klinik doktorlar için hedef, kanserli dokuya sitotoksiteyi aşmadan maksimum miktarı gönderebilmektir. Ancak diğer organlara da zarar vermeden vücuda gönderilecek miktar çok küçüktür. Bu sebeple kanser ilaçlarının geliştirilerek tümörlü

dokuya yan etkileri kontrol edilebilecek maksimum oranda ilaç göndermek hedeflenmektedir. Polimer ilaç konjugatlarında geliştirilecek birinci etki Matsumura ve Maeda tarafından 1986' da tanımlanan arttırılmış geçirgenlik ve tutunmadır (EPR). Çalışmalarında, katı tümörlerde makromolekül miktarını arttırarak zayıf lenfatik drenaj oluşturmayı amaçlamışlar ve böylece tümör çevresinde damar geçirgenliğinin artacağını düşünmüşlerdir. İlaç-polimer konjugatlarının güvenliği ve etkisi ilaç geliştirme prosesleri içerisinde en çok çalışılan konudur. Bu konjugatlar, genellikle klinik kullanımda daha önce onay almış ilaçlar için geçerlidir. Polimerik taşıyıcıdan ilaç salımı genellikle ilacın farmakolojik etkisini arttırmaya yöneliktir. Bu avantaj, sistemik taşımada ilacın genellikle inaktif olmasıyla sağlanmıştır. Eğer ilaç, taşıma sırasında salınırsa istenmeyen toksisiteler meydana gelebilir, bu durum konjugatın güvenilirliğini zayıflatır. Bu sebeple konjugatın stabilitesi en önemli parametredir. Ancak, hedefe ulaşıldığında konjugatın etkili bir şekilde salınması istenir. Bu sebeple konjugat stabilitesi ve ilaç salımı arasındaki denge güvenli ve etkili salımı etkiler. İlaç salım sistemlerinde dendrimerler enkapsülasyon ve ilaç formülasyonu için sıklıkla çalışılan bir alandır. Aşırı dallanmış yapıları sebebiyle dallar arasında yüklenme kapasitesine sahiplerdir. Özellikle suda düşük çözünürlüğe sahip ilaçların taşınımı için avantajlıdır. Buna ek olarak dendrimerler transdermal ve oral salım için de kullanılmaktadır. Pozitif yüklü yüzeye sahip poly(ethylene imin) ve PAMAM dendrimerleri negatif yüklü DNA ile kompleks oluşturabilmesi sebebiyle gen taşınması için çalışılmıştır [56].

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Cam yüzey, KOH, Pirhana Solüsyonu, etanol, DCM, 2-bromo-butiril bromür, trietil amin, Tetrahidrofuran, DMSO, Cu(I)Br, PMDETA, NMAS, PEGMA, Con A, CaCl₂, MnCl₂, Na₂SO₄, tolüen, benzoilperoksit (BPO), BBEMA, etilenglikoldimetakrilat (EGDMA), metilmetakrilat (MMA), EDTA, Coomassie Brilliant Blue G250, metanol, fosforik asit (% 85 M/V), 2-nitrobenzaldehit, akrilik asit, etil asetat, hekzan, PVA, Span 80 kimyasalları reaksiyonlarda kullanılmıştır.

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

3.1.2.1 NMR

Magnetik alanı 1,74 Tesla olan Ultrashield Plus™ magnete sahip Bruker Avance III 500 MHz Spektrometresi kullanılarak NMR spektroskopisi analizleri yapılmıştır.

3.1.2.2 UV-Vis Spektroskopisi

UV-Vis Spektroskopisi analizleri, UV-1800 Shimadzu UV-Vis spektrofotometresinde uygun dalga boyu aralıklarında çeşitli solventler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.3 SEM

Yüksek vakum, ayarlanabilir ve genişletilebilir basınç modlarıyla detaylandırılmış 80x100x35 mm (X,Y,Z) boyutlarında hareket kabiliyetine sahip yüksekliği 100 mm'ye kadar olan numunelerin ölçümünü gerçekleştirebilen Zeiss EVO® LS 10 marka SEM cihazı analizlerde kullanılmıştır. Taramalı elektron mikroskopunda polimerik malzemelerin analizleri yapılmış bu sebeple iletkenliği sağlamak için altın kaplama gerçekleştirilmiştir. 60 X-25,00K X aralığında büyütme uygulanarak ölçümler alınmıştır.

3.1.2.4 Bradford Testi

Bradford testi protein miktarını belirlemek amacıyla kullanılan çok hızlı gerçekleşen kolorimetrik bir yöntemdir. Bradford testi için kullanılan asidik Coomassie Brilliant Blue G250 çözeltisinin 465 nm'deki absorbansı protein ile bağlandıktan sonra 595 nm'de absorbans vermekte böylece Lambert-Beer yasasından yararlanarak protein konsantrasyonu hesaplanmaktadır.

3.1.2.5 Yüzey Temas Açısı Ölçüm Cihazı

Temas Açısı ölçümü için KSV CAM 200 markalı tamamıyla bilgisayar kontrolüne sahip temas açısı ölçüm cihazı kullanılmıştır. CAM 200 statik ya da dinamik temas açısını belirlemek ve sıvının yüzey/arayüzey gerilimini ölçmek için damlanın şekil analizini kullanır. CCD Arayüz kamerası (512x480) ile düz çubuk şeklindeki yakınlaşma mercekleri LED temelli arka plan aydınlatmasıyla 10 ms'den 1000 s zaman aralığında görüntü yakalamaya izin verir (Görüntü alanı 5,7x5,4 mm²). 5° ile 180° aralığındaki temas açısı (doğruluk 0,1°) ve 0,01 mN/m'den 999 mN/m'ye (0,01 mN/m) kadarki yüzey gerilimi uygun metotlar (Young-Laplace gibi) kullanılarak yerleştirilen görüntülerde yüksek doğrulukta elde edilebilir.

3.1.2.6 FT-IR

FT-IR spektroskopisi ölçümleri ATR aparatı bulunan Shimadzu IR Prestige21 cihazında yapılmıştır.

3.1.2.7 Floresans Mikroskobu

Floresans görüntüleri için üç başlı ve gelişmiş floresans kapasitesine sahip CKX41 marka ters mikroskop kullanılmıştır. Yüksek açı eğimi sayesinde hızlı ve kolay görüntü kontrolü gelişmiş UIS mercekleriyle alınan görüntüler sayesinde sağlanır. Floresns mikroskobu 12,5 milyon çözünürlük sağlayan DP 71 marka dijital kamera ile donanımlandırılmıştır.

3.2 Biyoaktif Polimer-Cam Hibrit Yüzeylerin Hazırlanması

3.2.1 Amin Fonksiyonlu Cam Yüzeylerin Oluşturulması

Cam Yüzeyler hidroksil grubuyla fonksiyonlandırılmak için 3M KOH (50 mL) ile 2 saat muamele edildi. Yüzeyler distile su ile yıkama işleminin ardından kurutuldu. Ardından 1 saat Pirhana solüsyonuna batırılan cam yüzeyler distile su ile tekrar yıkayıp kurutularak % 5' lik APTES çözeltisi ile 1 saat muamele edildi. Distile su ve etanol ile yıkama işleminin ardından silanlanmış yüzeyler 120 °C' de 2 saat vakumda kurutuldu.

3.2.2 Brom Fonksiyonlu Cam Yüzeylerin Oluşturulması

Cam yüzeyler 250 mL'lik çift boyunlu balonda 2 saat vakum altında tutuldu. Argon altında yüzeylere DCM (60 mL), 2 Bromo-butiril bromide (1 mL) ve triethyl amine (1,4 mL) eklenerek reaksiyon 17 saat sonra sonlandırıldı. Son olarak, THF ile hızlı (2-3 dk) ve yavaş (30-45 dk) yıkama işleminin ardından vakum altında cam yüzeyler kurutuldu.

3.2.3 Sı ATRP Yöntemi ile Cam Yüzeylerin Kovalent Bağlı Polimerler ile Kaplanması

1 nm² bir yüzeyde 2,1-4,2 adet amin olduğu rapor edilmiştir (Acres et al. 2012). Bu veriye dayanarak amin ile aynı miktarda fonksiyonlandırılmış brom olduğu kabul edildi ve başlatıcı hesabı yapıldı. Miktarın ölçülebilecek değerin çok altında olması sebebiyle değerlerin 100 katı alınarak hesaplama yapıldı. Camların DMSO (12 mL) ile kaplanmasının ardından Cu(I)Br ($4,103 \times 10^{-6}$ mol 0,406 mg), PMDETA ($4,103 \times 10^{-6}$ mol, 0,694 mg), NMAS ($1,641 \times 10^{-4}$, 30,01mg) ve PEGMA ($6,565 \times 10^{-4}$, 197 mg) eklendi ve ardından dondurma-vakum-çözme işlemi (x3) uygulanarak çözelti içerisindeki çözünmüş gazlar sistemden uzaklaştırıldı. Argon atmosferinde 90 °C'de reaksiyon

başlatıldı. Reaksiyon sonlandırılarak (reaksiyon süresi: üç gün), cam yüzeylere distile su ve etanol ile hızlı-yavaş yıkama işlemleri uygulandı ve vakum altında kurutuldu.

3.2.4 Polimer Fonksiyonlu Cam Yüzeyler ile Con A Konjugasyonu

Con A ve saçaklı küresel polimerin konjugasyon işlemi için 5 mg Con A, 10 mL fosfat tamponu (pH 7,14) içerisinde çözüldü ve 10 adet, polimer ile fonksiyonlandırılmış cam yüzeylerin üzerine eklenerek +4 °C'de reaksiyon manyetik karıştırıcı ile hafif bir karıştırmada 2 gün devam ettirildi. Ardından distile su ve fosfat tamponu ile önce hızlı (distile su) ardından yavaş yıkama işlemleri [(x3) fosfat tamponu, (x3) distile su ≈ 10 dk.)] gerçekleştirildi. Vakum altında kurutma işlemi gerçekleştirilerek +4 °C' de nem tutucu bulunan bir kap içerisinde cam yüzeyler depolandı.

3.2.5 GFP *E. coli* JM109 hücreleri

GFP eksprese eden *E.coli* hücreleri Prof. Dr. Dilek Balık'ın araştırma grubundan temin edilmiştir [57].

3.2.6 Con A Dekore Edilmiş Polimer Fonksiyonlu Cam Yüzeyler ile *E. coli*'nin Tespit Edilmesi

5 mL GFP ile transforme edilen *E. coli* hücreleri hazırlandı. Con A'nın konjugasyonu için gerekli olan CaCl₂ (10 mM, 500 µL) ve MnCl₂ (10 mM, 500 µL) (Of and Reaction 1967) eklenerek bakteri hücre kültürü 2 dakika karıştırıldı. Herhangi bir işlem uygulanmamış pozitif ve negatif control oluşturacak iki adet cam yüzey, Piranha solüsyonu ile muamele edilmiş cam yüzey, polimer fonksiyonlu cam yüzey ve Con A dekore edilmiş polimer fonksiyonlu cam yüzeylerin herbiri 20 µL hücre kültürü ile 2 saat muamele edildi. Ardından herbiri 50 mL distile su ile yıkanan cam yüzeyler florasan mikroskopunda incelendi.

3.3 Polimerik Küreler

3.3.1 Polimer Saçaklı Mikroküre Sentezi

3.3.1.1 Brom fonksiyonlu mikro kürelerin sentezi

Brom fonksiyonlu mikro küreler literatürde rapor edilen süspansiyon polimerizasyon prosedürü modifiye edilerek sentezlenmiştir (Karagoz vd., 2010): 0,1 g PVA ve 0,3 g Na₂SO₄ 30 mL distile su ile 250 mL'lik 3 boyunlu manyetik karıştırıcı bulunan balonda çözüldü. Bu karışım içerisinde 20 dakika boyunca argon gazı geçirildi ve böylece oksijen gazı uzaklaştırılmış oldu. Sürekli karıştırma esnasında 3mL toluen içerisinde çözülmüş 7 mg benzoilperoksit (BPO) ($1,98 \times 10^{-5}$ mol), 430 µl BBEMA (0,006 mol), 372 µl etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) (0,006 mol) ve 1,71 mL metilmetakrilat (MMA) (0,016 mol) damlatma hunisine yardımı ile sürekli argon geçişi esnasında damlatıldı. Daha sonra damlatma hunisi 1,5 mL toluen ile yıkanarak bu çözeltide reaksiyon ortamına aktarıldı. Reaksiyon karışımını içeren balon sıkıca kapatılarak daha önceden 90°C'ye ısıtılmış olan silikon yağına daldırıldı ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon, 24 saat boyunca sürekli karıştırma altında gerçekleştirildi ve karışım oda sıcaklığına getirilip sisteme hava verilerek polimerizasyon sonlandırıldı. Reaksiyon karışımı soğuk suya (~200 mL) döküldü ve karışım santrifüj (3x5 dakika, 5000 rpm) edilerek çöken polimerler ayrıldı. Daha sonra organik safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla polimerik küreler tetrahidrofuranda (THF, 40 mL) bir gece bekletildi. Şişen polimerler santrifüj edilerek bir kez de aseton ile yıkandı ve santrifüj edildi. Daha sonra pellet kısmı kurutulurken mikro yapılı poli(etilenglikoldimetakrilat-co-metilmetakrilat-co-BBEMA) polimerik küreleri beyaz toz şeklinde elde edildi.

3.3.1.2 Küresel Polimer Üzerinde SI-ATRP ile Süksinimidil İçeren Polimer Saçaklarının Hazırlanması

Sırasıyla, DMSO (0,5 mL), PEGMA (735 mg, 2,45 mmol), NMAS (79,2 mg, 0,432 mmol), PMDETA (15,1 mg, 0,087 mmol), Cu(I)Br (12,5 mg, 0,087 mmol) ve başlatıcı olarak brom fonksiyonlu küresel polimer (100 mg) Schlenk tüpüne eklenerek düzgün bir şekilde karıştırılması sağlandı. Schlenk tüpü sıkıca kapatılarak üç kez dondurma-

vakum-çözme işlemi uygulanarak çözelti içerisinde çözünmüş haldeki gazlardan arındırıldı. Ardından Schlenk tüpü 90 °C' deki silikon yağ banyosuna yerleştirilerek reaksiyon başlatıldı. 24 saat sonra reaksiyon sonlandırılarak ortamdaki bakır iyonlarını uzaklaştırmak amacıyla çöktürme ve yıkama işlemleri gerçekleştirildi. İlk olarak 40 mL dietileterde çöktürülen reaksiyon karışımı daha sonra sırasıyla tetrahidrofuran (THF) (3×20 mL), EDTA çözeltisi (2×20 mL) ve distile su (20 mL) ile yıkandı ve her yıkamadan sonra santrifüj edilerek (2000 rpm, 3dk) sıvı faz uzaklaştırıldı. Son olarak liyoflizatörde kurutma işlemi gerçekleştirildi ve saçaklı küresel polimerler elde edildi (123 mg).

3.3.1.3 Saçaklı Küresel Polimere Concanavalin A Konjugasyonu

Concanavalin A ve saçaklı küresel polimerin konjugasyon işlemi için 5 mg Concanavalin A, 5 mL fosfat tamponu (pH 7,14) içerisinde çözüldü ve 10 mg saçaklı küresel polimer bu karışıma eklenerek +4 °C'de reaksiyon manyetik karıştırıcı ile hafif bir karıştırma ile 2 gün devam ettirildi. Konjugasyon reaksiyonu karışımı santrifüj (5 dk., 5000 rpm, +4°C) edilerek elde edilen *üst sıvı faz* ve altta kalan katı fazın distile suyla yıkanmasıyla elde edilen *yıkama fazı* (2 dk., 5000 rpm, +4°C ×3) Bradford Testi yöntemiyle 400-700 nm spektrumunda UV spektroskopi ile analiz edilmiştir. 595 nm'deki proteinden kaynaklı absorban değerleri kullanılarak elde edilen Concanavalin A çözeltisi kalibrasyon eğrisi, santrifüj sonrası elde edilen üst sıvı faz ve yıkama fazı konsantrasyonlarının hesaplanması için kullanılmıştır.

Bradford Testinde kullanılan Bradford ajanı için 2 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 940 µL metanol (%100), 2 mL fosforik asit (%85 M/V) karıştırılıp toplam hacim distile su ile 20 mL ye tamamlandı ve süzgeç kağıdından geçirilerek hazır hale getirildi. Protein miktarı bilinmeyen üst sıvı faz (1/10) ve yıkama fazındaki protein konsantrasyonları Bradford ajanı karıştırılarak 595 nm' deki dalga boyu UV spektroskopi ile ölçüldü ve konsantrasyonlar kalibrasyon eğrisi grafiğine göre hesaplandı.

3.3.1.4 Concanavalin A Konjuge edilmiş P(PEGMA-co-NMAS) Saçaklı Polimerik Küreler ile GFP eksprese eden E.Coli Hücrelerinin Belirlenmesi

10 mM CaCl₂ (1 mL), 10 mM MnCl₂ (1mL) ve 8 mL hücre kültürü yaklaşık 1 dk. çalkalandı. Saçaklı polimerler ve Concanavalin A konjuge edilmiş polimerler 20 mg. 15

mL'lik santrifüj tüplerine eklendi ve her birinin üzerine 2 mL hücre kültürü ekildi. Hazırlanan örnekler 30 dk 180 rpm, 25 °C de çalkalayıcı içerisinde karıştırıldı. Her 10 dk'de (3 kez) kürelerin hareketlenmesi için birkaç fiske vuruldu. 10 dk kürelerin çökmesi beklendi ve hücre fazı mikropipet yardımıyla küresel polimerlerden uzaklaştırıldı. Her seferinde 10 mL distile su ile saçaklı polimer ve Concanavalin A konjugeli saçaklı polimer için 15 kez, diğer saçaklı polimer için 10 mL distile su kullanılarak 10 kez yıkama yapıldı. Saçaklı küresel polimerlerden biri yıkanmayarak pozitif kontrol oluşturuldu. Yıkama işleminin ardından spatül yardımıyla küreler lam üzerine yayıldı ve floresans mikroskopunda görüntüler alındı.

3.3.1.5 Işıқта Parçalanır Mikro ve Nanokürelerin Sentezi

(hexane-1,6-diylbis(azanediyil))bis(1-(2-nitrophenyl)-2-oxoethane-2,1-diyl) diacrylate Sentezi

1,6-Diizosiyanohekzan (3,67 mmol, 500 mg), 2-nitrobenzaldehit (7,34 mmol, 1,226 g) ve akrilik asit (Anhydrous) (8,07 mmol, 581,81 mg) tetrahidrofuran (5 mL) içerisinde argon atmosferi ve oda koşullarında gece boyu karıştırıldı. Tetrahidrofuran rotaride uzaklaştırıldı ve safsızlıkları gidermek amacıyla HCl (50 ml) - DCM (3x50 ml) ile ekstraksiyon gerçekleştirildi. Ardından MgSO₄ ile kurutulan reaksiyon karışımı etil asetat: hekzan (2:1) karışımı kullanılarak kolon kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı. Son olarak ışıkta parçalanır çaprazbağlayıcı sarı vizkoz formda elde edilmiştir. (verim: 51,6 %). Işıқта parçalanır çaprazbağlayıcı ¹H NMR ve FT-IR Spectroskopi yöntemiyle analiz edilmiştir.

3.3.1.6 Süspansiyon Polimerizasyonu Yöntemiyle Işıқта Parçalanabilir Mikroküre Sentezi

Üç boyunlu balon, yoğunlaştırıcı ve damlatma hunisi ile birleştirilerek argon altında süspansiyon polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. PVA (59 mg), Na₂SO₄ (176 mg) ve dH₂O üç boyunlu balona alınarak yoğun argon altında 15 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Metil metakrilat (936 mg, 9,36 mmol), benzoil peroksit (6,23 mg, 2,57x10⁻² mmol), ve ışıkta parçalanır çaprazbağlayıcı (600 mg, 1,029 mmol) damlatma hunisine eklenerek yavaşça üç boyunlu balona damlatılmıştır. Son olarak 90 °C' de

argon altında reaksiyon gece boyu sürdürülmüştür. Reaksiyon karışımı distile suda çöktürülerek sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Katı faz distile su (x3) ile yıkanmış ve THF' te 3 gün bekletilmiştir. Çözücü uzaklaştırılarak vakum altında kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. (verim:49,8%, 769 mg)

3.3.1.7 Miniemülsiyon Polimerizasyonu ile Işıқта Parçalanabilir Nanoküre Sentezi

Metil metakrilat (893 mg, 8,93 mmol), benzoil peroksit (21,63 mg, 9×10^{-2} mmol) ve ışıkta parçalanır çaprazbağlayıcı (130 mg, 0,22 mmol) minimum oranda kloroform ve hegzanda çözünerek ($\approx 25 \mu\text{L}$) argon atmosferinde 5 dk. karıştırılmıştır. Aynı anda Span 80 (58,9 mg) ve dH_2O (8,92 μL) argon atmosferinde 15 dk karıştırılmıştır. Ardından 2 karışım bir araya getirilerek 1,5 sa. 1500 rpm' de karıştırılmıştır. % 90 yoğunlukta 2 dk. ultrasonikasyon işlemi uygulandıktan sonra 90 °C' de reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon karışımı soğuk suda çöktürülerek 3 kez distile su ile yıkanmıştır. THF içerisinde 3 gün bekletilen nanoküreler vakum altında kurutularak elde edilmiştir. (verim: % 19,25)

3.3.1.8 Mikro ve Nanokürelerin Işık Etkisi ile Parçalanma Çalışması

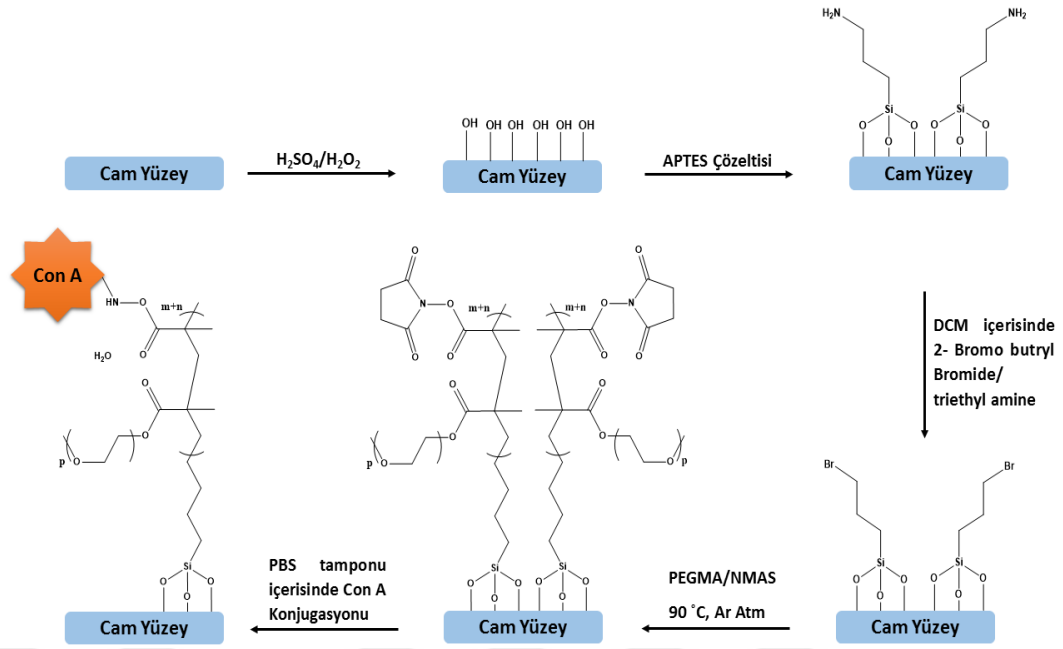
Işıқта parçalanır PMMA mikro ve nano küreler 50 mg'lık miktarlarda iki ayrı kuartz tüpe alınarak 350 nm UV ışık uygulanmıştır. 48 saat ışığa maruz bırakılan küreler her 6 saatte bir UV spektroskopisi ile incelenmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde; biyoaktif polimer-cam hibrit yüzeylerin hazırlanması, biyoaktif polimerik saçaklı mikrokürelerin hazırlanması ve ışıkta parçalanır polimerik mikro-nano kürelerin hazırlanması olmak üzere üç farklı formda fonksiyonel polimer hazırlanmıştır.

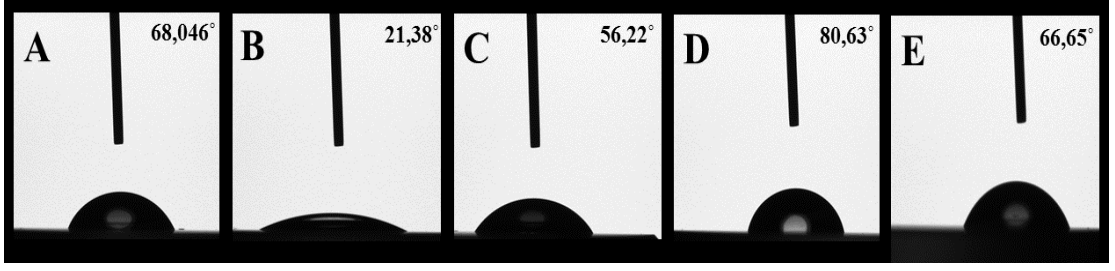
4.1 Biyoaktif Polimer-Cam Hibrit Yüzeyler

Yapılan çalışmada cam yüzeyler ilk olarak Piranha çözeltisi ile muamele edilerek yüzeyde serbest –OH grupları oluşturuldu. –OH grupları APTES çözeltisi kullanılarak –NH₂ gruplarına dönüştürüldü. Ardından, cam yüzeyler üzerinde brom fonksiyonlu uç gruplar oluşturularak yüzeyde başlatılan atom transfer radikal polimerizasyonu yöntemi (SI ATRP) ile süksinimidil ester fonksiyonlu yüzeye bağlı polimerik saçaklar oluşturuldu. Süksinimidil ester grupları amin reaktif gruplar olarak bilinmekte bu sebeple protein konjugasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 4.1).



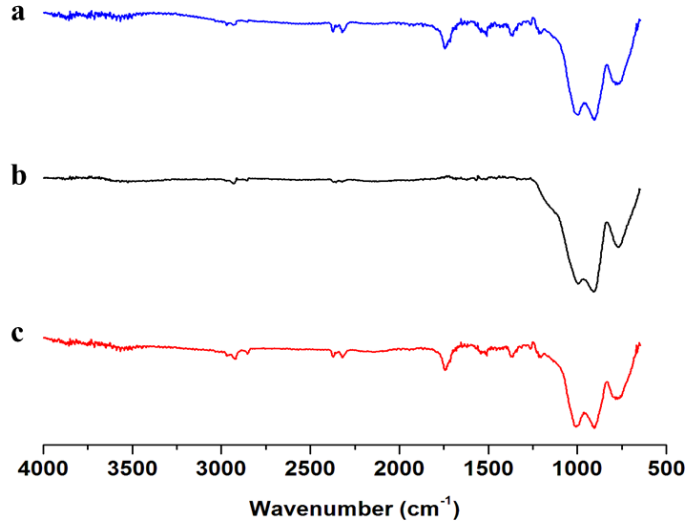
Şekil 4. 1 Concanavalin A ile dekore edilmiş Polimer Fonksiyonlu Hibrit Cam Yüzeylerin Sentez Basamakları

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi tanı amaçlı kullanılacak cam yüzeylerin her bir modifikasyon basamağından sonra yüzey temas açıları işlemin başarısını kontrol etmek amacı ile ölçülmüştür. Yüzeyin, Piranha çözeltisi ile muamele edilmesinden sonra yüzey temas açısının $68,05^\circ$ ’den $21,38^\circ$ ’ye düşmesi yüzeyde serbest -OH gruplarının oluşması sonucu hidrofilik bir karakter kazandığını göstermektedir. Amin grupları oluşturulurken APTES ile muamele edilmesinden sonra APTES grubunun hidrofobik özelliği cam yüzeyine de bu özelliği katmıştır. APTES ile muameleden sonra açının değeri $21,38^\circ$ ’den $56,22^\circ$ ’ye yükselmiştir. Amin gruplarına ATRP başlatıcı bağlanması aşamasında başlatıcının hidrofobik karakteri nedeniyle yüzey daha hidrofobik hale gelmiş, dolayısıyla yüzey temas açısı $56,22^\circ$ ’den $80,63^\circ$ ’ye yükselmiştir. Son basamakta başlatıcı üzerinden PEGMA-süksinimidil ester fonksiyonlu polimerin sentezinde temas açı ölçüsünün değeri $80,63^\circ$ ’den $66,65^\circ$ ’e düşmesi polimer yüzeyinde hidrofilik grupların olması sebebiyle başarılı bir polimerizasyonun gerçekleştiğini gösterdi. Tüm bu yüzey temas açısı ölçümleri yüzey modifikasyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği göstermektedir.



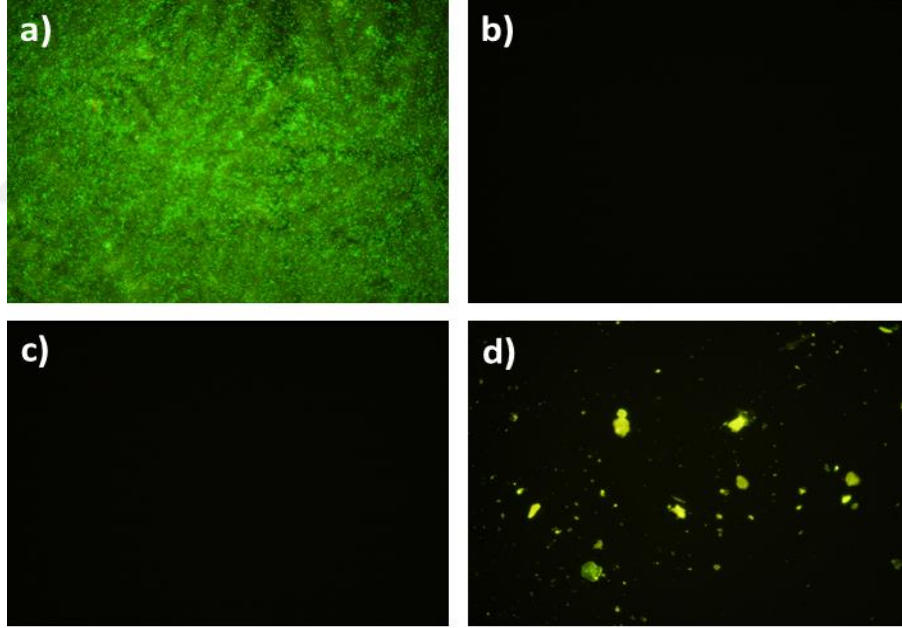
Şekil 4. 2 A)Herhangi bir işlem uygulanmamış cam yüzeyin temas açısı ölçüsü, (B) –OH fonksiyonlu cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü, (C) –NH₂ fonksiyonlu cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü, (D) Brom fonksiyonlu cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü, (E) Polimer saçaklı cam yüzeylerin temas açısı ölçüsü

Ayrıca cam yüzeylerin polimer ve ardından Con A ile başarılı bir şekilde modifiye edildiği Şekil 4.3'de gösterilen FT-IR spektrumları ile desteklendi. 1734 cm⁻¹'de poli(PEGMA)'nın karakteristik piklerinden biri olan -C=O- bantlarının polimer fonksiyonlu ve Con A konjugatı bulunan camlarda görülmesine karşın brom grupları içeren camlarda gözlenmemesi, yine polimer saçaklı ve Con A konjugatlı camlarda 1500 cm⁻¹ civarında görülen –N-O- bandı başarılı bir sentez olduğunu desteklemektedir. 1516 cm⁻¹ civarındaki pikin polimerik saçaklı cam yüzeylere kıyasla Con A konjugatlı cam yüzeylerde daha şiddetli olması Con A'daki –NH piklerinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

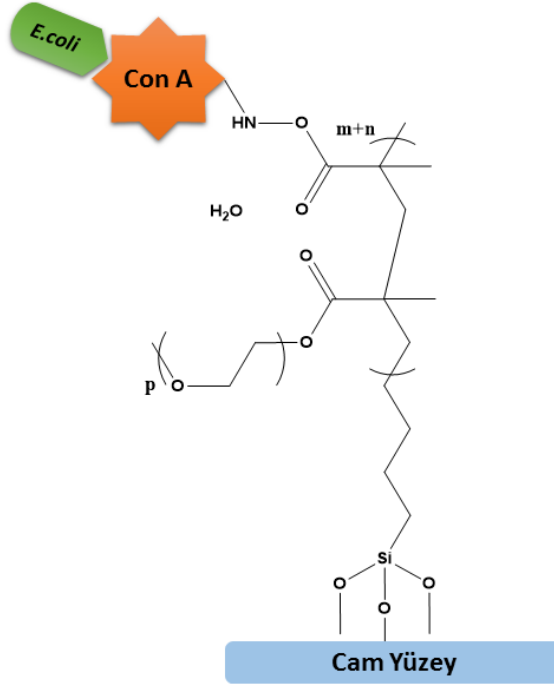


Şekil 4. 3 a) Con A konjuge edilmiş cam yüzey, b) Brom fonksiyonlu cam yüzey c) PEGMA- süksinimidil ester fonksiyonlu saçaklar bulunduran cam yüzey.

Cam yüzeyler, yeşil floresans geni transforme edilmiş *E. coli* ile muamele edilerek cam yüzeyler floresans mikroskopunda incelenmiştir. Bu basamakta bakteriler; hiç işlem görmemiş, polimer fonksiyonlu ve Con A konjuge edilmiş üç farklı cam yüzeyle inkübe edildi. Ayrıca işlem görmemiş bir cam yüzeyde *E. coli* ile muamele edilmiş ancak hiç yıkama yapılmadan pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer cam yüzey örnekleri ise distile su ile bolca yıkandı. Şekil 4.4'de görüldüğü gibi *E. coli* ile inkübe edilip yıkanmayan cam yüzey üzerindeki bakteriler yeşil floresans ışımaya yaparak çok net bir şekilde gözlemlenirken; aynı cam yüzey yıkandığında hiçbir bakteri gözlemlenmemiştir. Ayrıca, yüzeyinde polimerik saçaklar içeren cam yüzeylerde hiçbir bakteri gözlemlenmezken, Con A ile konjuge edilmiş yüzeylerde ise yeşil floresans geni içeren *E. coli*'nin varlığı beklendiği üzere kümelenme şeklinde görülmüştür. Con A'nın birden fazla bağlama bölgesinin olması bakterilerin kümeleşmiş şekilde görülmesini desteklemektedir.



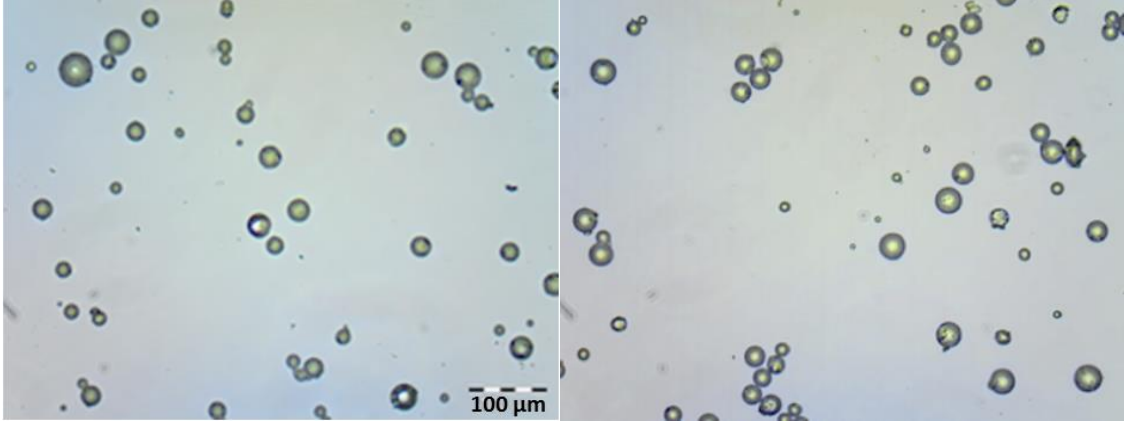
Şekil 4. 4 a) GFP içeren *E. coli* ile muamele edilmiş cam yüzey (pozitif kontrol), b) *E. coli* ile muamele edilmiş ve yıkanmış cam yüzey, c) *E. coli* ile muamele edilmiş ve yıkanmış P(PEGMA-co-NMAS) fonksiyonlu cam yüzey, d) *E. coli* ile muamele edilmiş ve yıkanmış P(PEGMA-co-NMAS) fonksiyonlu Con A ile dekore edilmiş cam yüzey.



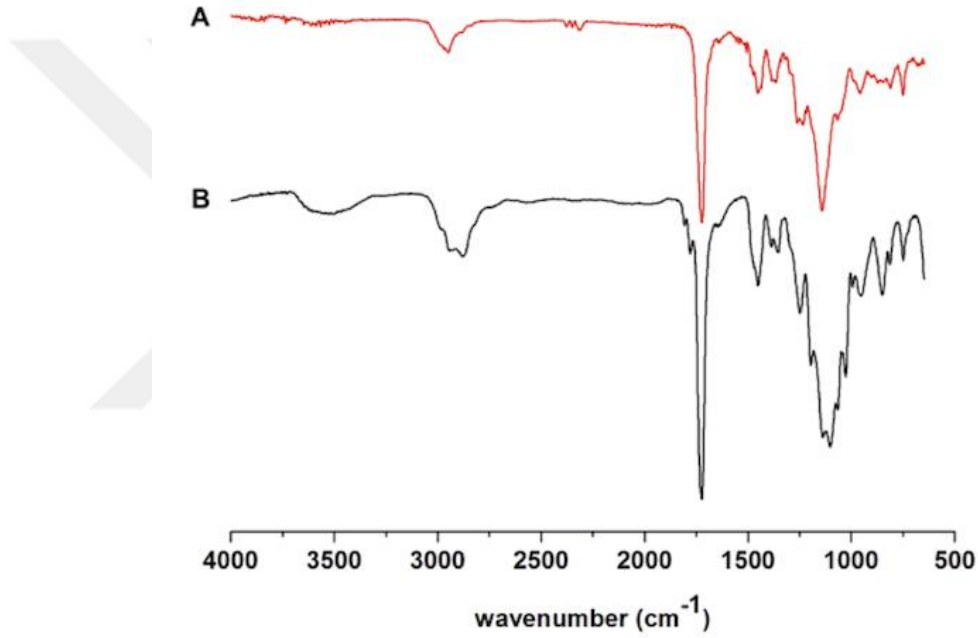
Şekil 4. 5 Concanavalin A ile konjuge edilmiş polimer kaplı hibrit cam yüzeyin konjugasyon kimyası

4.2 Polimerik Saçaklı Mikroküre Sentezi

Saçaklı polimerik kürelerin karakterizasyonu ışık mikroskobu, SEM, FT-IR, floresans mikroskobu ve bradford tayini ile gerçekleştirilmiştir. Polimerlere ait mikroskop görüntüleri (Şekil 4.6) analiz edildiğinde kürelerin çaplarının 10-35 μm arasında oldukları tespit edilmiştir. Polimer kürelerin FT-IR spektrumu (Şekil 4.7), karakteristik tüm bandları içermektedir. Sonraki aşamada elde edilen bu mikro küreler ATRP polimerizasyonunda makro başlatıcı olarak kullanılacak ve mikro kürelerin yüzeyi NMAS monomerini de içeren fonksiyonel saçaklarla aşılacaktır. Elde edilen kürelere ait SEM görüntüleri Şekil 4.8'de görülmektedir. Bu görüntülerde kürelerin oldukça pürüzsüz yüzeye sahip oldukları ve boyutlarının 20-80 μm olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 6 Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin ışık mikroskobu görüntüleri

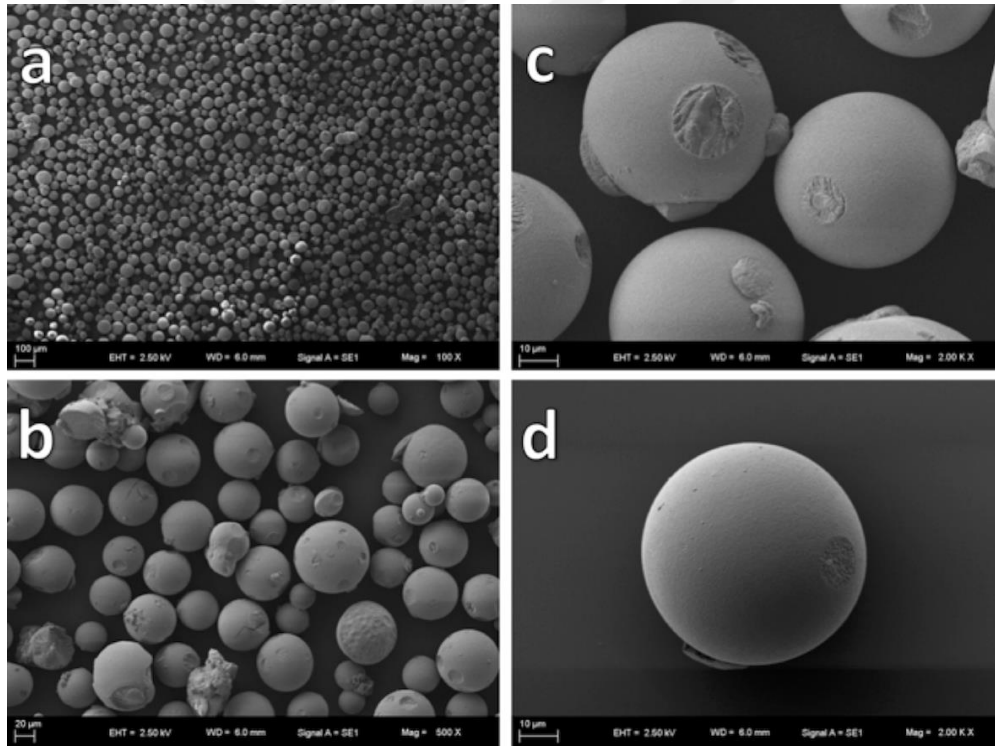


Şekil 4. 7 Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin (A) ve bu kürelerin PEGMA, NMAS kopolimerizasyonu ile yüzeyi modifiye edilen polimerlerin (B) FT-IR spektrumları

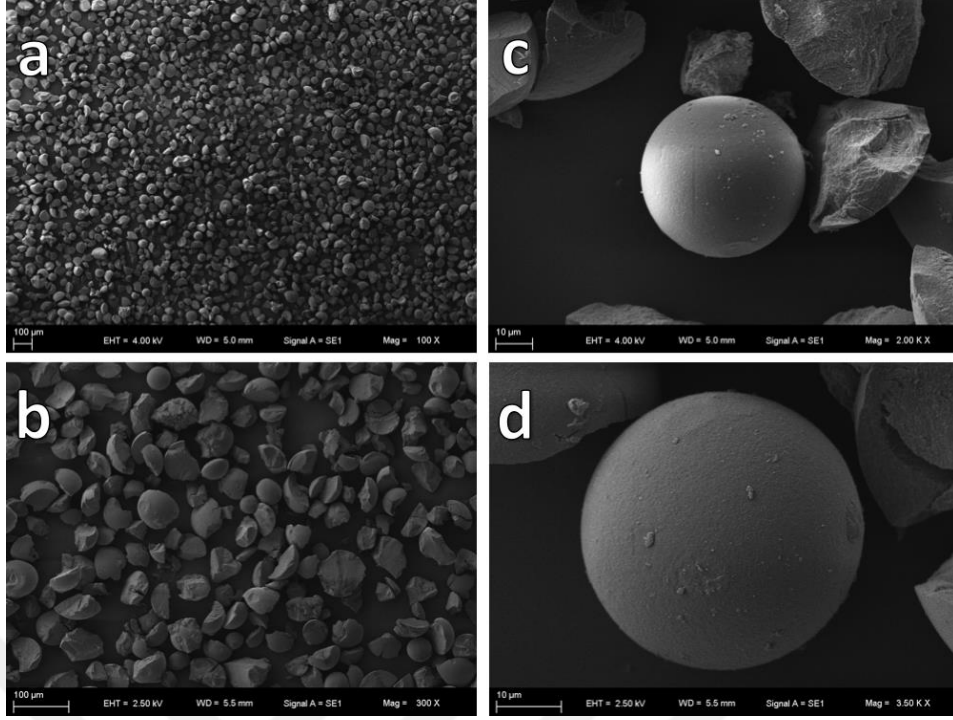
Elde edilen fonksiyonel saçaklı polimerin ve öncül küresel polimerin FT-IR spektrumları (Şekil 4.7) karşılaştırıldığında yüzeyi PEGMA kaplanan polimerin su tutma potansiyelinden dolayı bu polimerin spektrumunda 3600 cm^{-1} 'de hidroksil bandları gözlenmektedir. Ayrıca karbonil bandları bölgesinde öncül polimerin karbonil bağından kaynaklanan 1722 cm^{-1} 'deki keskin pike ek olarak PEGMA kaplı yeni polimerde 1782 cm^{-1} ve 1811 cm^{-1} civarında iki yeni karbonil bandı gözlenmektedir. Son olarak 1100 cm^{-1} civarındaki eterik bandların modifiye edilen küresel polimerin spektrumunda

etilenglikol miktarının artması nedeniyle genişlediği ve alanın arttığı görülmektedir. Bu sonuçlar ATRP başlatıcı fonksiyonlu küresel polimerin yüzeyinin PEGMA ve NMAS'ın ATRP ile kopolimerizasyonu sonucu yüzeyinin modifiye edildiğini göstermektedir.

Brom fonksiyonlu küresel polimerlerin farklı boyutlardaki SEM görüntüsü şekil 4.8'de görülmektedir. Kürelerin pürüzsüz bir şekilde üretildiği belirgin bir şekilde gözlemlenmektedir. Öncül polimer ile modifiye edilen polimerin Şekil 4.9'da gösterilen SEM görüntülerinde bakıldığında ise modifiye polimerin yüzeyinin pürüzlülüğünün arttığı görülmektedir. Ayrıca küresel polimerlerin saçakların sentezi sırasında kimyasal ve fiziksel stres altında olmaları nedeniyle bir kısmında parçalanmaların olduğu görülmektedir. Benzer durum Karagoz vd tarafından yapılan benzer bir çalışmada da gözlemlenmiştir (Karagoz vd., 2010). Elde edilen bu saçaklı küresel polimer, sahip olduğu süksimimidil esterler vasıtasıyla protein konjugasyonunda kullanılacaktır.



Şekil 4. 8 Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin farklı büyütme oranlarında taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri



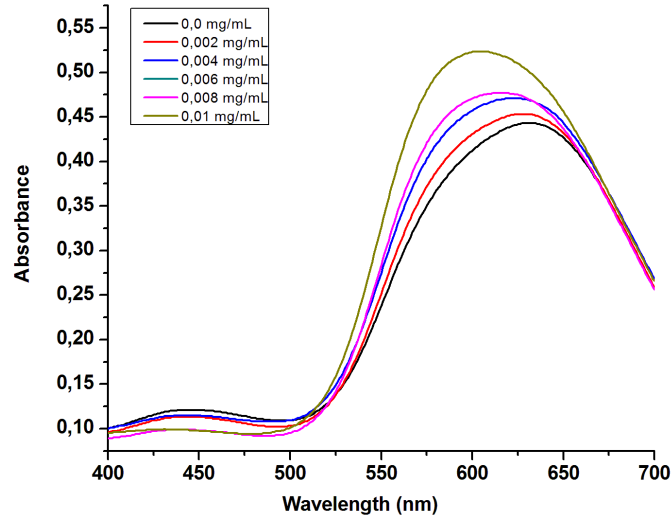
Şekil 4. 9 ATRP ile yüzeyinde P(PEGMA-co-NMAS) saçaklar oluşturulan mikro kürelerin farklı büyütme oranlarında taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri

Çizelge 4. 1 Concanavalin A miktarının Bradford Testi ile belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi için hazırlanan örnekler ve konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorpsiyon değerleri

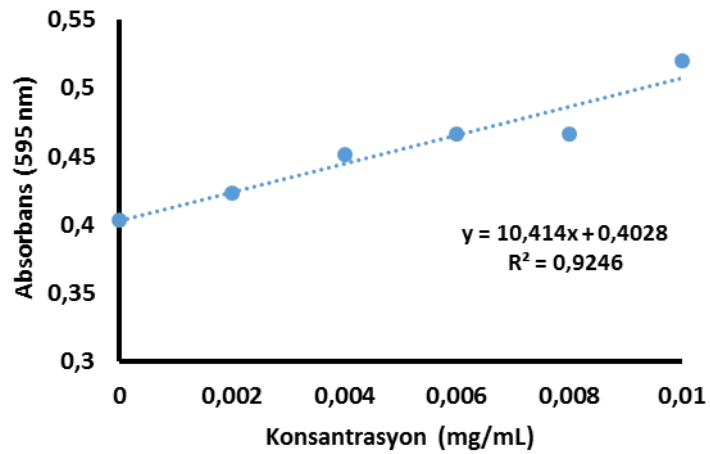
C (mg/mL)	0,1 mg/mL stok Concanavalin A çözeltisi (µl)	Distile Su (µl)	Bradford ajanı (µl)	595 nm'deki absorbans değeri
0,0	0	800	200	0,403
0,002	20	780	200	0,423
0,004	40	760	200	0,451
0,006	60	740	200	0,466
0,008	80	720	200	0,466
0,01	100	700	200	0,520

Çizelge 4. 2 Concanavalin A miktarının Bradford Testi ile belirlenmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi için hazırlanan örnekler ve konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorbans değerleri (devamı)

Üst Sıvı Faz (×0,1)	60	740	200	0,459
Yıkama Fazı	60	740	200	0,406



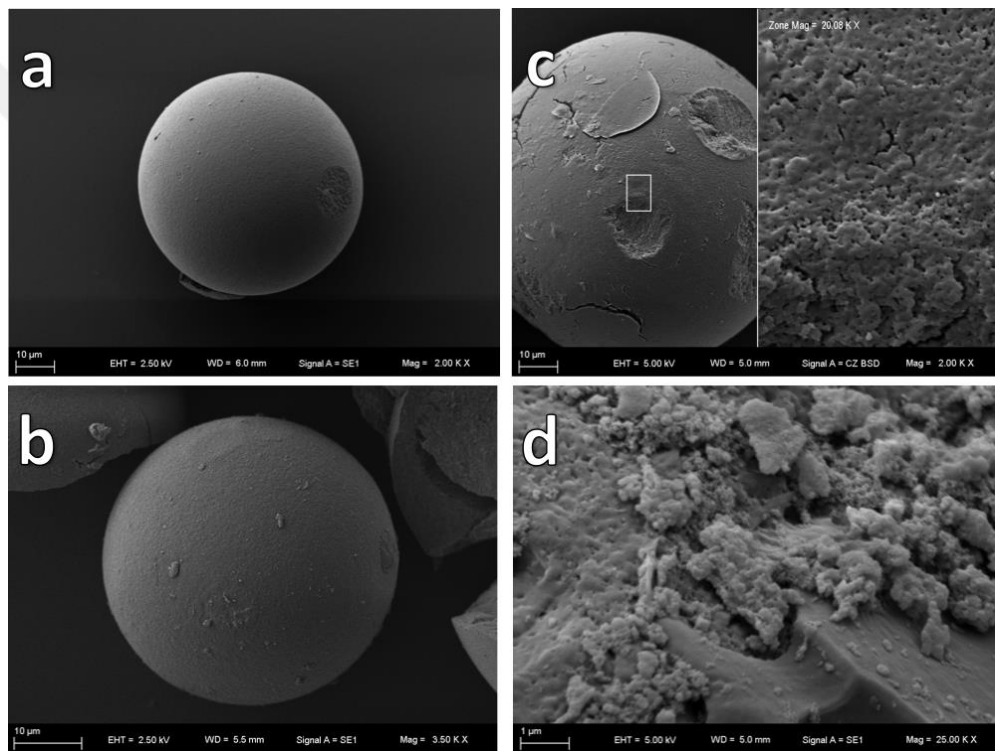
Şekil 4. 10 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Concanavalin A çözeltilerinin 400-700 nm aralığında alınan UV-Vis spektrumları. Kör numune olarak su kullanılmıştır.



Şekil 4. 11 Concanavalin A'nın Bradford Testi için hazırlanan kalibrasyon eğrisi

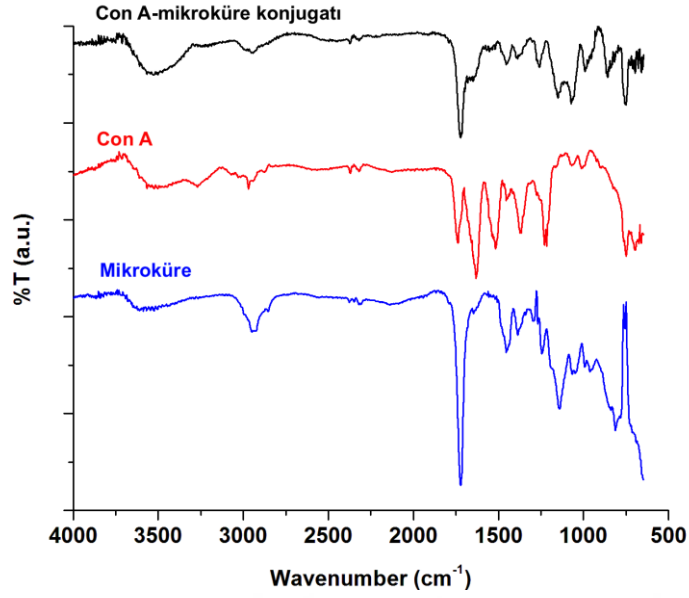
Elde edilen veriler ışığında ilk santrifüj sonrası elde edilen üst sıvı fazda bulunan Concanavalin A konsantrasyonu 0,905 mg/mL bulunmuştur. Daha sonra yapılan yıkama işleminden sonra elde edilen yıkama fazında protein konsantrasyonu 0,050 mg/mL bulunmuştur. Buna göre konjugasyon çözeltisinde bulunan Concanavalin A'nın bağlanma miktarı 0,225 mg'dır (5 mL×0,045 mg/mL).

Şekil 4.12'de verilen SEM görüntülerinde protein konjuge edilen küresel saçaklı polimerin yüzeyinin, bromo fonksiyonel küresel polimere ve saçaklı küresel polimere oranla daha pürüzlü olduğu görülmektedir. Bu durumda konjugasyonla birlikte ortaya çıkmaktadır.



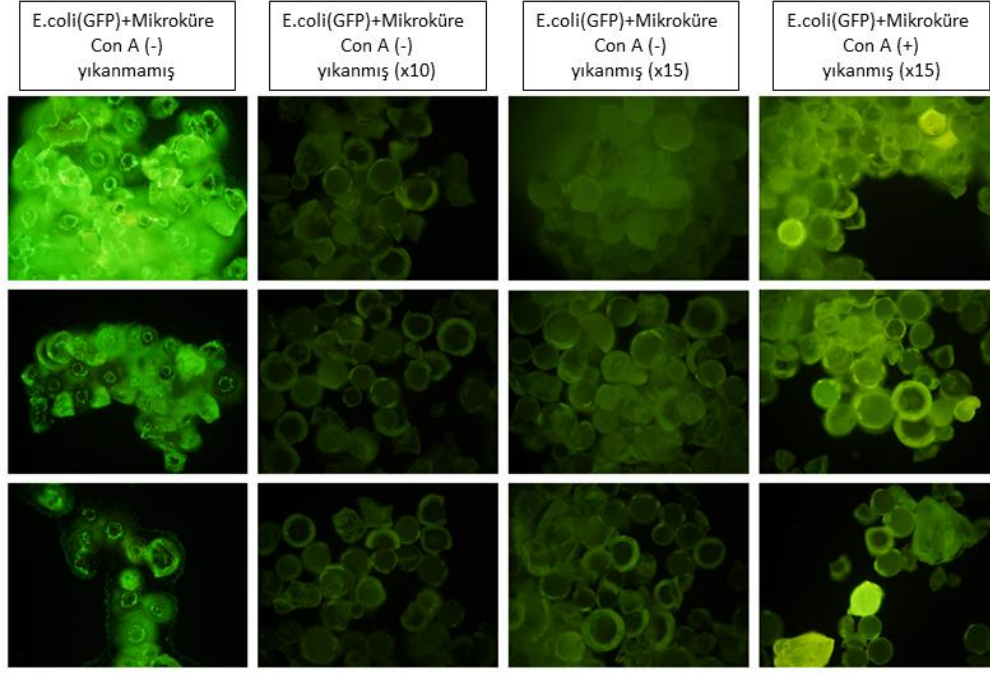
Şekil 4. 12 Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin (a), bu bromo fonksiyonel kürelerden ATRP ile elde edilen saçaklı kürelerin (b) ve saçaklı polimere Concanavalin A konjugasyonu sonrası elde edilen kürelerin (c ve d) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri

Elde edilen Concanavalin A-mikroküre konjugatının Şekil 4.13'de verilen karşılaştırmalı FT-IR spektrumu da konjugatın oluştuğu yönünde bilgi vermektedir.



Şekil 4. 13 Süspansiyon polimerizasyonu ile elde edilen brom fonksiyonlu mikro kürelerin (A) ve bu kürelerin PEGMA, NMAS kopolimerizasyonu ile yüzeyi modifiye edilen polimerlerin (B) FT-IR spektrumları

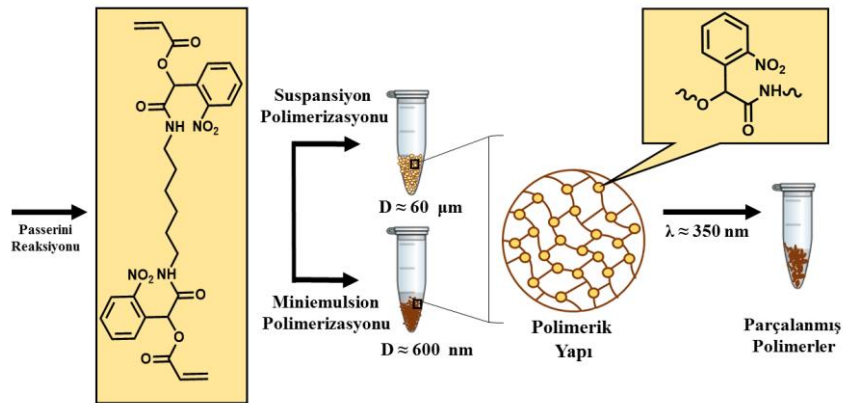
Polimerik saçaklı mikrokürelere Concanavalin A konjugasyonundan sonra yeşil floresans geni eksprese eden *E. Coli* hücreleri ile muamele edilmiştir. Şekil 4.14'de görüldüğü gibi Polimerik saçaklı mikrokürelerin *E. coli* (GFP) ile muamelesi sonucu yıkanmadan, 10 kez yıkanarak ve 15 kez yıkanarak floresans mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Concanavalin A konjuge edilmiş polimerik kürelerin *E.coli* (GFP) ile muamelesinden sonra 15 kez yıkanarak elde edilen görüntülerle karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Con A konjugeli küreler *E. coli*'lerin belirlenmesinde başarı göstermiştir. Ancak saçaklı kürelerin polimerizasyonunda Cu katalizör kullanılmış ve bu metal kürelere etkili bir şekilde tutunduğu için floresans mikroskopunda ışımaya vermektedir. Bu olumsuz duruma rağmen yıkanan ve yıkanmayan kürelerin yaptığı ışımaya yoğunluğu bakterilerin yakalandığını etkili bir şekilde kanıtlamaktadır (Şekil 4.15).



Şekil 4. 14 Con A ile dekore edilmiş polimerik saçaklı kürelerin GFP eksprese eden *E.coli* ile muamelesi sonucu floresans mikroskoptaki görüntüleri

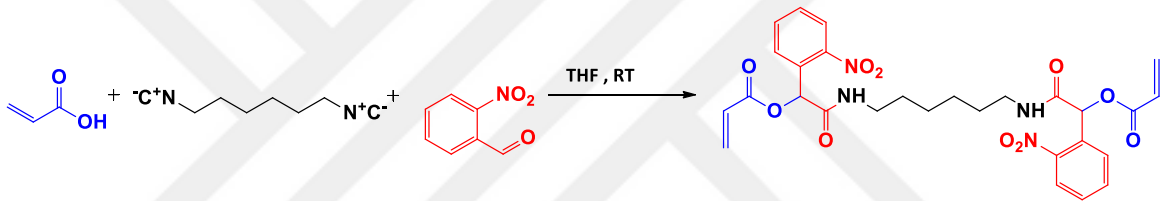
4.3 Işıktaki Parçalanır Mikro-Nano Küre Sentezi

Bu çalışmada Passerini Reaksiyonu ile ışıkta parçalanır çapraz bağlayıcı sentezi, mikro küre ve nanoküre eldesi için sırasıyla süspansiyon polimerizasyonu ve mini-emülsiyon polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Son olarak kürelerin UV ışık altında parçalanması incelenmiştir.

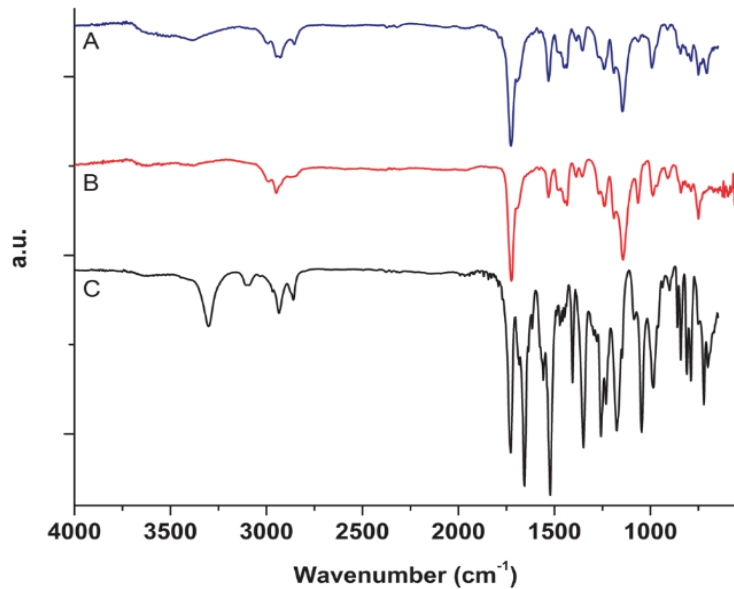


Şekil 4. 15 Işıktaki parçalanır mikro ve nano kürelerin sentez ve foto parçalanma basamakları

Bu çalışmada ilk olarak 1,6-diizosiyoheksan, 2-nitrobenzaldehit ve akrilik asit kullanılarak Passerini Reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve o-nitrobenzil ester fonksiyonlu çapraz bağlayıcı elde edilmiştir (Şekil 4.16). Elde edilen bu çapraz bağlayıcı FT-IR ve H NMR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.17'deki C ile gösterilen spektrumunda, 1530 cm^{-1} ve 1350 cm^{-1} 'deki bantları çapraz bağlayıcıda bulunan nitro gruplarını göstermektedir. Ek olarak 1730 cm^{-1} 'deki bant C=O bağlarını, 1200 cm^{-1} 'deki bant ise çapraz bağlayıcının ucunda bulunan alken gruplarını temsil etmektedir. Yine şekil 4.17'deki B spektrumu ışıkta parçalanır mikro kürelerin FT-IR eğrisini göstermektedir. Burada 1750 cm^{-1} 'de şiddetli olarak görülen bant poli(metilmetakrilat)ın karakteristik bir bantı olan C-O bağlarını göstermektedir. Ayrıca 3086 cm^{-1} 'deki bant aromatik grupları temsil etmekte bu da polimer içerisindeki yoğun çapraz bağ oranını göstermektedir.

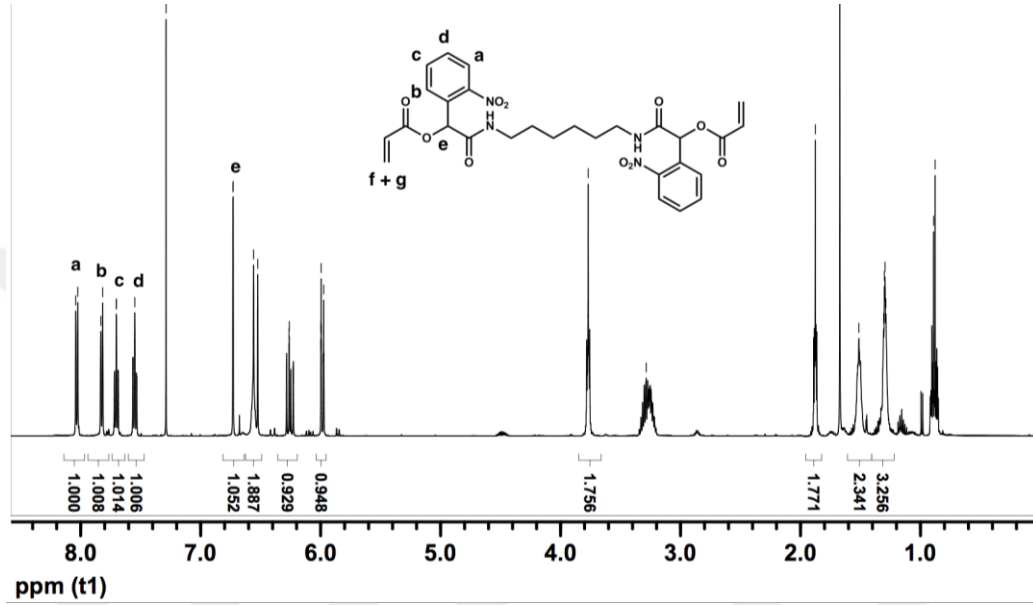


Şekil 4. 16 Passerini Reaksiyonu ile ışıkta parçalanır çapraz bağlayıcı sentezi



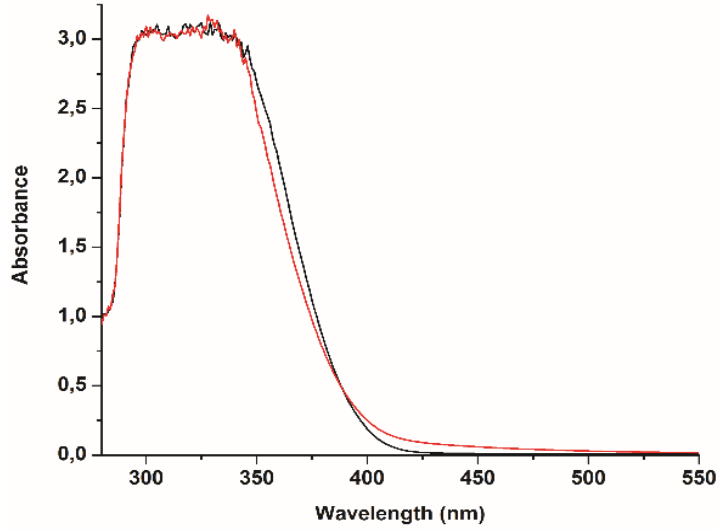
Şekil 4. 17 Işıktan parçalanır nanoküre (A), mikroküre (B) ve çapraz bağlayıcının (C) FT-IR spektrumu

FT-IR Spektroskopisinde ile elde edilen sonuçlar ^1H NMR Spektroskopisi ile desteklenmiştir. Şekil 4.18’de ışııkta parçalanır çapraz bağlayıcının ^1H NMR analizini göstermektedir. 7,81 ve 8,04 ppm arasındaki 4 pik aromatik grupları temsil etmektedir. Molekülün uç kısmında bulunan çift bağdaki üç protona ait pikler beklendiği gibi 6,00-6,80 ppm civarında görülmüştür. Burada en ayırt edici olan durum, “e” ile işaretlenmiş proton 6,73 ppm’e kadar kaymış olan bir singlet pik vermesidir.



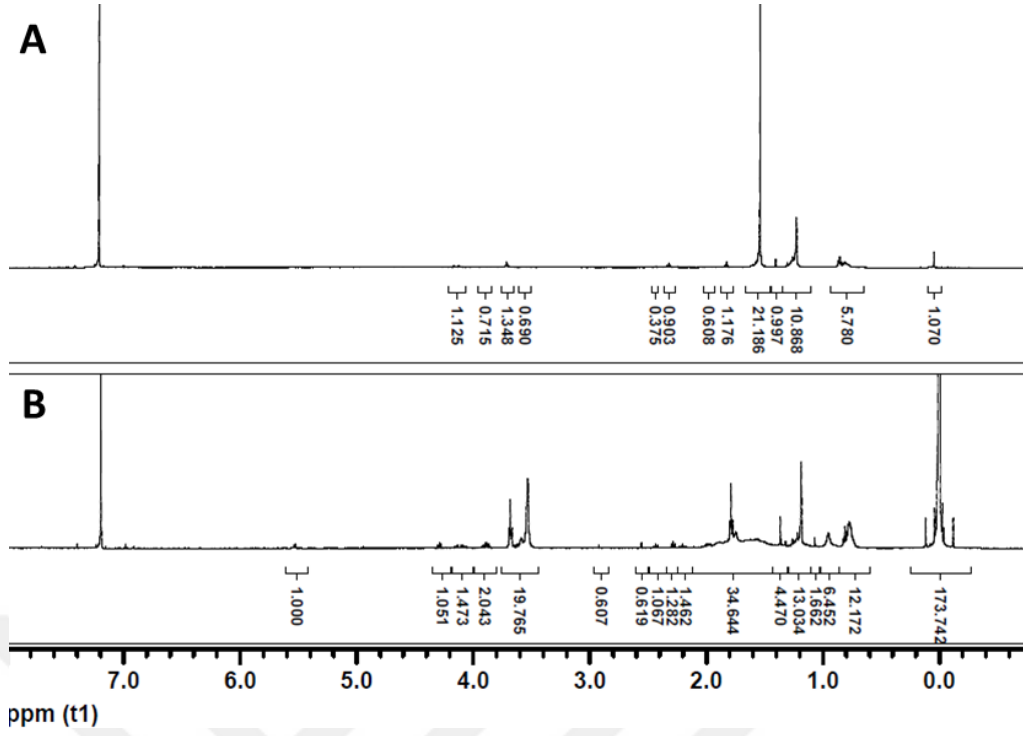
Şekil 4. 18 UV ışııkta parçalanır çapraz bağlayıcının FT-IR analizi

Elde edilen verileri destekleyen diğere bir analiz ışııkta parçalanır çapraz bağlayıcının degradasyon sonucudur. Çapraz bağlayıcı THF’te çözümlenerek 1 saat UV ışığa maruz bırakılmıştır. Kromofor grubun parçalanması sonucu çözeltinin renginde koyulaşma görülmüş ve UV Spektrometredeki absorpsansı 450 nm’den 500 nm’ye kaymıştır (Şekil 4.19)



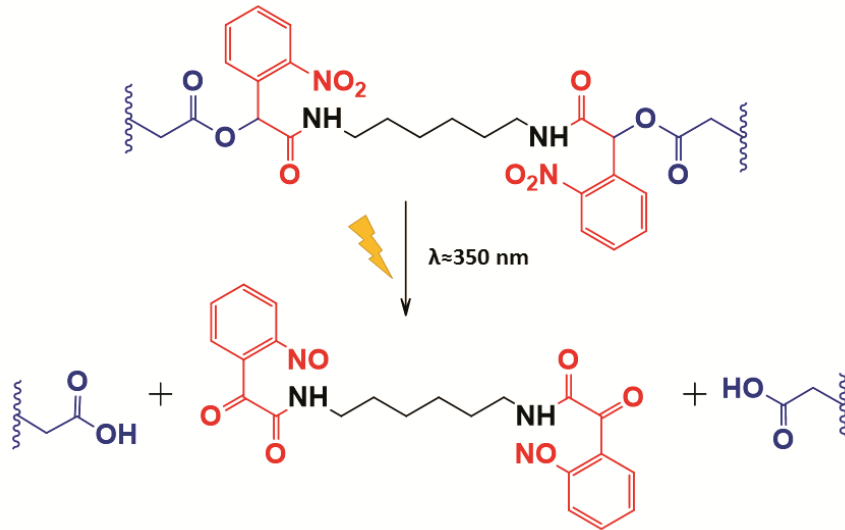
Şekil 4. 19 Işıқта parçalanır çapraz bağlayıcının UV spektroskopisindeki degradasyon öncesi (Siyah eğri) ve bir saat degradasyon sonrası sonucu (kırmızı eğri)

Mikroküre ve nanoküreler sırasıyla süspansiyon ve miniemülsiyon polimerizasyonlarıyla elde edilmiştir. Polimerizasyon boyunca en temel nokta çapraz bağlayıcının çözülmüş olmasıdır. Bu sebeple iki polimerizasyon için de kloroform seçilmiştir. Kloroform organik faz içerisindeki homojen çözünürlüğün yanısıra polimer zincirlerinin kontrollü uzamasına da yardımcı olur. Başarılı bir sentez gerçekleştirildiğinin diğer bir sonucu solventin parçalanma üzerindeki etkisini gösteren çözünürlük testidir. Bu amaçla, 20 mg ışıkta parçalanır mikroküre solvent içerisinde karanlık ortamda 15 gün bekletilmiş ve solvent kısmından numune alınarak H NMR'ı incelenmiştir. Diğer örnek ise 48 saat yaklaşık 350 nm. 'de solvent içerisinde maruz bırakılmış ve karanlıkta bekletilen örnekte olduğu gibi solventten numune alınarak H NMR'da incelenmiştir. Şekil 4.20 (A)' da görüldüğü gibi 1-2 ppm aralığında görülen zayıf pikler çapraz bağların şişmesi sonucu çözücüye geçen monomer safsızlıklarıdır.



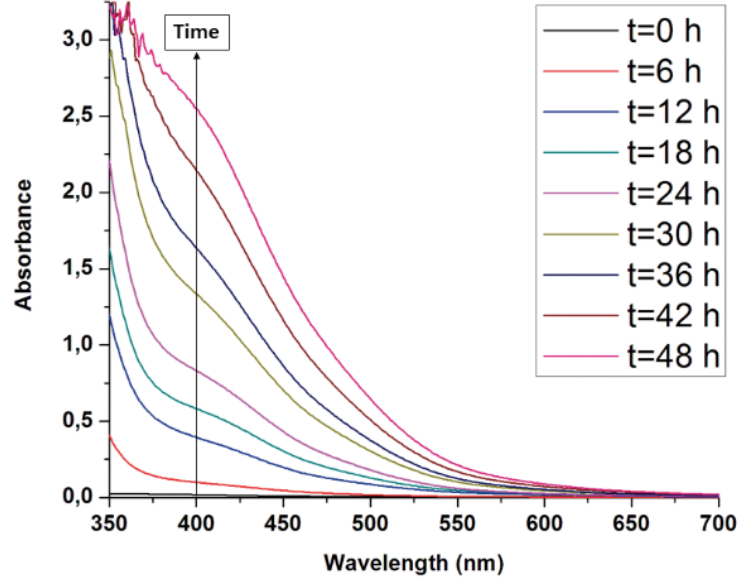
Şekil 4. 20 A) 15 gün karantıkta THF içerisinde bekletilen mikroküreler ile B) 48 saat UV ışığa maruz bırakılan mikrokürelerin NMR Spektrumları

Literatürden de bilindiği gibi UV ışığa maruz bırakıldığında *o*-nitrobenzil ester fonksiyonlu ışıkta parçalanır çapraz bağlayıcıdan karboksilik asit grubu uzaklaşmaktadır (Şekil 4. 21).

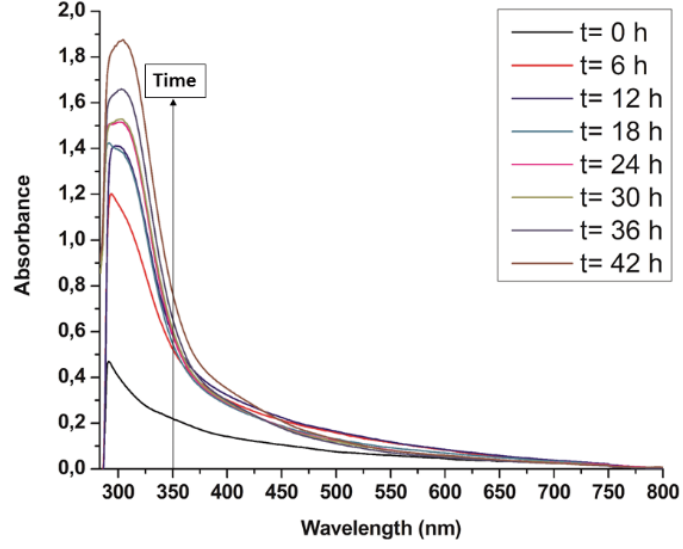


Şekil 4. 21 *O*-nitrobenzil ester fonksiyonlu çapraz bağlayıcının UV ışık altında foto parçalanma mekanizması

Mikro ve nanokürelerin parçalanabilirliği ışığa maruz bırakılarak test edilmiştir. Bunun için 50 mg mikro veya nano küre kuartz tüpe yerleştirilmiş ve 10 mL THF eklenmiştir. Fotoreaktörde yaklaşık 350 nm UV ışık uygulanarak 6 saat aralıklar ile 1 mL numune alınarak UV-Vis spektroskopisinde incelenmiştir. Şekil 4.22 ve 4.23’de görüldüğü gibi absorbansla doğru orantılı bir artış görülmektedir. Bu da kromofor grupların çözücüye geçmesi çözücünün renginin koyulaşarak absorbansı arttırması sonucu gerçekleşir.

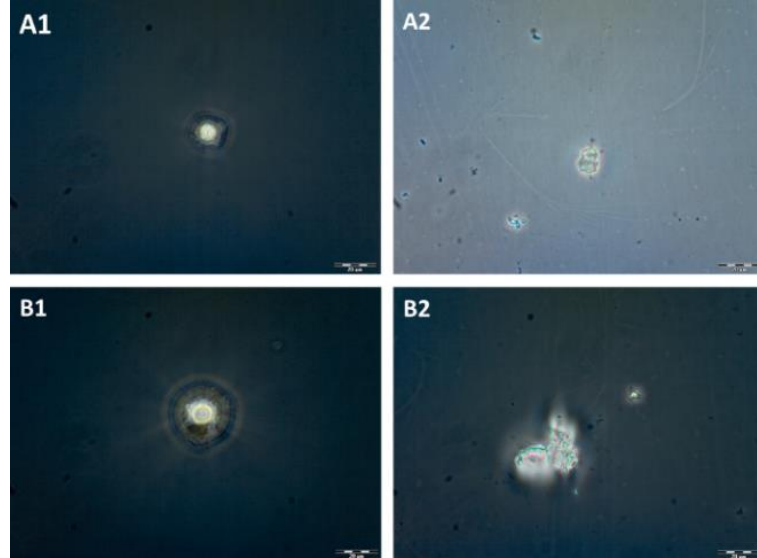


Şekil 4. 22 THF içerisindeki mikrokürelerin UV ışığa maruz bırakıldıktan sonra her altı saatteki UV spektrumu



Şekil 4.23 THF içerisindeki nanokürelerin UV ışığa maruz bırakıldıktan sonra her altı saatteki UV spektrumu

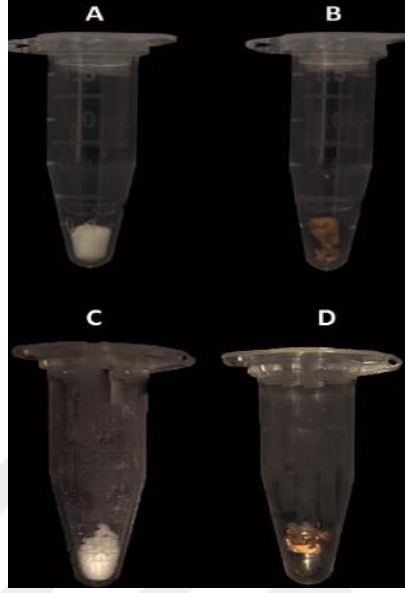
Mikro küreler ışık uygulanmadan ve 24 saat ışık uygulandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenmiştir. Şekil 4.24'te A1 ve A2 resimleri kürelerin t=0 anındaki durumlarını göstermektedir. Küreler yuvarlak ve belirgin bir şekle sahiptir. 24 saat sonra (B1-B2) kürelerin ışıkla degradasyon sonucu parçalandığı partiküllerin düzensiz şekillerinden anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 24 Işıktaki parçalanır mikrokürelerin parçalanma öncesi (A1, B1) parçalanma sonrası görüntüleri (A2,B2)

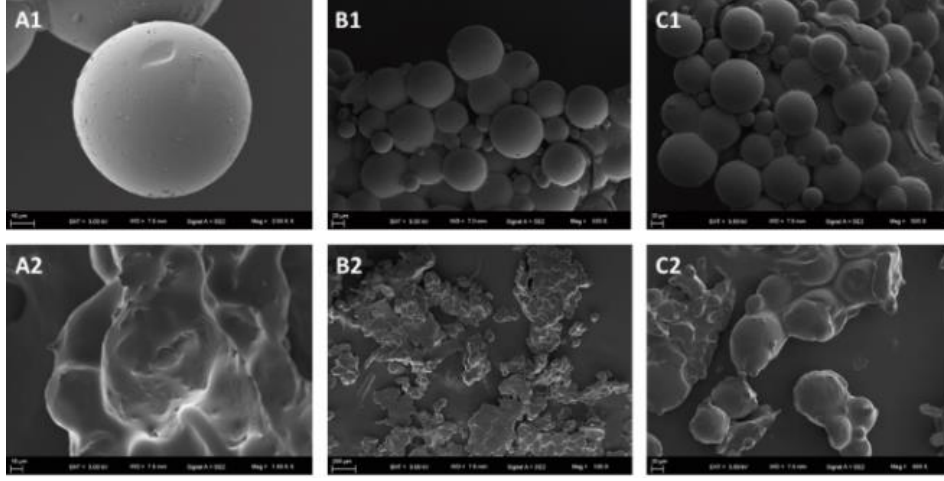
Şekil 4.25'te ışıkta parçalanmayı kanıtlayan diğer bir çalışmadır. UV ışığa maruz bırakılmayan mikroküreler (A) ve nanokürelerin (C) açık sarı renkte olduğu

görülmektedir. 48 saat boyunca parçalanma sonrası hem mikroküreler (B) hem de nanoküreler (D) açığa çıkan kromofor gruplar sonucu koyu kahve rengine dönüşmüştür. Ayrıca parçalanma öncesi granül halde bulunan polimerik partiküllerin jel formuna geçtiği de parçalanmanın başarısını kanıtlayan diğer bir sonuçtur.

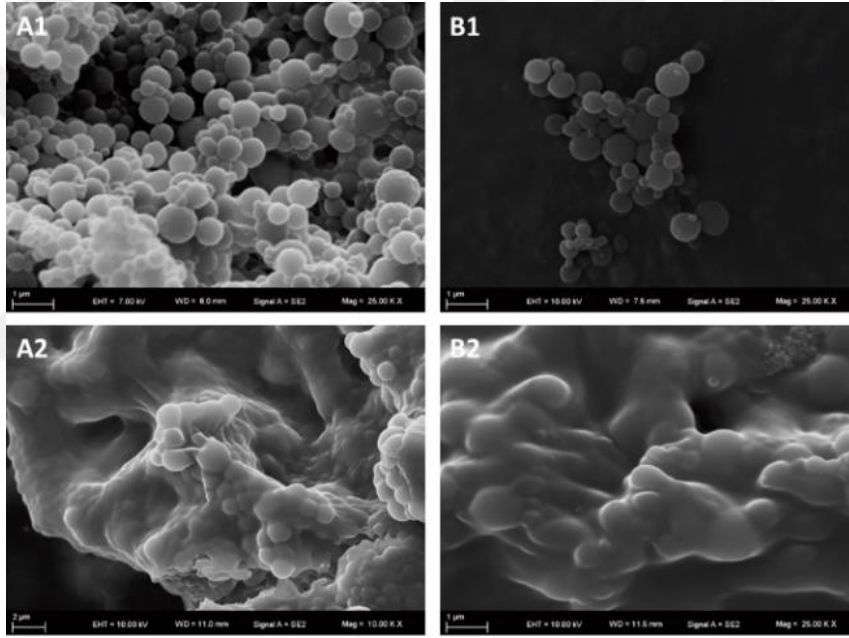


Şekil 4. 25 Işıktaki parçalanır polimerik kürelerin degradasyon öncesi ve sonrası görüntüleri, ışıkta parçalanır mikro küre öncesi (A)- sonrası (B), ışıkta parçalanır nanoküre öncesi(C)-sonrası (D)

Polimerik mikro ve nanopartiküllerin morfolojileri SEM görüntüleriyle incelenmiştir. Parçalanmadan önce mikro küreler Şekil 4.26 (a1,b1,c1) ve nanoküreler Şekil 4.27 (a1, b1) pürüzsüz polimerik küreler halindeyken 48 saat ışık uygulandıktan sonra birbirlerine girmiş, yumuşak ve şekilsiz bir form almıştır.



Şekil 4. 26 Işıktta parçalanır mikrokürelerin parçalanma öncesi(A1,B1,C1) ve sonrası (A2,B2,C2) görüntüleri



Şekil 4. 27 Işıktta parçalanır nanokürelerin parçalanma öncesi(A1,B1) ve sonrası (A2,B2) görüntüleri

Sonuç olarak gerçekleştirilen bu tez kapsamında Concanavalin A konjuge edilmiş biyoaktif polimer-cam hibrit yüzey, yine Concanavalin A ile dekore edilmiş saçaklı polimerik mikroküreler ve ışıktta parçalanır polimerik mikro ve nano boyutlu küreler hazırlanmıştır. Concanavalin A konjuge edilmiş polimerik cam yüzeyler hazırlanırken PEG bazlı biyoyumlu polimer elde etmek için PEGMA monomeri ve süksinimidil ester reaktif grubu elde etmek için NMAS monomerleri kullanılmıştır. NMAS monomerinin sahip olduğu NHS gruplarının amin reaktif olduğu bilimekte bu özellik kullanılarak

polimerik saçaklara protein konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Concanavalin A'nın glikoz ve mannoz reaktif olması da bakterilerin hücre duvarında eksprese edilen mannoz reseptörlerine bağlanma ve bakteri belirlenmesi amacıyla tercih edilmiştir. Yapılan çalışmada Concanavalin A konjuge edilmiş polimer-cam hibrit yüzeylerin yüksek afinitede bağlanma gerçekleştirdiği görülmüştür. Ayrıca sistemin amin grubu içeren antikor, çeşitli proteinler, hücre gibi çeşitli bioaktif yapılarla kolayca modifiye edilebileceği ve böylece biyogörüntüleme biyosensör uygulamaları için büyük bir potansiyel taşıdığı çalışmada gösterilmiştir.

Concanavalin A ile dekore edilmiş saçaklı mikroküreler de cam yüzeylerde olduğu gibi PEGMA ve NMA monomerleriyle hazırlanmıştır. Saçaklara konjuge edilen Concanavalin A proteini yeşil floresans proteini (GFP) eksprese edilen bakterilerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Polimerlerik kürelerin üzerinde saçakların oluşturulması reaksiyon ortamında etkili bir şekilde hareket etmesini böylece hedefin kolaylıkla yakalanmasını sağlamaktadır. Ayrıca mikrokürelerin çözünürlük göstermemesi sistemden kolaylıkla uzaklaştırılmasını mümkün kılar. Cam-polimer hibrit yüzeylerde olduğu gibi amin grubu içeren bir yapıyla kolaylıkla konjugasyonu imkanı sağlar. Örneğin, tez kapsamında sentezlenen bu mikroküreler bir enzimle konjuge edilerek mikro boyutlu bir reaktör sistemi oluşturmasını mümkün kılmakta bu sebeple sistem büyük öneme sahiptir.

Son olarak tez çalışmasında ışıkta parçalanır mikro ve nanokürelerin sentezi ve parçalanma çalışması gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın dönüm noktası mikro ve nanokürelerin sentezi için ışıkta parçalanır çapraz bağlayıcının Passerini reaksiyonu ile sentezlenmesidir. Passerini reaksiyonu çoklu bileşen reaksiyonudur ve yumuşak koşullar altında yüksek verimle gerçekleşir. Çevresel uyarılara yanıt oluşturan polimerlerin sentezi genellikle çoklu basamaklar gerektirir. Gerçekleştirilen bu yöntemle bu işlem tek basamağa düşürülmüştür. Parçalanma çalışmasında ise polimerik kürelerin yavaş ve kontrollü bir şekilde parçalandığı gözlemlenmiştir. Bu karakteristik özellikle ilaç salım sistemleri için kontrollü salımda büyük önem taşımaktadır. Tez çalışmasında degradasyon işlemi UV ışık altında gerçekleştirilmesine rağmen literatürde *o*-nitrobenzil gruplarının NIR ışık altında etkin bir şekilde parçalandığı gösterilmiştir. Bu sebeple vücut içi kullanımda için umut vaadedicidir.

KAYNAKLAR

- [1] Stuart, M. A. C. ve et al., (2010). "Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials," *Nat Mater*, 9: 101–113.
- [2] Francis, R., Joy, N., Sivadas, A., Gopalan, G. P. ve Baby, D. K., (2016). "Stimuli-Responsive Polymers: Biomedical Applications," in *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 233–259.
- [3] Gebelein, C. G., (1985). "Bioactive Polymeric Systems, An Overview," in *Bioactive Polymeric Systems: An Overview*, MA: Springer US, 1–15.
- [4] Theato, P., (2013). "Chemical Strategies for the Synthesis of Protein – Polymer Conjugates," 37–70.
- [5] Coessens, V., Pintauer T. ve Matyjaszewski, K.,(2001). "Functional polymers by atom transfer radical polymerization," 26.
- [6] Rao, J. P. ve Geckeler, K. E., (2011). "Progress in Polymer Science Polymer nanoparticles : Prepration techniques and size-control parameters," *Prog. Polym. Sci.*, 36: 887–913.
- [7] Francis, D. S. ve Raju,K., (2016) "Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites," John Wiley & Sons.
- [8] Fomina, N., McFearin, C., Sermsakdi, M., Edigin, O. ve Almutairi, A., (2010). "UV and near-IR triggered release from polymeric nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.*, 132: 9540–9542.
- [9] Macdiaramid, A. G., (2013). "Functional Polymers," 6: 375–395.
- [10] Schmaljohann, D., (2006). "Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery," *Adv. Drug Delivery*, 58: 1655–1670.
- [11] Jeong, B. ve Gutowska, A., (2002). "Lessons from nature : stimuli- responsive polymers and their biomedical applications," 20: 305–311.
- [12] Wei, M., Gao, Y., Li, X. ve Serpe, M. J.,(2017). "Polymer Chemistry,"127–143.
- [13] N. Biomedical, pH-responsive polymers: properties, synthesis and applications. Woodhead Publishing Limited.
- [14] Almeida, H., Amaral, M. H. ve Lobão, P., (2012). "Temperature and pH stimuli-

responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery," 2: 1–10.

- [15] Yoshida, T., Lai, C., Kwon, G. S., ve Sako, K., (2014). "pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery," 24: 520–532.
- [16] Klinger, D., (2013). "Light-Sensitive Polymeric Nanoparticles Based on Photo-Cleavable Chromophores.
- [17] Li, L., Lv, A., Deng, X.-X., Du, F.-S. ve Li, Z.-C., (2013). "Synthesis of photo-cleavable polymers via Passerini reaction.," Chem. Commun., 49:8549–8551.
- [18] Zhao, H., Sterner, E. S., Coughlin, E. B. ve Theato, P., (2012). "O-Nitrobenzyl alcohol derivatives: Opportunities in polymer and materials science," Macromolecules, 45:1723–1736.
- [19] Priya James H., John, R. ve Alex, A., (2014). "Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview," Acta Pharm. Sin. B, 4:120–127.
- [20] Zhao, L., Xiao, C., Gai, G. ve Ding, J., (2016). "self-regulated drug delivery," Chem. Commun., 52:7633–7652.
- [21] Gil, E. S. ve Hudson, S. M., (2014). "Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates," 29:1173–1222.
- [22] Day, E. M. P., Lin, E. ve Maynard, H. D., (2014). "Therapeutic Protein – Polymer Conjugates : Advancing Beyond PEGylation," 136: 14323–14332.
- [23] Klok, H., (2009). "Peptide / Protein - Synthetic Polymer Conjugates : Quo Vadis," 7990–8000.
- [24] Lee, L. S., Conover, C., Shi, C., Whitlow, M. ve Filpula, D., (2000). "Prolonged Circulating Lives of Single-Chain Fv Proteins Conjugated with Polyethylene Glycol : A Comparison of Conjugation Chemistries and Compounds," 973–981.
- [25] Xu, L., (2012). "Application of poly (ethylene glycol)–distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) block copolymers and their derivatives as nanomaterials in drug delivery," 4185–4198.
- [26] Pasut, G., (2014). "Pegylation of Biological Molecules and Potential Benefits : Pharmacological Properties of Certolizumab Pegol," 28:15–23.
- [27] Srivastava, A., Connor, I. B. O., Pandit, A. ve Wall, J. G., (2014). "Progress in Polymer Science Polymer-antibody fragment conjugates for biomedical applications," Prog. Polym. Sci., 39:308–329.
- [28] Deng, C., Wu, J., Cheng, R., Meng, F. ve Klok, H., (2014). "Progress in Polymer Science Functional polypeptide and hybrid materials : Precision synthesis via α -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications," Prog. Polym. Sci., 39:330–364.
- [29] Hashemi-najafabadi, S., Vasheghani-farahani, E. ve Shojaosadati, S. A., (2006). "A Method To Optimize PEG-Coating of Red Blood Cells," 1288–1293.
- [30] Teramura, Y. ve Iwata, H., (2010). "Cell surface modification with polymers for biomedical studies," 1081–1091.

- [31] Wu, Y., Ng, D. Y. W., Kuan, S. L. ve Weil, T., (2015). "Biomaterials Science Protein – polymer therapeutics : a macromolecular perspective," 214–230.
- [32] Vanparijs, N., et al., (2015). "Polymer-protein conjugation via a 'grafting to' approach – a comparative study of the performance of protein-reactive RAFT chain transfer agents," *Polym. Chem.*, 6:5602–5614.
- [33] Matyjaszewski, K., (2012). "Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current status and future perspectives," *Macromolecules*, 45: 4015–4039.
- [34] Matyjaszewski, K. ve Xia, J., (2001). "Atom transfer radical polymerization.," *Chem. Rev.*, 101:2921–2990.
- [35] Lecolley, F., et al., (2003). "Synthesis of functional polymers by living radical polymerisation", 2689–2695.
- [36] Brooks, B. W., (2010). "Suspension Polymerization Processes," 1737–1744.
- [37] Chern, C.S., (2006). "Emulsion polymerization mechanisms and kinetics," 31:443–486.
- [38] Upv, B. C. ve Sebesti, D., (2014). "Miniemulsion Polymerization," 1–9.
- [39] Haag, P. W., Werner O., Voit, B. ve Werner, C., (2016). "Bio- and Multifunctional Polymer Architectures," Wiley Sons.
- [40] Xiao, L., Zheng, X., Zhao, T. ve Sun, L., (2013). "Controllable immobilization of polyacrylamide onto glass slide : synthesis and characterization," 2359–2364.
- [41] Wu, X., Gao, Y. ve Dong, C., (2015). "RSC Advances Polymer / gold hybrid nanoparticles : from synthesis to cancer theranostic applications," *RSC Adv.*, 5:13787–13796.
- [42] Shen, L., (2011). "Functional Biomaterials Biocompatible Polymer / Quantum Dots Hybrid Materials : Current Status and Future Developments," 355–372.
- [43] Yang, Y., Asiri, A. M., Tang, Z., Du, D. ve Lin, Y., (2013). "Graphene based materials for biomedical applications," *Biochem. Pharmacol.*, 16: 365–373.
- [44] Demirel, B., Cos, S., Kalkan, M. ve Tuncer, C. (2009). "Preparation of a Novel Polymer-Modified Si Surface for DNA Immobilization Go," *Macromolecular Bioscience*, 472–479.
- [45] Lei, Z., Gao, J., Liu, X., Liu, D. ve Wang, Z., (2016). "Poly(glycidyl methacrylate- co -2-hydroxyethyl methacrylate) Brushes as Peptide/Protein Microarray Substrate for Improving Protein Binding and Functionality,".
- [46] Durmaz, Y. Y., et al., (2011). "Modification of Polydivinylbenzene Microspheres by a Hydrobromination / Click- Chemistry Protocol and their Protein- Adsorption Properties," pp. 141–150.
- [47] Karagoz, B., Gunes, D. ve Bicak, N. (2010). "Preparation of Crosslinked Poly (2-bromoethyl methacrylate) Microspheres and Decoration of Their Surfaces with Functional Polymer Brushes," 1999–2007.
- [48] Gao, C., Zhang, H., Wu, M., Liu, Y., Wu, Y., Yang, X. ve Feng, X., (2012). "Polyethyleneimine functionalized polymer microsphere: a novel delivery vector

for cells", *Polymer Chemistry*, 3: 1168–1173.

- [49] Karagoz, B., Bayramoglu, G., Altintas, B., Bicak, N. ve Arica, M. Y., (2010). "Poly (glycidyl methacrylate) -Polystyrene Diblocks Copolymer Grafted Nanocomposite Microspheres from Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization for Lipase Immobilization : Application in Flavor Ester Synthesis," 9655–9665.
- [50] Gerard, M., Chaubey, A. ve Malhotra, B. D., (2002). "Application of conducting polymers to biosensors," 17: 345–359.
- [51] Malhotra, B. D., Chaubey, A. ve Singh, S. P., (2006). "Prospects of conducting polymers in biosensors," 578:59–74.
- [52] Li, J., Stachowski, M. ve Zhang, Z., (2018). "Applications of responsive polymers in implantable medical devices and biosensors," 259:298.
- [53] Kim, J. H., Park, K., Nam, H. Y., Lee, S., Kim, K. ve Kwon, I. C., (2007). "Polymers for bioimaging," *Progress in Polymer Science (Oxford)*.
- [54] Wang, M., Wang, M., Oh, J. K., Dykstra, T. E. ve Lou, X.,(2006) "Surface Surface Modification of CdSe and CdSe/ZnS Semiconductor Nanocrystals with Poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate)," *Macromolecules*, 3664–3672.
- [55] Cheng, C. M., Kuan, C.M. ve Chen C.F., (2016). "Polymeric-Based In Vitro Diagnostic Devices" Springer, 106:50.
- [56] Larson, N. ve Ghandehari, H., (2012). "Polymeric Conjugates for Drug Delivery,".
- [57] Yakarsonmez, S., et al., (2016). "Cloning , Expression and Characterization of the Gene Encoding the Enolase from *Fusobacterium nucleatum 1*," *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52: 23–30.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Gözde DEVECİ
Doğum Tarihi ve Yeri :02.01.1992-Çorlu
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :gzde.deveci@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lise	Sayısal	Tekirdağ Anadolu Öğretmen Lisesi	2010

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
07.2016- halen	IDIATEK	AR-GE, Biyomühendis
08.2014- 09.2014	Bilim İlaç (Çerkezköy)	Stajyer
06.2013- 09.2013	Osaka Üniversitesi Biyolojik Bilimler Laboratuvarı (Japonya)	Stajyer

YAYINLARI

Bildiri

1. Deveci, G., Kahveci, M. U. (2017, Mayıs) Preperation Of Concanavalin A Decorated P(PEGMA-co-NMAS) Polymeric Surfaces and Utilization in Bacterial Cell Detection (Poster) APME Advanced Polymers via Macromolecular Engineering.
2. Deveci, G., Sipahioglu, S.; Kahveci, M. U. (2017, Mayıs) Synthesis of pH Sensitive Hyperbranched P(PLA-b-(PEGMA-co-NMAS)) Polymers via Ring Opening Polymerization and Atom Transfer Radical Polymerization (Poster) APME Advanced Polymers via Macromolecular Engineering.
3. Deveci, G., Kahveci, M. U. (2016, Temmuz). Synthesis of a Photo-Cleavable Core Prepared by Passerini Reaction and Preparation of an ABC 3- Mictoarm Star Polymer with This Core (Poster). World Polymer Congress (MACRO2016). IUPAC.
4. Kasap, H., Deveci, G., Kahveci, M. U. (2016, Haziran). Responsive Hyperbranched Polymers by Hemi-acetal Formation and ATRP(Poster) NanoTr-12

Proje

1. Biyo-aktif polimerik yapılara dayalı tedavi ve tanı platformlarının kontrollü polimerizasyon ve biyoortogonal yöntemleri ile geliştirilmesi (214M175)
Projedeki Görevi: Bursiyer Destekleyen Kurum: TÜBİTAK Projedeki Görev Süresi: Mart 2016-Eylül 2016 (6 ay)
2. Tıbbi Tanı Uygulamalarında Kullanılabilecek Biyoaktif Polimerlerin Hazırlanması (2016-07- 04-YL11)
Projedeki Görevi: Araştırmacı Destekleyen Kurum: BAP Projedeki Görev Süresi: 2016-2017-halen devam ediyor.
3. IDIATEK Kanser Tanı Çipi ve Sistemi (2150139)
Projedeki Görevi: Biyomühendis Destekleyen Kurum: TUBİTAK Projedeki Görev Süresi: 2016-halen devam ediyor.